



Universidade de São Paulo
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
Centro de Pesquisa em Virologia
Curso de Ciências Biomédicas
Ênfase em Ciências Básicas da Saúde



Maria Vitória Oliveira de Souza

Infecção de explantes de tonsilas palatinas humanas com vírus
respiratórios pandêmicos: Influenza e SARS-CoV-2.

Ribeirão Preto
Julho de 2022

Maria Vitória Oliveira de Souza

Infecção de explantes de tonsilas palatinas humanas com vírus respiratórios pandêmicos: Influenza e SARS-CoV-2.

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) do
Curso de Ciências Biomédicas da Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de
São Paulo (FMRP-USP) como requisito para a obtenção
do título de Bacharel em Ciências Biomédicas. Trabalho sob orientação do Prof. Dr.
Eurico de Arruda Neto e co-orientação do Dr. Ronaldo Bragança Martins e Ms. Thais
Melquiades de Lima.

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

A inclusão deste trabalho na Biblioteca Digital foi aprovada pela Comissão Coordenadora do Curso em sua 63ª Sessão Extraordinária, realizada em 06/06/2022.

Ribeirão Preto
Julho de 2022

Agradecimentos

Antes de tudo gostaria de agradecer e dedicar parte dessa trajetória à minha mãe, Regina, que mesmo sem a presença física é a verdadeira motivação e razão para que hoje eu possa estar aqui. Espero que em outros planos ela possa sentir todo meu orgulho por ser sua filha e gratidão. Agradeço também ao meu pai, Vicente, que é meu porto seguro e a pessoa que me apoiou de maneira imensurável durante todos esses anos e sempre acreditou no meu potencial. Tudo isso é para e por você. Agradeço também à minha família, em especial à tia Alerinda, Cláudia e Eliane por todo apoio e por todas as orações. À minhas amigas Thainara, Ana Beatriz e Maria Eduarda, que me acolheram como família e sempre torceram por mim, meu muito obrigada. Ao meu amigo Arthur, obrigada por tudo. À minha amiga Verônyca, sou grata por todos os momentos que compartilhamos juntas nessa trajetória e por todo o apoio. Agradeço aos meus amigos e futuros cientistas biomédicos Guilherme, Isabela e Rafaela, que são partes essenciais da minha graduação. Às minhas amigas de casa, que marcaram minha vida como uma segunda família e trouxeram muita felicidade e acolhimento. Agradeço principalmente ao Centro de Pesquisa em Virologia, especialmente ao Prof. Dr. Eurico Arruda pela oportunidade de fazer ciência e conhecer a virologia, por todos os conhecimentos e apoio. Aos meus co-orientadores Ronaldo Bragança Martins e Thais Melquiades de Lima, minha gratidão pela paciência, por todo conhecimento passado e por toda ajuda de sempre. A todos que trabalham no Laboratório de Patogênese Viral, considerados amigos, por toda a colaboração, troca de experiências e momentos. Tive o prazer de conhecer tantos cientistas que admiro e me inspiro. À Universidade de São Paulo pela oportunidade de fazer parte do melhor ensino e pesquisa públicos da América Latina, por integrar projetos de educação, empreendedorismo e divulgação científica. Ao Programa Unificado de Bolsas pelo apoio financeiro durante os anos de pesquisa, bem como ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo fomento ao Centro de Pesquisa em Virologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (CPV-FMRP-USP). A todos aqueles que tive a oportunidade de cruzar caminhos

durante essa trajetória e que de alguma forma contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional, minha gratidão.

Resumo

Os vírus respiratórios têm forte impacto não somente na saúde pública, mas em aspectos sociais e econômicos, afetando todo o mundo. Isso fica claro como nos casos dos vírus respiratórios pandêmicos, como Influenza e SARS-CoV-2. As tonsilas têm um papel importante na resposta imune contra patógenos ingeridos ou inalados. O nosso grupo de pesquisa, de forma inédita, mostrou que o tecido tonsilar pode ser uma abundante fonte de vírus respiratórios mesmo na ausência de sintomas de infecções agudas, um forte indicativo para uma infecção silenciosa de longo prazo. Os explantes são fragmentos teciduais cultivados em uma cultura com interface meio-ar que minimiza alterações no órgão de interesse, preservando a citoarquitetura e interações entre células. As infecções de vírus respiratórios pandêmicos em explantes de tonsilas palatinas podem ajudar a entender aspectos moleculares e celulares da disseminação viral em tecidos linfóides em diferentes tempos de infecção. A infecção *ex vivo* foi usada para determinar curvas de replicação, testagem de antígenos *in situ* e quantificação de citocinas. Para tal propósito, os explantes foram preparados com cortes superficiais de tonsilas palatinas humanas em pequenos pedaços mantidos em placas de 6 poços com meio de cultura suplementado com antibióticos e antimicóticos. O meio foi mantido em uma conformação a apenas embeber parte do tecido, dispondo a outra parte em contato com o ar. Após incubação por pelo menos 24 horas, os explantes foram infectados com vírus Influenza A ou SARS-CoV-2 por deposição direta do inóculo viral na superfície do fragmento. Os fragmentos foram infectados com condições de mock, utilizando apenas o meio de cultura, e com condições de vírus inativados por luz ultravioleta. Cada condição experimental foi coletada e preparada para extração de RNA viral e imunohistoquímica. A carga viral de ambos os vírus cresceu significativamente em 48 horas pós infecção, mantendo a presença de RNA viral em até 10 dias pós infecção.

ABSTRACT

Respiratory viruses have a strong impact not only on public health, but also on social and economic aspects, reaching the entire globe. This is especially true about pandemic viruses, such as influenza and SARS-CoV-2. Tonsils play important roles in the immune response to ingested and inhaled pathogens. Our research group pioneered studies that showed tonsillar tissue may harbor abundant respiratory viruses even in the absence of symptoms of acute infections, an indication of long-term silent healthy carrier state. Tissue explants are three-dimensional tissue fragments maintained in culture *ex vivo* with an air interface to minimize alteration of the organ of interest, preserving the cytoarchitecture and interactions between cells. The assessment of infections by these pandemic respiratory viruses in *ex vivo* tonsillar explants can help to understand cellular and molecular aspects of viral dissemination in lymphoid tissues at different times post infection. The tonsillar explants infected *ex vivo* were used for determination of replication curves, testing for viral antigen *in situ*, and cytokine quantification. For this purpose, explants were prepared from a superficial section of palatine tonsil divided into small 5mm pieces kept in 6-well plates with cell culture medium supplemented with antibiotics and antimycotics. The medium was kept to a minimum as to only soak the fragment, keeping the surface in contact with the air. After incubation for at least 24 hours, the explants were infected with influenza A or SARS-CoV-2 viruses by direct deposition of the inoculum on the surface of the fragment. Fragments were also mock infected and infected with UV-inactivated virus. In each experimental condition, pieces were prepared for RNA extraction and immunohistochemistry. The viral loads of both viruses were significantly increased at 48 hours post infection, and maintained over a 10-day period.

Key words: Pandemic respiratory viruses; tissue explants; *ex vivo* infection

SUMÁRIO

1. Introdução	1
1.1 Vírus respiratórios pandêmicos	1
1.2 Vírus Influenza	1
1.3 SARS-CoV-2	4
1.4 Tonsilas	6
1.5 Infecção ex vivo de explantes de tecidos	8
1.6 Citocinas e vírus respiratórios pandêmicos	9
2. Justificativa	10
3. Objetivos	11
4. Materias e métodos	11
4.1 Tonsilas	11
4.2 Extração de RNA de tonsilas	12
4.3 Transcrição reversa	12
4.4 Paineis de vírus respiratórios	13
4.5 Explantes	13
4.6 Vírus: Influenza A e SARS-Cov-2	15
4.7 Infecção	15
4.8 Coletas	16
4.9 Imunohistoquímica	17
4.10 Quantificação ACE-2	19
4.11 Quantificação absoluta de carga viral	19
4.12 Quantificação de citocinas	20
5. Resultados e Discussão	21
5.1 Pacientes e amostras	21
5.2 Quantificação de ACE-2	22
5.3 Carga viral em explantes infectados com vírus SARS-CoV-2	23
5.4 Carga viral em explantes infectados com vírus influenza A.	25
5.5 Marcação de proteína viral nos cortes de explantes infectados.	26
5.6 Quantificação absoluta de citocinas	28
6. Conclusões	30
Referências bibliográficas	31
Anexos	34

1. Introdução

1.1 Vírus respiratórios pandêmicos

Os vírus Influenza A e SARS-CoV-2 são exemplos de patógenos virais respiratórios de origem zoonótica, que por infecção interespecie se adaptam ao hospedeiro humano e podem causar pandemias.

A falta de mecanismos bioquímicos de correção de erros de transcrição pela polimerase do vírus Influenza A resulta em altas taxas de mutação, que podem se somar a alterações antigênicas mais intensas, causadas por coinfeções de hospedeiros suscetíveis por mais de uma cepa de vírus influenza de diferentes origens, como humana, aviária e suína, originando uma linhagem viral pandêmica, tal como foi o Influenza A H1N1 de 2009 (Hutchinson, 2018). Em indivíduos com imunidade prévia podem ser selecionados mutantes de escape nas proteínas de superfície hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA), permitindo evasão da resposta imune e ocorrência de epidemias sazonais, processo chamado de drift antigênico.

O *spillover* (transbordamento) do vírus SARS-CoV-2 para seres humanos ocorreu recentemente, a partir de morcego, de modo semelhante ao já ocorrido com outros coronavírus, como SARS-CoV e MERS-CoV. Para estes dois agentes, morcego da espécie *Rhinolophus sinicus* foi o mais provável hospedeiro original, e para SARS-CoV-2, além de morcego, é possível que outros hospedeiros intermediários tenham importância, como o pangolim (*Manis javanica*) (Khalil *et al.*, 2020).

1.2 Vírus Influenza

Os vírus Influenza causam gripe, com sintomas respiratórios, dores musculares, dor de cabeça e fadiga, podendo evoluir para pneumonia grave e até o óbito, especialmente em idosos, crianças, grávidas e imunocomprometidos. A transmissão acontece especialmente por aerossóis (Pleschka, 2012).

Os vírus Influenza fazem parte da família *Orthomyxoviridae*, que é composta por seis gêneros: *Alfainfluenzavirus*, com as espécies de Influenza A; os *Betainfluenzavirus*, com as espécies de Influenza B; os *Gamainfluenzavirus*, com a espécie Influenza C; *Thogotovirus*; *Isavirus*; e *Quaranjavirus*. Apenas os vírus influenza A, B e C infectam seres humanos.

Estruturalmente, os vírus influenza são envelopados e pleomórficos, com genoma segmentado de RNA de fita simples com sentido negativo, totalizando 12-14kb. Os vírus influenza A e B têm 8 segmentos e os vírus Influenza C têm 7 segmentos de RNA. Os três primeiros segmentos do genoma viral (PB1, PB2 e PA) codificam proteínas que compõem o complexo RNA-polimerase. O quarto segmento de RNA codifica a hemaglutinina (HA), uma glicoproteína de superfície que tem funções na adsorção e fusão virais. O quinto segmento codifica a nucleoproteína NP, que envolve o RNA formando nucleocapsídeos e participa na síntese de RNA. O sexto segmento codifica a glicoproteína de superfície neuraminidase (NA), que cliva resíduos de ácido siálico ligados à HA, permitindo a liberação dos vírus. O sétimo segmento do genoma codifica as proteínas M: M1 que é uma proteína de matriz envolvida no brotamento, e M2 que é um canal de prótons no envelope. Por fim, o oitavo segmento codifica uma proteína multifuncional não-estrutural, NS.

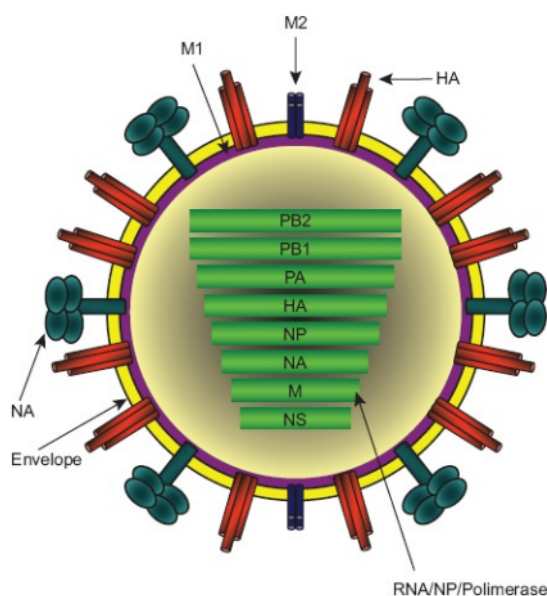


Figura 1. Representação esquemática do vírus Influenza A. Os segmentos do genoma e as proteínas estruturais estão designadas conforme detalhado no texto. Fonte: Virologia Humana - 3ª Ed. (2015)

O ciclo do vírus Influenza A (IAV) começa com a ligação da HA a resíduos de ácido siálico presentes em proteínas da superfície da célula hospedeira, que são células epiteliais respiratórias. Após esta ligação o vírus é endocitado e no ambiente ácido a HA sofre modificações conformacionais, resultando na fusão do envelope viral com a membrana do endossomo e liberação do conteúdo viral no citoplasma. Os oito segmentos de ribonucleoproteína (vRNPs) são importados para o núcleo, onde o complexo de polimerase viral realiza a transcrição e replicação do RNA viral. O RNA do vírus Influenza de sentido negativo é transcrito em RNA de sentido positivo, que atua como RNA mensageiro (RNAm). O RNAm é exportado para o citoplasma e é traduzido em proteínas virais. As glicoproteínas virais recém-sintetizadas (HA, NA e M2) são direcionadas à membrana plasmática, as do complexo da polimerase e a nucleoproteína (NP) são importadas ao núcleo, onde ocorre a montagem. O RNA negativo do genoma viral também serve de molde para a síntese de RNA complementar (RNAc) de sentido positivo, também chamado de antígeno, que serve de molde para síntese de novos genomas virais. As proteínas virais M1 e NEP se ligam aos vRNPs recém-sintetizados, o material vai para o citoplasma, e pela interação com endossomos reciclados montam-se os vírions com oito segmentos, seguindo-se o brotamento viral (Figura 2).

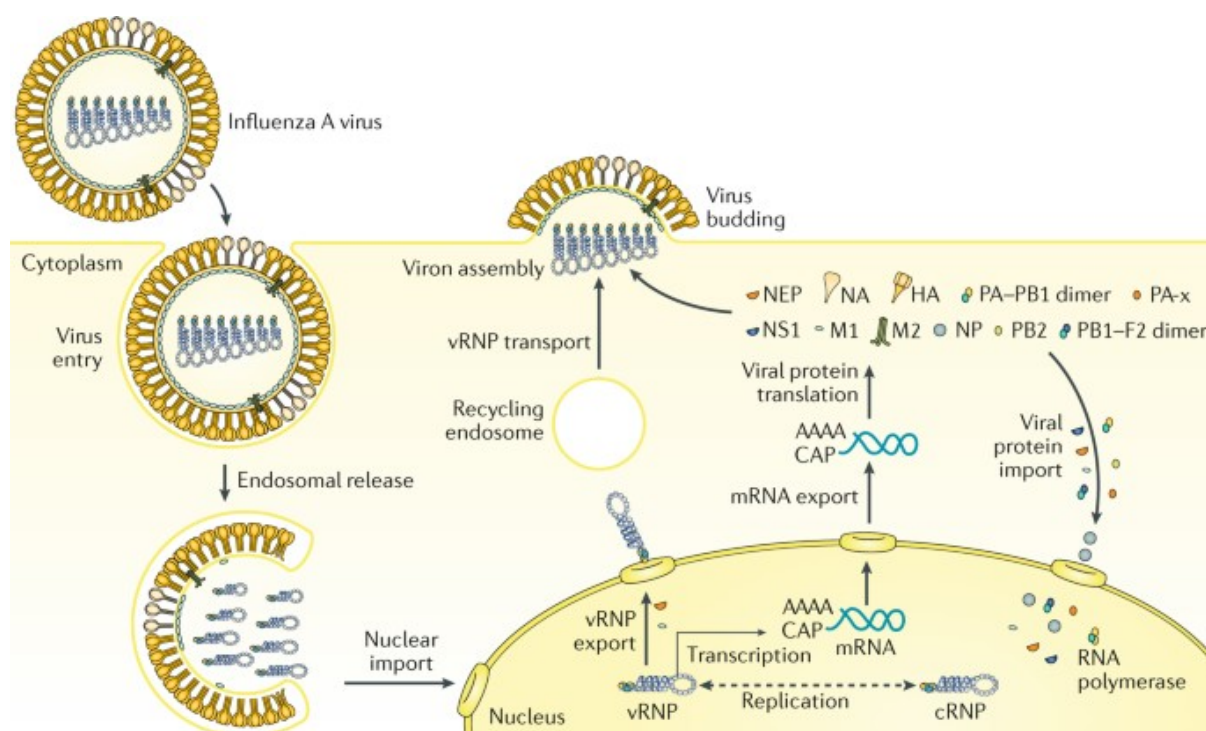


Figura 2. Ciclo de replicação do vírus influenza. Os componentes do ciclo de replicação estão explicados no texto. Fonte: Krammer, F., Smith, G.J.D., Fouchier, R.A.M. *et al.* Influenza. *Nat Rev Dis Primers* 4, 3 (2018).

As linhagens e subtipos dos vírus influenza A são designadas de acordo com a composição de HA e NA (Kawaoka *et al.*, 2012). Há 18 tipos conhecidos de hemaglutinina (H1-H18) e 11 tipos de neuraminidase (N1-N11) que podem se combinar de modo a formar vírus diferentes. A espécie influenza B se classifica em dois tipos: Yamagata e Victoria (Costa *et al.*, 2016).

1.3 SARS-CoV-2

Os vírus da família *Coronaviridae* são divididos em gêneros alfa, beta, gama e delta. Os alfacoronavírus 229E e NL63, por exemplo, causam resfriado comum, enquanto os betacoronavírus SARS-CoV, MERS-CoV e SARS-CoV-2 causaram surtos de doença respiratória potencialmente grave, como a COVID-19 (Abdelrahman *et al.*, 2020; McFee, 2020).

O SARS-CoV-2, causador da mais recente pandemia, é em geral esférico, envelopado, com cerca de 120 nm, e genoma de RNA de fita simples de sentido positivo, de aproximadamente 30 kb (Wang *et al.*, 2020). O vírion consiste em proteínas estruturais: Spike (S), proteína de envelope (E), proteína de membrana (M), proteína de nucleocapsídeo (N) e, para alguns betacoronavírus, a proteína hemaglutinina esterase (HE).

O ciclo replicativo se inicia com a ligação da proteína S a receptores na célula hospedeira, dentre os quais o principal é a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE-2), e a subsequente entrada requer clivagem de S em S1 e S2 por serino-protease de superfície celular (TMPRSS2). Ocorre a seguir a entrada viral, em geral por fusão do envelope viral com a membrana do endossomo celular, mas também diretamente na membrana plasmática. A ORF1 do genoma de RNA é traduzida em ORF1a e ORF1b, resultando em poliproteínas processadas em proteínas não estruturais (nsps), que formam o complexo de transcrição e replicação viral. As proteínas estruturais são traduzidas a partir da ORF localizada downstream da ORF1b. Após a montagem no Golgi, os vírus saem por exocitose.

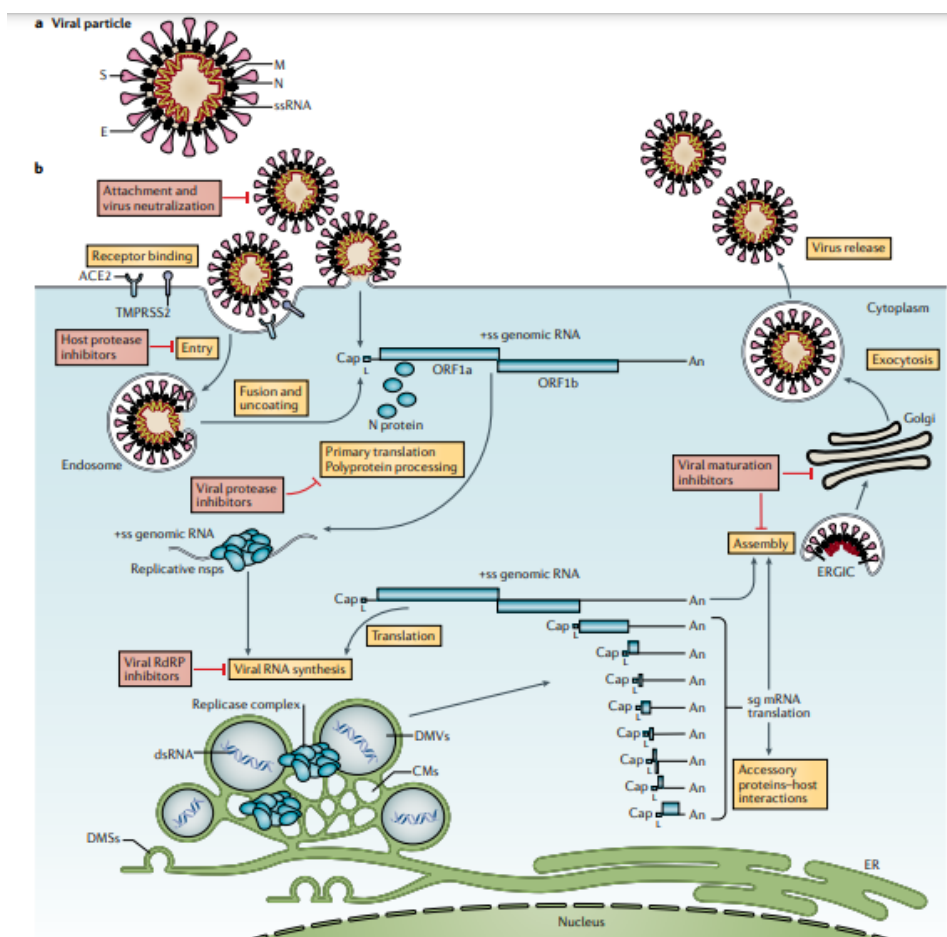


Figura 3. Ciclo de replicação do SARS-CoV-2. (a) Esquema da partícula viral; (b) Ciclo replicativo do vírus na célula hospedeira, conforme explicado no texto. Fonte: V'kovski, P., Kratzel, A., Steiner, S. et al. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2.

A COVID-19 se manifesta por sintomas respiratórios, como tosse seca, congestão nasal e coriza, dificuldade para respirar, febre, fadiga, dor de garganta, cefaleia, além de perda de olfato ou paladar. Os casos variam de leves a muito graves, com síndrome de desconforto respiratório, necessitando de internação e ventilação mecânica, podendo levar a óbito.

A transmissão de SARS-CoV-2 ocorre por gotículas, mediante inalação direta ou auto-inoculação a partir de superfícies contaminadas, e medidas como afastamento social, higienização de superfícies e de mãos, e o uso de máscaras foram adotadas para o enfrentamento da pandemia.

1.4 Tonsilas

As tonsilas são órgãos linfóides secundários do trato respiratório superior, e incluem tonsila faríngea ou adenoide, tonsilas palatinas ou amígdalas, além de tonsilas tubais e linguais. Juntas elas formam o anel de Waldeyer (Marmitt *et al.*, 2008) e participam da primeiro local de resposta contra antígenos inalados ou ingeridos, onde ocorre expansão de subpopulações de linfócitos T e B (Ferguson *et al.*, 2014).

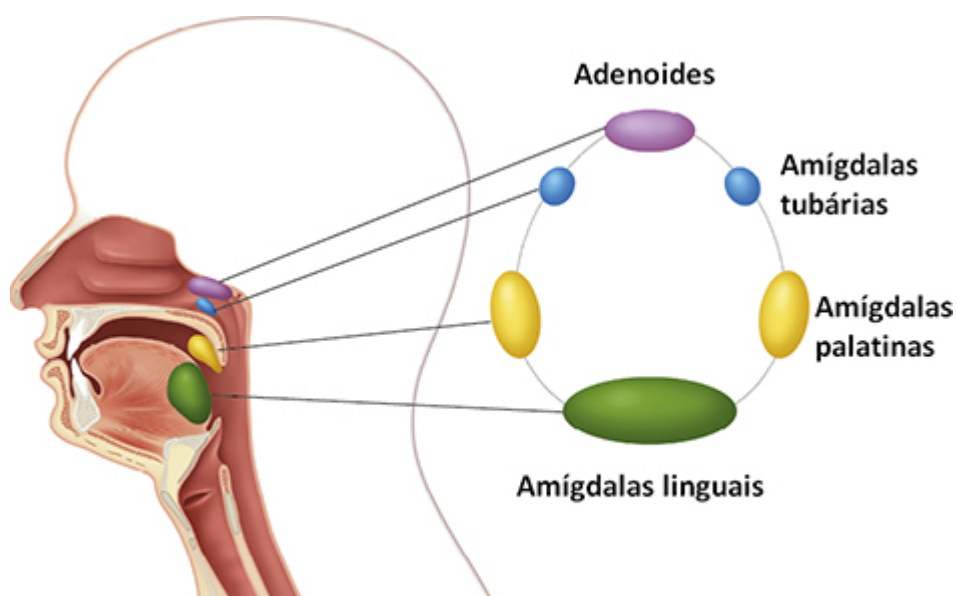


Figura 4. Localização anatômica das tonsilas. Adaptação de Perry, M., & Whyte, A. (1998). Immunology of the tonsils.

Nas tonsilas o tecido linfóide se arranja em folículos, que estão agrupados abaixo do epitélio, o qual se estende em criptas profundas. As tonsilas palatinas têm epitélio estratificado pavimentoso contínuo com aquele que reveste a cavidade oral.

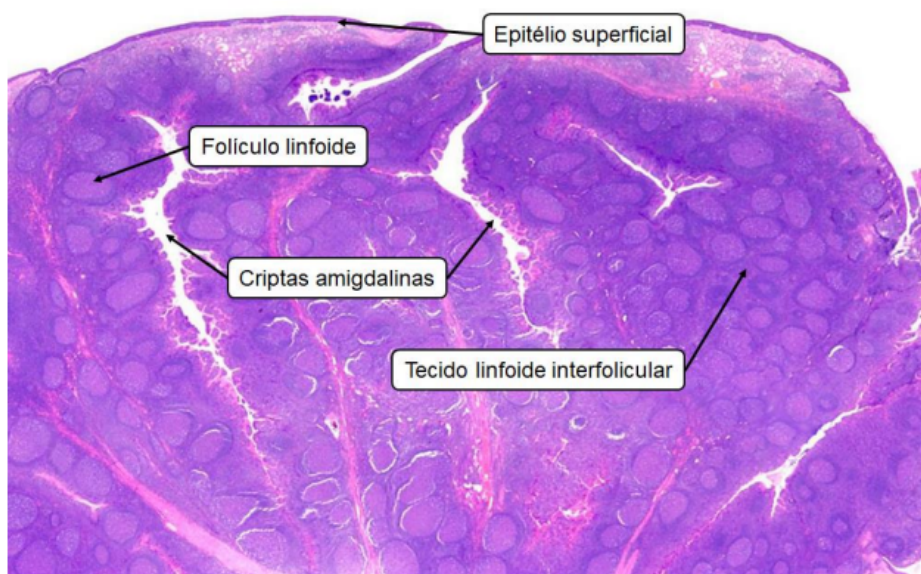


Figura 5. Histologia de tonsila. Os compartimentos comentados no texto estão assinalados. Fonte: Gomes Marques, M.L. (2019) Anel de Waldeyer: sua Função e Impacto da Adenoamigdalectomia.

Os folículos linfóides tonsilares contêm células que infiltram o epitélio das criptas em uma zona marginal de células B, enquanto a maioria das células linfóides que se localizam mais superficialmente dentro do epitélio são células T (Tan *et al.*, 2018). No epitélio reticular das criptas, além de células B maduras são encontrados macrófagos, células dendríticas e células T CD4+. Na região extrafolicular que circunda o folículo são encontradas células T CD4+ em uma proporção maior que células T CD8+, além de macrófagos, células dendríticas interdigitantes e também células B. Por fim, no próprio folículo linfóide se encontram células T CD4+ de memória, células foliculares e diversas populações de células B como naive, centrócitos e centroblastos (Nave *et al.*, 2001).

Infecções e alterações na microbiota de tonsilas podem levar a inflamações ou hiperplasia das tonsilas, que podem requerer sua remoção por tonsilectomia (Brodsky *et al.*, 1989). A frequência de detecção de vírus respiratórios em amostras de tonsilas humanas pode chegar a 97,5%, com destaque para a presença de Influenza A em 5,8% das amostras testadas (Proença-Modena *et al.*, 2012). A infecção pelo vírus influenza A em tonsilas pode acontecer em diferentes tipos de células do sistema imunológico, como linfócitos B e linfócitos T CD8 + (Castro *et al.*,

2020). Há várias linhas de evidência que indicam que tonsilas podem ser sítios de infecção silenciosa por vírus respiratórios.

1.5 Infecção *ex vivo* de explantes de tecidos

O explante é uma cultura primária tecidual tridimensional, que busca manter a relação histológica espacial e funcional entre diferentes tipos de células de um tecido ou órgão de interesse. Explantes de tonsilas podem ser mantidos *ex vivo* em interface com o ar e permitem realizar infecção com patógenos específicos. Essa abordagem é vantajosa para estudos de interações locais entre células, que podem resultar em produção de um conjunto de citocinas, ou expressão de outros componentes moleculares, além de permitir avaliar a dispersão de um vírus na histoarquitetura, ao contrário de uma cultura de células dissociadas (Grivel *et al.*, 2009).

A cultura de tecidos *ex vivo*, embora seja hoje padronizada de diversas maneiras, surgiu na primeira metade do século passado, primariamente com culturas de fragmentos de coração de embriões aviários. O uso de matrizes esponjosas para cultura tecidual surgiu em 1950, e o de explantes para testar fármacos anticâncer em 1980 (Anush *et al.*, 2015).

Apesar de diferentes tecidos poderem ser utilizados, como tonsilas, linfonodos, tecido cervico-vaginal e intestinal, além de tecido nervoso, os explantes têm limitações consideráveis, dependendo da variabilidade tecidual entre indivíduos, diferenças entre diferentes regiões de um mesmo órgão, a polarização do tecido, além da deterioração dos explantes após determinado período de tempo (Introini *et al.*, 2018). Em diferentes condições experimentais utilizando esta técnica, se pode chegar a até 3 semanas, dependendo do tecido usado, e assim analisar diferentes componentes moleculares e imunes liberados dos tecidos normais ou infectados, mediante análises de alterações do meio de cultura e da replicação viral em diferentes tempos. Em adição, é possível fazer estudos histológicos e moleculares do próprio tecido.

Alguns exemplos de estudos feitos com vírus em explantes de tonsilas podem ser citados, como HIV e Epstein-Barr (Gotoh *et al.*, 2011), além de rinovírus (Arruda *et al.*, 1991). Explantes tonsilares podem ser usados em estudos de tratamentos com drogas específicas, como por exemplo os efeitos

imunomodulatórios de compostos derivados de *Polypodium leucotomos* (Sánchez-Rodríguez *et al.*, 2018).

1.6 Citocinas e vírus respiratórios pandêmicos

Os interferons (IFNs) são moléculas constituintes da resposta imunológica e responsáveis pela modulação das condições da imunidade inata e adaptativa. Podem ser divididos essencialmente em Interferons do tipo I, como os interferons α e β , produzidos por diversos tipos celulares; e interferons do tipo II, como o interferon- γ (IFN- γ), produzidos especificamente por alguns tipos celulares como as células natural killer (NK) e linfócitos T CD4⁺ ou CD8⁺. As infecções por vírus Influenza são fortes indutoras da expressão de todos os tipos de interferons, principalmente do tipo I, que agem para eliminar o patógeno e prevenir disseminação viral. Para as infecções com vírus SARS-CoV-2, foi documentado que interferon- γ tem papel inibitório sobre a replicação viral e aumenta as atividades citotóxicas dos linfócitos T CD8⁺. Níveis de IFN- γ aumentam em crianças com COVID-19 e podem ser indicativos de severidade da doença (Hasanvand, 2022).

Pacientes com COVID-19 grave enfrentam a chamada tempestade de citocinas, com aumento de TNF- α , IL-6, IL-2, IL-7, e IL-10 (Guo *et al.*, 2022). A IL-6 tem forte relação com a modulação do sistema imunológico, desde sua regulação até seu desbalanceamento e com respostas pró-inflamatórias ou anti-inflamatórias. Além do papel na imunidade, a IL-6 também está envolvida na modulação de respostas metabólicas, como as envolvidas na homeostase da glicose, fosforilação e oxidação. Frente a infecções virais, os níveis de IL-6 tendem a aumentar e tal condição pode ser marcadora para a gravidade da doença.

A IL-10 também aparece elevada na COVID-19 durante a tempestade de citocinas e em pacientes graves admitidos na UTI (Hasanvand, 2022). Apesar disso, esta citocina tem papel anti-inflamatório e está envolvida em persistência viral. A resposta imunológica ideal seria aquela com eliminação do patógeno sem que ocorram danos ao hospedeiro. Para isso, células imunes, mediadores e citocinas precisam de um balanço refinado entre respostas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. A IL-10 tem papel importante nesse quesito, pois é imunomodulatória de respostas inata e adaptativa. A produção dessa citocina acontece constitutivamente ou em resposta a estímulos inflamatórios por células

imunes como linfócitos T e células dendríticas. Em estágios iniciais de infecções, a IL-10 é produzida em grandes quantidades por células T efectoras, mas parece não interferir em respostas antivirais inflamatórias, mas sim proteger o microambiente de danos (Rojas *et al.*, 2017). A IL-10 se relaciona com a persistência de infecções virais crônicas (Jones *et al.*, 2006), quando os vírus podem evadir, suprimir e alterar sua tolerância para a sobrevivência viral. Experimentos envolvendo infecção de pulmão por vírus Influenza mostram que as células T CD4⁺ e CD8⁺ expressam mRNA dessa citocina e secretam IL-10 (Sun *et al.*, 2009).

2. Justificativa

Os vírus respiratórios pandêmicos influenza A e SARS-CoV-2 têm forte impacto na saúde pública, mas os mecanismos de infecções prolongadas ou persistentes por estes patógenos em órgãos linfóides, como as tonsilas, ainda não são conhecidos. Estudos anteriores do laboratório mostraram que tonsilas obtidas por tonsilectomias de rotina para tratamento de crianças com hipertrofia tonsilar, sem sintomas de infecção respiratória aguda, podem conter infecções silenciosas por diversos vírus respiratórios (Proenca-Modena *et al.*, 2012), inclusive IAV em diversas subpopulações celulares, principalmente linfócitos B e T CD8⁺ (Castro *et al.*, 2020). Portanto, é provável que tonsilas palatinas e faríngeas sirvam como locais de persistência de vírus respiratórios pandêmicos, mesmo na ausência de sintomas de infecção aguda, e pode haver replicação viral e excreção de vírus em secreções, servindo como fonte de transmissão. Adicionalmente, considerando a diversidade de células de tonsilas humanas, a infecção com vírus respiratórios pode contribuir para esclarecer interações vírus-célula não-canônicas, ainda obscuras, que podem ter grande implicação em persistência e patogênese desses agentes.

Estudos já em andamento no nosso laboratório têm resultados preliminares que indicam que SARS-COV-2 infecta e se replica em tecidos tonsilares, o que também justifica o interesse do trabalho.

O estudo de SARS-CoV-2 e IAV mediante infecção *ex vivo* de explantes de tonsilas busca trazer informações para esclarecer aspectos destas infecções persistentes, mecanismos celulares e moleculares particulares deste tecido em sua arquitetura normal.

3. Objetivos

- 1) Padronizar a preparação de explantes de tecido de tonsilas palatinas humanas;
- 2) Infectar os explantes *ex vivo* com vírus influenza A e SARS-CoV-2, para avaliar susceptibilidade, permissividade, produção de progênie;
- 3) Quantificar a produção de algumas citocinas em resposta à infecção.

4. Materias e métodos

4.1 Tonsilas

Os tecidos foram obtidos de tonsilectomias de crianças entre 2 e 9 anos feitas no Hospital Estadual de Ribeirão Preto (HE-RP). As amostras do presente trabalho fizeram parte do projeto aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da instituição, sob o número CAAE 31490720.1.0000.5440 em colaboração com os professores Edwin Tamashiro, Fabiana Valera e Wilma Terezinha Anselmo-Lima, do Departamento de Departamento de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço também da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP). Chegaram ao Centro de Pesquisa em Virologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto amostras de amígdalas, adenóides, lavados nasofaríngeos, citobrushes e sangue.

Todas as amostras foram processadas seguindo protocolo já estabelecido no laboratório. Tecidos de amígdalas foram lavados com PBS, dispostos em placas de Petri, e inicialmente dissociados manualmente com um bisturi, a seguir macerado e submetido a tratamento enzimático em tubo Falcon contendo PBS com as enzimas dispase e collagenase. Os tubos foram colocados no shaker a 37°C por 1 hora. Após esse período, o conteúdo restante foi filtrado em filtros e o resultante foi dividido em dois tubos e centrifugados a 1200 x rpm por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet formado foi ressuspensionado em 5ml de tampão para a lise de hemácias. Após 10 minutos de incubação, houve nova centrifugação e ressuspensão em 1,5ml de meio RPMI sem soro fetal bovino e sem antibióticos/antimicóticos. O preparado foi distribuído em tubos contendo 250µl de amostra em 750µl de TRIzol, para futuros experimentos de extração de DNA e RNA; 500µl de amostra em 500µl de Viral Transport Medium (VTM), para futuros

experimentos de titulação viral; e 500µl de amostra em 500 µl de RNALater para preservação.

4.2 Extração de RNA de tonsilas

As respectivas amostras armazenadas no TRIzol passaram pelo processo de extração de RNA seguindo protocolo TRIzol. Em cada tubo contendo 1ml da amostra em TRIzol adicionou-se 200 µl de clorofórmio, aguardando 3 minutos para a centrifugação a 12000 g por 15 minutos à 4°C. Retirou-se a primeira fase do conteúdo, respectiva ao RNA total da amostra e colocou-se em um novo tubo contendo 500 µl de isopropanol. A mistura aguardou incubação por 10 minutos e nova centrifugação a 12000 g por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante da amostra foi descartado e colocou-se 1ml de etanol 70%. Após breve agitação a amostra foi centrifugada a 7500 g por 10 minutos à 4°C. Novamente o sobrenadante foi descartado e o tubo invertido sobre papel aguardou secagem por 10 minutos. Finalmente o pellet foi ressuspensionado em 40 µl de água ultrapura. O RNA extraído foi quantificado utilizando 2µl da amostra no espectrofotômetro NanoDrop Lite (Thermo Scientific™).

4.3 Transcrição reversa

Após a quantificação, o RNA extraído seguiu-se protocolo de transcrição reversa. O RNA de cada amostra foi diluído de modo a se padronizar a reação. A cada 10µl de amostra de RNA padronizado se adicionou 2µl de random primers e a mistura seguiu para ciclagem de 95°C por 5 minutos. Ao mix da reação se adicionou os seguintes reagentes do kit: dNTPs, buffer 10x, água ultrapura e a enzima transcriptase reversa. Após a primeira ciclagem foi adicionado às amostras 8µl do mix e seguiu-se para a última ciclagem de 25°C por 10 minutos, 37°C por 2 horas, 85°C por 5 minutos e 15°C até que se retire a amostra do equipamento.

4.4 Painei de vírus respiratórios

Cada amostra advinda das tonsilectomias (amígdala, adenóide, lavado nasofaríngeo e citobrush) passou por testagem utilizando a técnica de PCR em tempo real para diversos vírus respiratórios, incluindo Influenza A e SARS-CoV-2.

Para testagem do vírus Influenza A nas amostras foi utilizada a enzima Taqman Universal (Applied Biosystem, Foster City, Califórnia, EUA) com a descrição da sequência de primers e sondas em anexo, controle positivo de estoque viral, controle da reação com cDNA de células Calo ou Hela, controle de contaminação com água ultrapura usada no mastermix e o respectivo cDNA advindo da etapa de transcrição reversa.

Para a testagem de SARS-COV-2 nas amostras foi utilizada a enzima GoTaq (Promega, Madison, Wisconsin, EUA), primers e sondas com sequências específicas, controle positivo de amostras clínicas ou estoque viral, controle da reação com RNA de células Calo ou Hela, controle de contaminação com a mesma água ultrapura utilizada no master mix e o respectivo RNA.

Ambas técnicas utilizaram o equipamento StepOnePlus Real Time PCR System (Applied Biosystem) com configurações específicas a cada tipo de enzima utilizada no master mix. Na Tabela 1 se encontram os ciclos de cada condição.

Tabela 1. Ciclagem da reação de PCR em tempo real para ambos os vírus.

Influenza A				
45 ciclos				
50 °C por 2 minutos	95 °C por 10 minutos	95 °C por 15 segundos	55 °C por 30 segundos	60 °C por 1 minuto
SARS-CoV-2				
40 ciclos				
45 °C por 10 minutos	95 °C por 2 minutos	95 °C por 5 segundos	60 °C por 30 segundos	

4.5 Explantes

Os explantes foram montados a partir de amostras de tonsilas que chegaram ao Centro de Pesquisa em Virologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

(CPV- FMRP USP) no período de maio de 2021 a abril de 2022. Foram escolhidas estrategicamente apenas amígdalas para a montagem dos explantes considerando que experimentos do laboratório comprovam a infecção natural deste tipo de tecido. A elaboração dos explantes seguiu protocolo baseado na literatura (Grivel *et al.*, 2009) com modificações.



Figura 6. Amostra representativa de tonsila palatina usada para preparação de explantes.

Inicialmente as amígdalas escolhidas foram lavadas 3 vezes com PBS e colocadas em uma placa de Petri. As amígdalas foram posicionadas com a parte epitelial para cima e com a ajuda de uma lâmina de bisturi número 22 foi cortada horizontalmente uma fatia. A fatia superficial da tonsila palatina foi colocada em um tubo falcon de 50 ml contendo meio RPMI suplementado com 4% de antibióticos e antimicóticos e incubada na geladeira por 1 hora.

Após o período de incubação, utilizando uma nova placa de Petri e uma nova lâmina de bisturi número 22, a fatia de amígdala foi repartida em pequenos pedaços de até 5mm que foram randomicamente distribuídos em placas de 6 poços de acordo com o delineamento experimental. Em cada poço contendo os pedaços de tecido foi acrescentado 1,5 ml de meio de cultura RPMI suplementado com 4% de antibióticos e antimicóticos, quantidade que foi observada a disposição de contato meio de cultura e ar dos tecidos. A placa de cultura contendo os tecidos e o meio de cultura é incubada overnight na estufa à temperatura de 37°C.

4.6 Vírus: Influenza A e SARS-Cov-2

Os vírus Influenza utilizados nas infecções do estudo são originários da linhagem A/Texas/36/1991(H1N1) (Tex/91), A/California/17/2009pdm(H1N1) (Cal/09). A propagação viral aconteceu em células MDCK (ATCC, CCL-34) utilizando meio de cultura DMEM suplementado com soro fetal bovino.

Os vírus SARS-CoV-2 utilizados nas infecções do estudo são da cepa SARS-CoV-2 Brazil/SPBR-02/2020 e foram isolados a partir de amostras clínicas de pacientes com diagnóstico comprovado de COVID-19. Os vírus foram propagados em células Vero (ATCC, CCL-81) utilizando meio de cultura DMEM suplementado com soro fetal bovino.

4.7 Infecção

Após incubação em estufa por pelo menos 24 horas os explantes foram infectados. Para cada delineamento experimental envolvendo ambos os vírus Influenza A e SARS-CoV-2 se tem pelo menos uma condição de mock, que utiliza apenas meio de cultura RPMI suplementado com antibióticos e antimicóticos, uma condição com vírus inativado pela exposição em câmara de luz ultravioleta por 1 hora e uma condição contendo o vírus vivo titulado em pelo menos 1.10^5 .

As placas de cultura contendo os tecidos foram retiradas da estufa e o meio de cada poço foi descartado. Para cada condição (mock, vírus inativado por UV e vírus) foi inoculado 10 μ l sobre o pedaço de tecido. As placas voltam a estufa a 37°C e aguardam incubação por 15 minutos. Após o período de incubação, foi adicionado 1,5ml de meio de cultura RPMI suplementado com antibióticos e antimicóticos e a placa retornou a estufa aguardando as coletas seguindo cada cronograma. Para as condições experimentais de longa incubação, o meio de cultura foi trocado pelo menos a cada 3 dias.

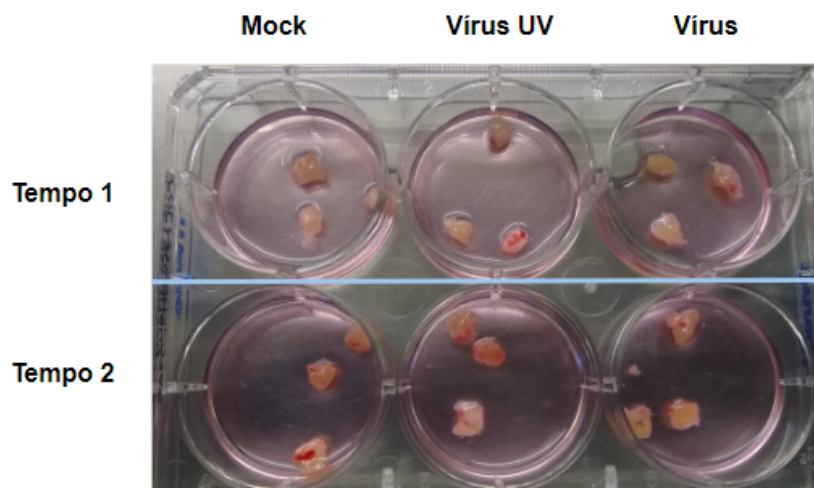


Figura 7. Representação dos poços do delineamento experimental. Em cada placa de 6 poços há dois tempos de coleta distintos (Entre 48 horas, 72 horas, 7 dias e 10 dias) e 3 condições diferentes: Mock, vírus inativado por luz ultravioleta e vírus vivo.

4.8 Coletas

Nos tempos determinados de cada delineamento experimental, que variaram entre 48 horas, 72 horas, 7 dias e 10 dias, foram feitas as coletas de tecido e/ou do sobrenadante. Cada coleta segue seu delineamento experimental e houve variações de reagentes entre elas onde o explante pode ter sido armazenado.

No caso dos tecidos houve o armazenamento em: 750µl de TRIzol para extração de RNA seguindo protocolo do fabricante; 1 ml em solução Carnoy para imunohistoquímica; 500µl em VTM para titulação viral; e 500µl em RNAlater para extração de RNA em kit.

Para o sobrenadante houve a coleta de 1 ml de cada poço e a centrifugação em 1200 rpm por 10 minutos para retirada de eventuais pedaços de tecido e células presentes no meio. Após centrifugação foi armazenado 250µl do sobrenadante em 750µl de TRIzol para extração de RNA, 500µl do sobrenadante em 500µl de VTM para titulação e 100µl do próprio sobrenadante para eventuais experimentos de citometria.

Para cada coleta de tecido, exceto as coletas em solução Carnoy, foi necessário a maceração utilizando beads de metal colocadas no tubo e o equipamento TissueLyser LT (Qiagen, Alemanha) na frequência de 50 Hz por 10

minutos. Após a maceração o conteúdo foi transferido para um novo tubo eppendorf, seguindo o protocolo determinado.

4.9 Imunohistoquímica

O protocolo de imunohistoquímica (IHQ) das quais as amostras conservadas em solução Carnoy passaram seguiu passos empíricos do laboratório. Inicialmente se descartou as soluções conservadoras e os tecidos foram colocados em suportes específicos para os próximos passos. Os tecidos passaram por sequência alcoólica em etanol 100% por 3 vezes de 1 hora cada. Em seguida, os tecidos passaram por banhos de xilol acrescentado de álcool por 20 minutos, xilol em 3 sequências de 30 minutos, banho de parafina I por 2 horas e banho de parafina II por 2 horas. As amostras foram emblocadas em parafina e os blocos subsequentes foram cortados com micrótomo. Os cortes histológicos foram colocados em banho-maria próprio para histologia e em seguida coletados em lâminas em uma disposição de pelo menos 2 cortes por lâmina.

Na desparafinização das lâminas as mesmas permaneceram na estufa seca aquecida em 60 °C por aproximadamente 40 minutos para que a parafina pudesse derreter. Em seguida, houve uma sequência de banhos para hidratação utilizando xilol por 3 vezes de 10 minutos cada no interior da capela bioquímica. A próxima etapa seguiu a hidratação alcóolica em uma série de incubações em concentrações decrescentes de etanol (100%, 95%, 90%, 80%, 70%, 50%) por 5 minutos cada.

As lâminas passaram por etapa de desmascaramento antigênico pela imersão em solução contendo ácido cítrico e citrato de sódio seguida de aquecimento em microondas por 5 minutos na potência máxima e 10 minutos na potência mínima.

A etapa de bloqueio da peroxidase endógena ocorreu pela incubação das lâminas em solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3% por 20 minutos em câmara protegida da luz.

Os cortes histológicos foram demarcados com o auxílio de caneta hidrofóbica. As lâminas foram submetidas ao bloqueio de sítios inespecíficos pela deposição direta sobre o corte histológico de solução SuperBlock™ (PBS) Blocking Buffer (Thermo Fisher, EUA) e incubação por 15 minutos em câmara úmida protegida da luz.

O excesso da solução foi retirado e adicionou-se o anticorpo primário. Para as condições envolvendo marcações do vírus Influenza A utilizou-se o anticorpo primário monoclonal de camundongo anti-nucleoproteína (ab128193, Abcam) com diluição de 1:300 em solução diluente de anticorpos (0,1g de BSA em 10 ml de PBS com adição de 10µl de Triton 10x). Para condições envolvendo marcações do vírus SARS-CoV-2 foi utilizado o anticorpo primário policlonal de coelho anti nucleocapsídeo (CABT-CS024, Creative Diagnostics, NY, USA) com diluição de 1:1000 também em solução diluente de anticorpos. Após a deposição direta dos respectivos anticorpos primários nos cortes histológicos as lâminas passaram por incubação durante a noite em câmara úmida na geladeira.

Em ambas as condições após a deposição direta dos respectivos anticorpos secundários houve a incubação por 1 hora seguida de 3 lavagens com solução de PBS por 3 minutos cada, protegendo as lâminas da luz.

A próxima etapa do experimento envolve a amplificação do sinal secundário pela incubação dos cortes histológicos em estreptavidina conjugada com peroxidase diluída em solução diluente em 1:300 por 30 minutos.

Ainda dentro do mesmo protocolo em alguns dos explantes usou-se anticorpos secundários conjugados que basicamente uniram as duas etapas do protocolo padrão: a marcação do anticorpo secundário e a amplificação de sinal com a estreptavidina conjugada com peroxidase. Isso acontece justamente por conta da disposição do reagente que une o anticorpo secundário com a biotina e a estreptavidina. Desse modo, nesses explantes pulou-se as duas etapas e seguindo o anticorpo primário veio o reagente e em seguida a revelação das marcações com o kit de substrato AEC. Para condições com vírus Influenza A, onde o anticorpo primário foi feito em camundongo, o anticorpo secundário conjugado foi IgG anti-camundongo feito em cabra (H+L) HRP (62-6520, Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, EUA). Para condições com vírus SARS-CoV-2, onde o anticorpo primário foi feito em coelho, o secundário utilizado foi IgG anti-coelho feito em cabra (H+L) HRP (31460, Thermo Fisher, Waltham, Massachusetts, EUA).

A revelação das marcações com o kit de substrato AEC (SK-4200, Vector Laboratories) aconteceu pela incubação variável de 10 a 30 minutos até a formação de coloração vermelha nos cortes.

Por fim, a última etapa consistiu na contracoloração dos cortes histológicos por imersão das lâminas durante 1 minuto em Hematoxilina de Harris filtrada,

seguida de lavagem por 30 segundos em água destilada e lavagem em água corrente. As lâminas foram montadas usando fluido de montagem aquoso (70% de glicerol em PBS) e lamínulas.

4.10 Quantificação ACE-2

Para a quantificação do genoma referente a enzima ACE-2 foram utilizados mastermix com primer forward e primer reverse específicos e exemplificados em anexo. A enzima utilizada foi SYBR Green (Sigma Aldrich, EUA). A ciclagem utilizada seguiu os parâmetros da Tabela 2. As amostras contaram com controle endógeno GAPDH nas mesmas condições. Para cada amostra de cDNA das condições experimentais foram feitas triplicatas.

Holding Stage		
95°C por 2 minutos		
Cycling Stage		
95°C por 5 segundos	60°C por 30 segundos	40 ciclos
Melt Curve Stage		
95°C por 15 segundos	60°C por 1 minuto	95°C por 15 segundos

Tabela 2. Ciclagem da quantificação de ACE-2 utilizando PCR em tempo real.

4.11 Quantificação absoluta de carga viral

A quantificação absoluta da carga viral nos pedaços de tecido das condições mock, vírus inativado por luz ultravioleta e vírus vivo foi feita utilizando a técnica de PCR em tempo real com curva de plasmídeo.

Para os explantes de vírus Influenza A foi utilizado o cDNA de cada condição experimental advindo da etapa de transcrição reversa em triplicatas. Na reação foi utilizada a enzima Taqman Universal (Applied Biosystem, EUA), primers forward e reverse descritos em anexo assim como a sonda e água ultrapura. Como controle foi utilizada água ultrapura. A curva de plasmídeo contou com 6 pontos diluídos de 1:10 em série com água ultrapura. O primeiro ponto da curva foi quantificado com o

NanoDrop Lite (Thermo Scientific™) e o valor de resultado foi submetido a um cálculo baseado na multiplicação por $2,85 \cdot 10^8$.

Para os explantes envolvendo a infecção pelo vírus SARS-Cov-2 a reação contou com a enzima GoTaq (Promega, EUA), primers forward e reverse bem como sonda e água ultrapura. Das amostras de cada condição experimental foi utilizada triplicata do cDNA advindo da etapa de transcrição reversa. Para a curva de plasmídeo foram utilizados 7 pontos diluídos 1:10 em série com água ultrapura. O primeiro ponto da curva passou por quantificação utilizando o equipamento NanoDrop Lite (Thermo Scientific™) e o valor resultante foi submetido a um cálculo baseado na multiplicação por $2,3822 \cdot 10^8$.

A quantificação de ambos os vírus teve como controle endógeno os genes de RNase P. Nesse caso foi utilizado master mix específico com mistura de primers e sonda, descritos em anexo, e a mesma enzima utilizada para o vírus em questão. Também para a curva de plasmídeo de RNase P foram utilizados 7 pontos diluídos em água ultrapura em 1:10 de forma sequencial. A quantificação do primeiro ponto da curva de plasmídeo de RNaseP teve e o cálculo baseado na ferramenta Science Primer (<http://www.scienceprimer.com/copy-number-calculator-for-realtime-pcr>).

4.12 Quantificação de citocinas

Para a quantificação das citocinas produzidas e liberadas no sobrenadante das culturas de células infectadas pelo vírus SARS CoV-2 foi utilizado o BD™ Cytometric Bead Array (CBA) Human Th1/Th2/Th17 Cytokine Kit. Em resumo, esse kit promove a captura de analitos solúveis através de beads fluorescentes e com tamanhos conhecidos, que são detectadas por citometria de fluxo. Cada bead é conjugada com um anticorpo específico, o qual é conjugado com Ficoeritrina (PE) e, fornece sinal fluorescente proporcional à quantidade de analito ligado. Após a incubação das beads com a amostra, formam-se complexos em sanduíche (bead + analito + reagente de detecção). Esses complexos podem ser mensurados por citometria para identificar partículas com fluorescência característica de ambos, tanto da bead como do detector. Seguindo as orientações fornecidas pelo fabricante, os sobrenadantes foram diluídos em PBS 1x na proporção de 1:2. Em um microtubo de 1,5 mL foi adicionado 50 µL do mix de beads de captura, 50 µL da diluição da amostra, 50 µL do reagente de detecção Human Th1/Th2/Th17 PE e os

tubos foram incubados durante 3 horas em temperatura ambiente e protegidos da luz. Todo o processo também é feito para os controles fornecidos no Kit, que para cada uma das citocinas analisadas formam uma curva padrão, permitindo assim a quantificação das citocinas presentes nas amostras testadas. Passado o período de incubação, a cada um dos tubos contendo amostras e controles, foi adicionado 1 mL de Wash Buffer, os tubos foram centrifugados a 200 x g durante 5 minutos e o sobrenadante aspirado cuidadosamente. O pellet resultante foi ressuspenso em 300 µL de Wash Buffer e imediatamente lido em citômetro de fluxo.

5. Resultados e Discussão

5.1 Pacientes e amostras

Ao todo foram utilizadas tonsilas de 6 pacientes para montagem das condições experimentais utilizando explantes. Destes pacientes 4 eram meninos e 2 eram meninas com idades de 3 a 8 anos. Não há documentação de um dos pacientes cuja tonsila foi utilizada no estudo. As amostras de amígdalas utilizadas no estudo foram testadas e mostraram-se negativas para influenza A e SARS-CoV-2 por RT-qPCR.

As quatro primeiras condições experimentais utilizando explantes foram feitas em material de cinco pacientes submetidos a tonsilectomia entre Junho e Outubro de 2021, momento em que os casos de COVID-19 ainda marcavam altas taxas. As últimas duas condições experimentais utilizando explantes foram derivadas de dois pacientes que fizeram a tonsilectomia no mês de Abril de 2022. Nesse período a Campanha Nacional de Vacinação contra COVID-19 já abrangia menores de idade, portanto estes dois pacientes já haviam recebido duas doses de vacina.

Número do explante	Data do processamento das amostras	Gênero do paciente	Idade do paciente	Vacinação contra COVID-19
1	22/06/2021	Masculino	3 anos	Não
		Feminino	5 anos	
2	Sem informações			
3	24/08/2021	Masculino	6 anos	Não
4	19/10/2021	Masculino	7 anos	Não
5	12/04/2022	Masculino	8 anos	Sim
6	19/04/2022	Feminino	8 anos	Sim (Duas doses de vacina Coronavac)

Tabela 3. Resumo dos pacientes e amostras

5.2 Quantificação de ACE-2

A fim de provar a presença homogênea do receptor ACE-2 nos explantes de tonsilas palatinas que passaram por condições experimentais envolvendo a infecção com vírus SARS-CoV-2, foi quantificado por PCR em tempo real a expressão da proteína nesses tecidos. O resultado do experimento sugere que, com base na condição sem infecção, tanto as condições com vírus inativado por luz ultravioleta, quanto a condição de infecção com vírus vivo detinham quantidades parecidas de ACE-2 em 48 horas, início do experimento e período de infecção aguda. Portanto, o vírus SARS-CoV-2 encontra permissividade para infecção nesses tecidos.

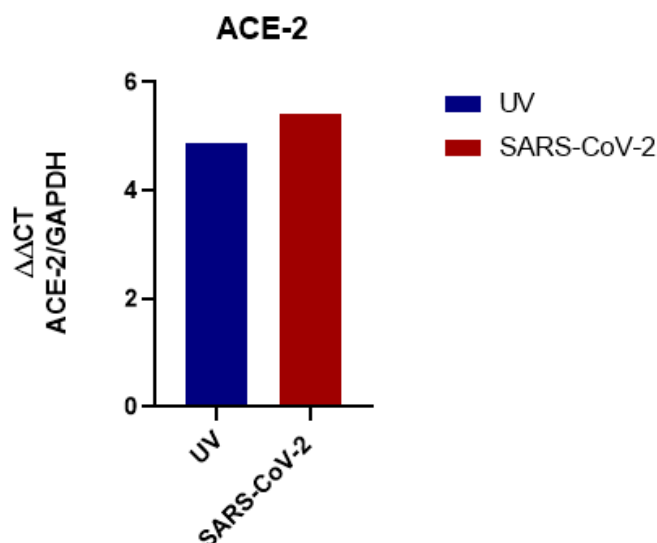


Figura 8. Quantificação da expressão de ACE2 em explantes. Comparação entre a quantificação da expressão de ACE2 entre vírus UV e vírus vivo.

5.3 Carga viral em explantes infectados com vírus SARS-CoV-2

A primeira quantificação de carga viral em experimentos usando explantes infectados com SARS-CoV-2 mostrou aumento considerável de cópias de genoma viral às 48 horas pós-infecção, comparado com explante inoculado com vírus inativado (Figura 9).

A quantificação da infecção *ex vivo* com vírus SARS-CoV-2 após 7 dias de infecção (Figura 10) revela que a carga viral se mantém em níveis parecidos com a quantificação às 48 horas.

Esses achados mostram que os explantes de tonsilas palatinas humanas são suscetíveis e permissivos à infecção pelo SARS-CoV-2, que produz progênie e permanece nos explantes por pelo menos 7 dias.

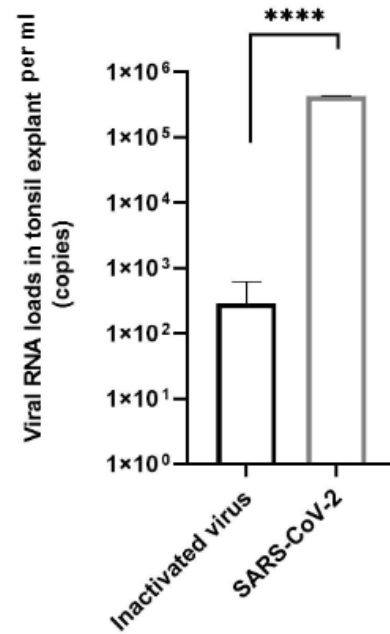


Figura 9. Quantificação de carga viral após a infecção de explantes com vírus SARS-CoV-2. Cópias de RNA viral por mL de tecido macerado, comparando condições experimentais com vírus inativado por luz UV.

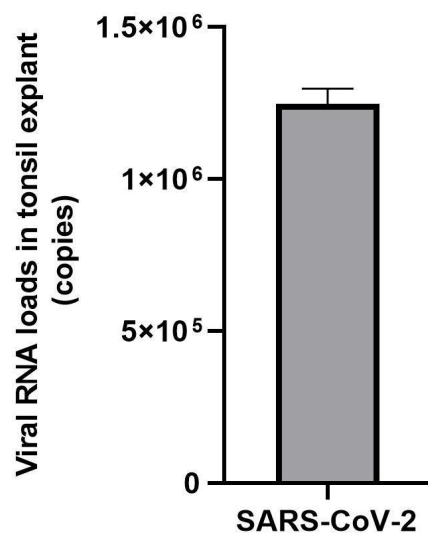


Figura 10. Quantificação de carga viral genômica em explantes 7 dias após infecção com vírus SARS-CoV-2.

5.4 Carga viral em explantes infectados com vírus influenza A.

A quantificação de carga viral genômica nos explantes infectados com vírus influenza A às 48 horas após a infecção mostrou resultado semelhante à infecção com SARS-CoV-2 (Figura 11).

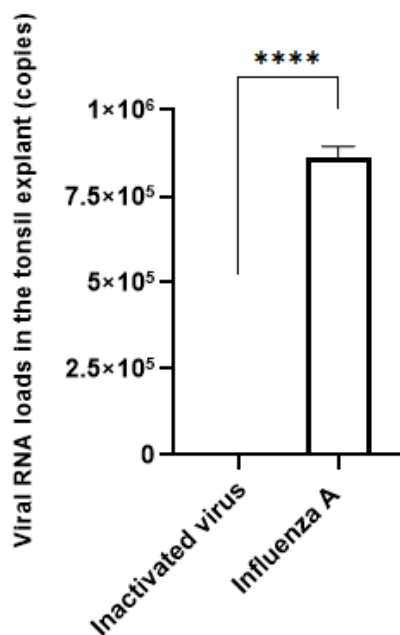


Figura 11. Quantificação de carga viral genômica em explantes às 48 horas após infecção com vírus influenza A.

A manutenção da infecção por vírus influenza A também parece ocorrer, como sugerido pela quantificação da carga viral 7 dias após a infecção, quando o número de cópias de RNA foi semelhante ao obtido às 48 horas (Figura 12).

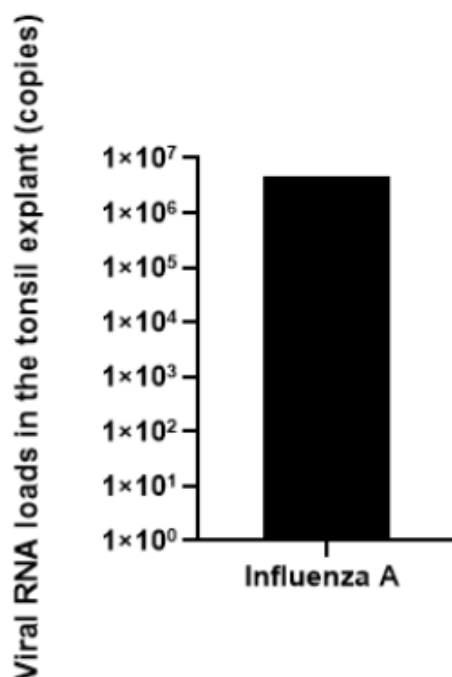


Figura 12. Quantificação de carga viral em explantes 7 dias após infecção com vírus Influenza A. Número de cópias de RNA viral por mL em explantes de tonsilas palatinas comparado à condição mock, 7 dias após a infecção com vírus Influenza A.

A quantificação de carga viral desses explantes com vírus respiratório Influenza A nestes dois períodos de tempo sugere que esses tecidos são suscetíveis e permissivos à infecção, que se mantém por pelo menos 7 dias.

5.5 Marcação de proteína viral nos cortes de explantes infectados.

Inicialmente, fizemos uma preparação histológica de explantes para evidenciar a presença de folículos linfóides nos mesmos (Figura 13).

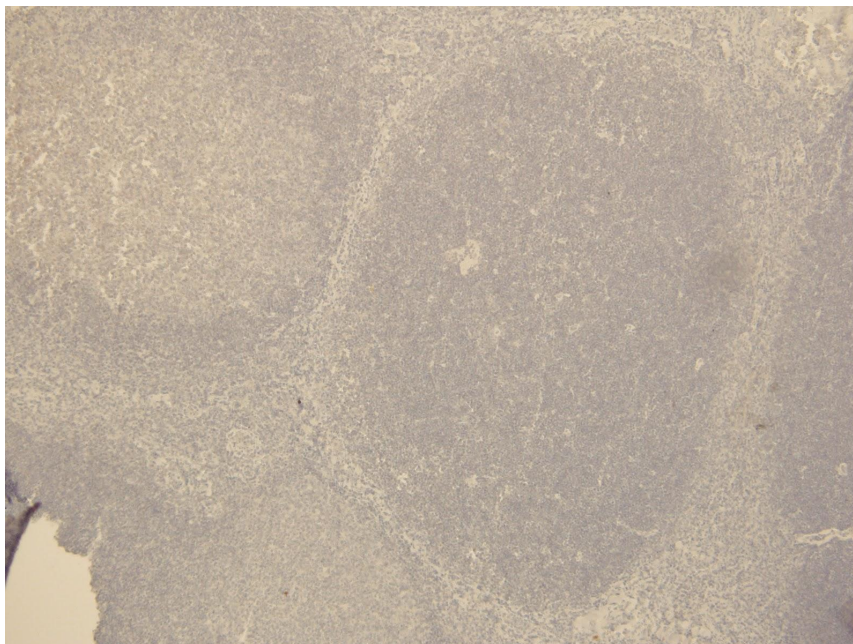


Figura 13. Folículo linfóide em explante de tonsila palatina. Evidência da presença de um folículo linfóide em explante não infectado. Aumento de 100x.

A marcação de antígenos virais nos explantes foi um grande desafio por algumas condições, como a padronização do tamanho dos tecidos, a preservação da integridade, necessidade de cuidadosa parafinização, e o tamanho reduzido dos cortes histológicos obtidos, o que pode interferir na representatividade de áreas infectadas. As imunohistoquímicas de cortes de explantes infectados por vírus influenza A não produziram ainda resultados representativos satisfatórios, e portanto não são mostrados neste trabalho.

A imunohistoquímica revelou a presença de antígeno viral de SARS-CoV-2 em explantes nos tempos de 48 horas.

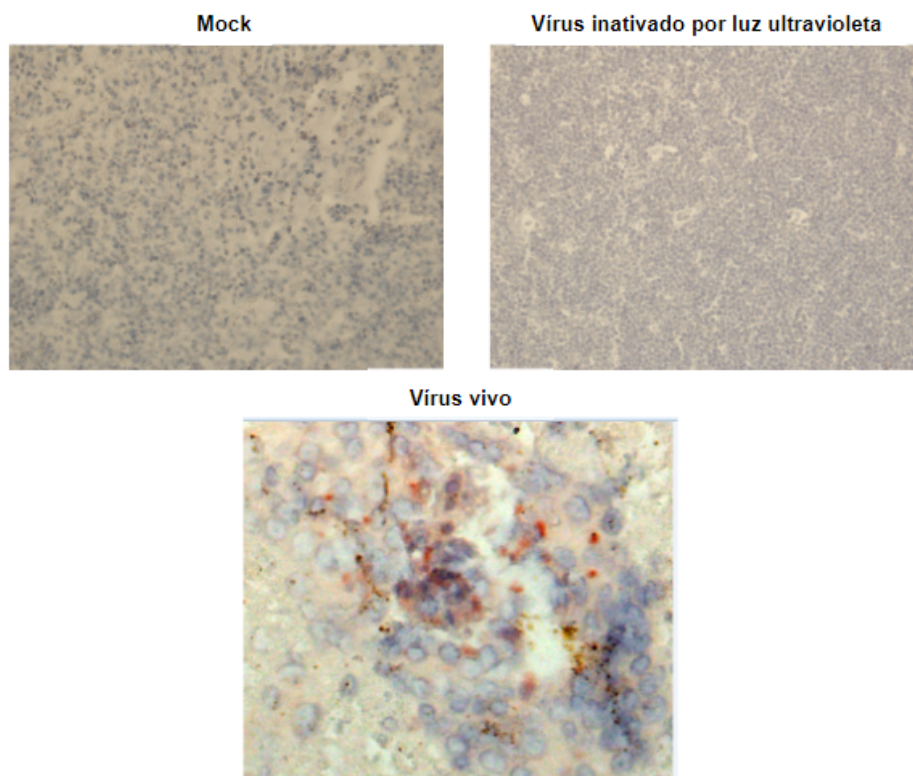
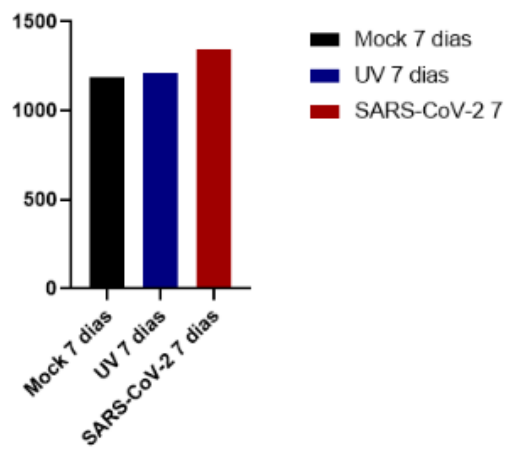
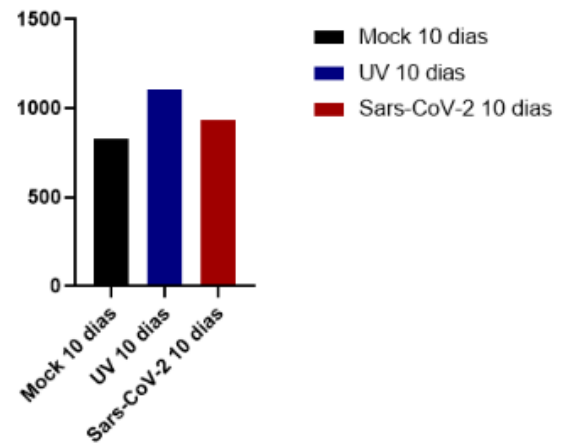


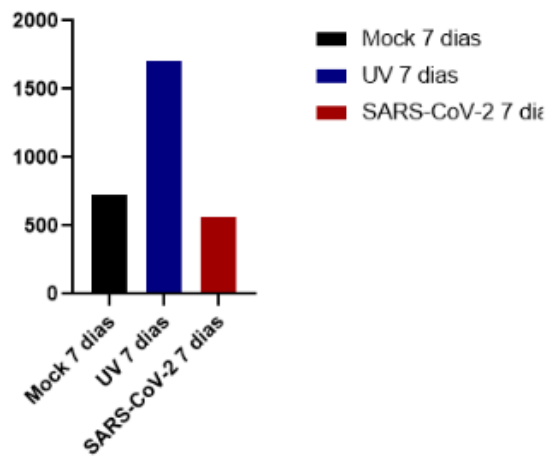
Figura 14. Marcação para nucleoproteína do vírus SARS-CoV-2 em explante às 48 horas pós-infecção. São mostrados cortes de explantes inoculados com mock, vírus inativado por UV, e estoque viável de SARS-CoV-2. (Aumento de 400x)

5.6 Quantificação absoluta de citocinas

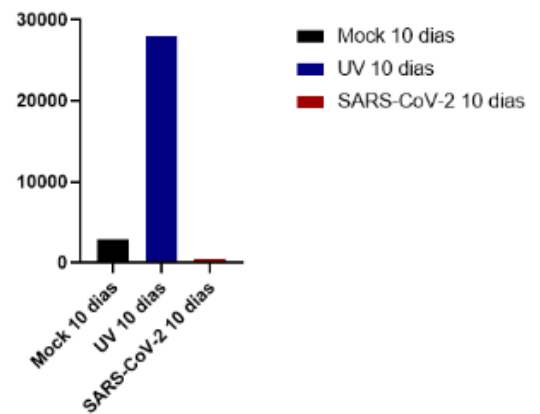
A quantificação absoluta de citocinas nos explantes infectados por vírus SARS-CoV-2 em tempos tardios mostra um padrão concordante com a literatura. Para interferon do tipo I, em 7 dias a quantificação mostra aumento comparado às condições controle. A citocina IL-10, entretanto, se mostra diminuída em ambos os tempos. A citocina IL-6 possui um aumento significativo em 10 dias pós infecção, enquanto a quantificação de TNF não mostra alterações significativas.

Quantificação absoluta de IFN- γ - 7 diasQuantificação absoluta de IFN- γ - 10 dias

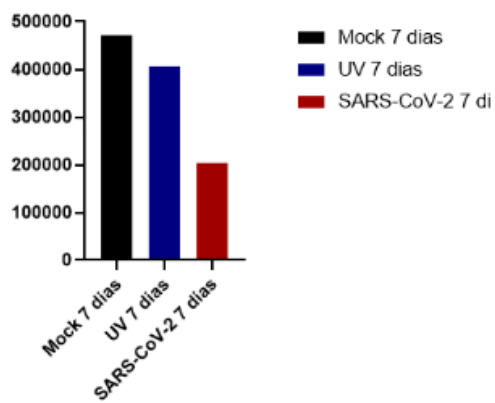
Quantificação absoluta de IL-10 - 7 dias



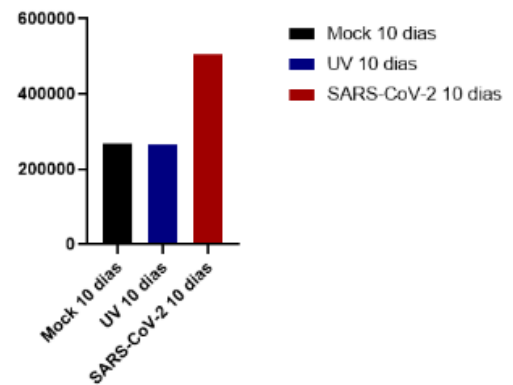
Quantificação absoluta de IL-10 - 10 dias



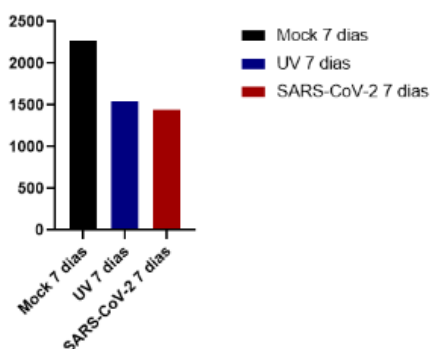
Quantificação absoluta - IL-6 em 7 dias pós infecção



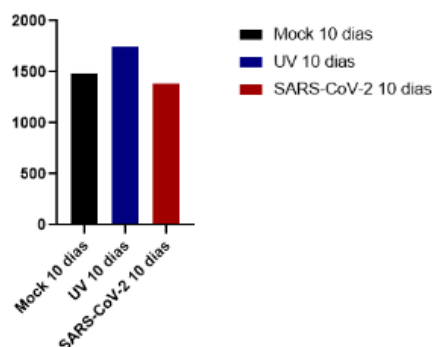
Quantificação absoluta - IL-6 em 10 dias pós infecção



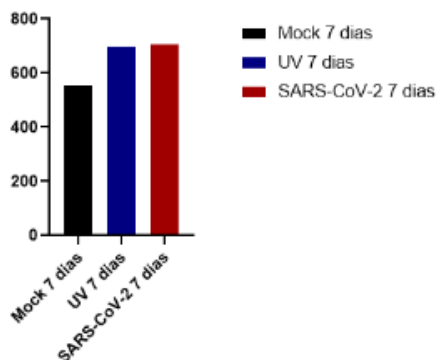
Quantificação absoluta de IL-2 - 7 dias após infecção



Quantificação absoluta de IL-2 - 10 dias após infecção



Quantificação absoluta TNF - 7 dias pós infecção



Quantificação absoluta TNF - 10 dias pós infecção

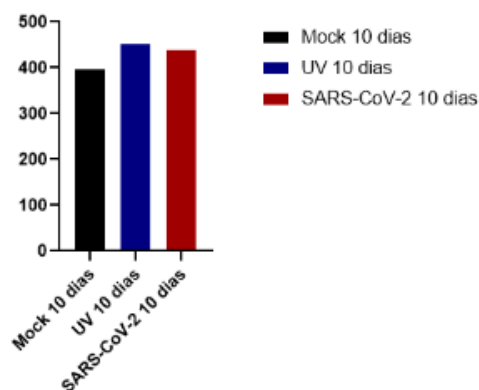


Figura 15. Quantificação absoluta de citocinas envolvidas na tempestade de citocinas.
Quantificação de citocinas no sobrenadante de infecções prolongadas por vírus SARS-CoV-2.

6. Conclusões

O trabalho em questão sugere que claramente as tonsilas palatinas humanas podem ser um sítio de infecção para ambos vírus respiratórios pandêmicos, Influenza A e SARS-CoV-2. Ainda, conclui-se que a metodologia de infecção *ex vivo* nesses tecidos representa de fato um modelo amplo para o estudo dessas infecções, já que há permissividade e replicação viral em pelo menos 10 dias pós infecção. Como perspectivas futuras de outros experimentos sustentados pela metodologia, pode-se ainda quantificar de forma final as citocinas e a expressão da proteína ACE-2 por Western Blotting. Pela viabilidade da metodologia, testes de inibidores ou drogas que interferem nas cascatas virais e imunológicas podem entrar como passo seguinte.

Referências bibliográficas

- Abdelrahman, Z., Li, M., & Wang, X. (2020). Comparative Review of SARS-CoV-2, SARS-CoV, MERS-CoV, and Influenza A Respiratory Viruses. *Frontiers in Immunology*, 11. doi:10.3389/fimmu.2020.552909
- Anush Arakelyan, Wendy Fitzgerald, Jean-Charles Grivel, Christophe Vanpouille, and Leonid Margolis Human histocultures (tissue explants) in retrovirology *Methods Mol Biol.* 2014; 1087: 233–248. doi: 10.1007/978-1-62703-670-2_19
- Brodsky, L. (1989). Modern Assessment of Tonsils and Adenoids. *Pediatric Clinics of North America*, 36(6), 1551–1569. doi:10.1016/s0031-3955(16)36806-7
- Castro, I. A., Jorge, D. M. M., Ferreri, L. M., Martins, R. B., Pontelli, M. C., Jesus, B. L. S., ... Arruda, E. (2020). Silent infection of B and CD8+T lymphocytes by influenza A virus in children with tonsillar hypertrophy. *Journal of Virology*. doi:10.1128/jvi.01969-19
- Costa, Ligia Maria Cantarino da, & Merchan-Hamann, Edgar. (2016). Pandemias de influenza e a estrutura sanitária brasileira: breve histórico e caracterização dos cenários. *Revista Pan-Amazônica de Saúde*, 7(1), 11-25. <https://dx.doi.org/10.5123/s2176-62232016000100002>
- De Arruda, E., Mifflin, T. E., Gwaltney, J. M., Winther, B., & Hayden, F. G. (1991). Localization of rhinovirus replication in vitro with in situ hybridization. *Journal of Medical Virology*, 34(1), 38–44. doi:10.1002/jmv.1890340107
- Duarte, MP. COVID-19: Origem do novo coronavirus/ *Brazilian Journal of health Review* Braz. J. Hea. Rev., Curitiba, v. 3, n. 2, p.3585-3590mar./apr. 2020. ISSN 2595-6825
- Ferguson, M., Aydin, M., & Mickel, J. (2014). Halitosis and the Tonsils. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 151(4), 567–574. doi:10.1177/0194599814544881
- Gomes Marques, M.L. (2019) Anel de Waldeyer: sua Função e Impacto da Adenoamigdalectomia
- Gotoh, K., Ito, Y., Maruo, S., Takada, K., Mizuno, T., Teranishi, M., ... Kimura, H. (2011). Replication of Epstein-Barr Virus Primary Infection in Human Tonsil Tissue Explants. *PLoS ONE*, 6(10), e25490. doi:10.1371/journal.pone.0025490
- Grivel, J.-C., & Margolis, L. (2009). Use of human tissue explants to study human infectious agents. *Nature Protocols*, 4(2), 256–269. doi:10.1038/nprot.2008.245
- Guo Y, Hu K, Li Y, Lu C, Ling K, Cai C, Wang W, Ye D. Targeting TNF- α for COVID-19: Recent Advanced and Controversies. *Front Public Health*. 2022 Feb 11;10:833967. doi: 10.3389/fpubh.2022.833967.
- Hasanvand A. COVID-19 and the role of cytokines in this disease. *Inflammopharmacology*. 2022 Jun;30(3):789-798. doi: 10.1007/s10787-022-00992-2.
- <https://mol.icb.usp.br/index.php/12-31-orgaos-linfoides/> Acesso em 06/07/2022 às 00:28
- <https://ufcspa.edu.br/disciplinas/histologia/histologia-sistemas/sistema-linfoide/tonsila-palatina> Acesso em 06/07/2022 às 01:21
- <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2020.08.06.239574v1> Acesso em 06/07/2022 às 02:18
- Hu, B., Guo, H., Zhou, P. et al. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. *Nat Rev Microbiol* 19, 141–154 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>

Hutchinson, E. C. (2018). Influenza Virus. *Trends in Microbiology*, 26(9), 809–810. doi:10.1016/j.tim.2018.05.013

Introini, A., Fitzgerald, W., Vanpouille, C., & Margolis, L. (2018). Histoculture and Infection with HIV of Functional Human Lymphoid Tissue on Gelfoam®. *Methods in Molecular Biology*, 187–197. doi:10.1007/978-1-4939-7745-1_17

Jones, S. Viral persistence: IL-10 is the key. *Nat Rev Microbiol* 4, 879 (2006). <https://doi.org/10.1038/nrmicro1560>

Katze, M., He, Y. & Gale, M. Viruses and interferon: a fight for supremacy. *Nat Rev Immunol* 2, 675–687 (2002). <https://doi.org/10.1038/nri888>

Kawaoka, Y., & Neumann, G. (2012). Influenza Viruses: An Introduction. *Influenza Virus*, 1–9. doi:10.1007/978-1-61779-621-0_1

Khalil OAK, Khalil SS. SARS-CoV-2:Taxonomia, Origem e Constituição /. *Rev Med (São Paulo)*. 2020 set.-out.;99(5):473-9.

Killip MJ, Fodor E, Randall RE. Influenza virus activation of the interferon system. *Virus Res*. 2015;209:11-22. doi:10.1016/j.virusres.2015.02.003

Krammer, F., Smith, G.J.D., Fouchier, R.A.M. et al. Influenza. *Nat Rev Dis Primers* 4, 3 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0002-y>

Lamers, M.M., Haagmans, B.L. SARS-CoV-2 pathogenesis. *Nat Rev Microbiol* 20, 270–284 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00713-0>

Marmitt NRF, Souza JEP, Andrade Jr. P, Angeletti P, Silva PR. (2008).

McFee, R. B. (2020). SARS2 HUMAN CORONAVIRUS COVID-19 (COVID-19). *Disease-a-Month*, 101063. doi:10.1016/j.disamonth.2020.101063

Murphy-Schafer AR, Paust S. Divergent Mast Cell Responses Modulate Antiviral Immunity During Influenza Virus Infection. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021 Feb 19;11:580679. doi: 10.3389/fcimb.2021.580679.

Nave, H., Gebert, A., & Pabst, R. (2001). Morphology and immunology of the human palatine tonsil. *Anatomy and Embryology*, 204(5), 367–373. doi:10.1007/s004290100210

Pabst, R. (2007). Plasticity and heterogeneity of lymphoid organs. *Immunology Letters*, 112(1), 1–8. doi:10.1016/j.imlet.2007.06.009

Perry, M., & Whyte, A. (1998). Immunology of the tonsils. *Immunology Today*, 19(9), 414–421. doi:10.1016/s0167-5699(98)01307-3

Piret J and Boivin G (2021) Pandemics Throughout History. *Front. Microbiol*. 11:631736. doi: 10.3389/fmicb.2020.631736

Pleschka, S. (2012). Overview of Influenza Viruses. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 1–20. doi:10.1007/82_2012_272

Proenca-Modena, J. L., Pereira Valera, F. C., Jacob, M. G., Buzatto, G. P., Saturno, T. H., Lopes, L., ... Anselmo-Lima, W. T. (2012). High Rates of Detection of Respiratory Viruses in Tonsillar Tissues from Children with Chronic Adenotonsillar Disease. *PLoS ONE*, 7(8), e42136. doi:10.1371/journal.pone.0042136

Rojas JM, Avia M, Martín V, Sevilla N. IL-10: A Multifunctional Cytokine in Viral Infections. *J Immunol Res*. 2017;2017:6104054. doi: 10.1155/2017/6104054.

Roychoudhury S, Das A, Sengupta P, Dutta S, Roychoudhury S, Choudhury AP, Ahmed ABF, Bhattacharjee S, Slama P. Viral Pandemics of the Last Four Decades: Pathophysiology, Health Impacts and Perspectives. *Int J Environ Res Public Health*. 2020 Dec 15;17(24):9411. doi: 10.3390/ijerph17249411.

Sun J, Madan R, Karp CL, Braciale TJ. Effector T cells control lung inflammation during acute influenza virus infection by producing IL-10. *Nat Med*. 2009 Mar;15(3):277-84. doi: 10.1038/nm.1929.

Swati, Rishi P, Chadha VD. Understanding the Epigenetic Mechanisms in SARS CoV-2 Infection and Potential Therapeutic Approaches. *Virus Res*. 2022 Jun 28;198853. doi: 10.1016/j.virusres.2022.198853.

Tan, G & Stalling, Melissa & Al-Rawabdeh, S & Kahwash, B & Alkhoury, R & Kahwash, Samir. (2018). The spectrum of pathological findings of tonsils in children: A clinicopathological review. *The Malaysian journal of pathology*. 40. 11-26.

V'kovski, P., Kratzel, A., Steiner, S. et al. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. *Nat Rev Microbiol* 19, 155–170 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00468-6>

Virologia Humana - 3^a Ed. (2015) Wigg, Marcia Dutra, Santos, Norma Suely de Oliveira, Romanos, Maria Teresa Villela. Guanabara Saúde Didático.

Wang MY, Zhao R, Gao LJ, Gao XF, Wang DP, Cao JM. SARS-CoV-2: Structure, Biology, and Structure-Based Therapeutics Development. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020 Nov 25;10:587269. doi: 10.3389/fcimb.2020.587269.

Wu, W., & Metcalf, J. P. The Role of Type I IFNs in Influenza: Antiviral Superheroes or Immunopathogenic Villains? *Journal of Innate Immunity*, 1–11.(2020) doi:10.1159/000508379

Ying-Shuang Li, Hua-Cheng Ren, Jian-Hua Cao. Roles of Interleukin-6-mediated immunometabolic reprogramming in COVID-19 and other viral infection-associated diseases. *International Immunopharmacology*, Volume 110. 2022. 109005
<https://doi.org/10.1016/j.intimp.2022.109005>

Anexos

Anexo 1. Sequência de primers e sonda de PCR em tempo real para Influenza A.

Influenza A			
<i>Primer sentido Forward</i>	<i>Primer sentido Reverse</i>	<i>Sonda</i>	<i>Alvo</i>
GACCRATCCTGT CACCTCTGAC	AGGGCATTYTGG ACAAAKCGTCTA	FAM/TGCAGTCC TCGCTCACTGGG CACG/BHQ1	Gene M (Segmento 7)

Anexo 2. Sequência de primers de PCR em tempo real para quantificação do gene endógeno RNase P.

RNase P		
<i>Primer sentido Forward</i>	<i>Primer sentido Reverse</i>	<i>Sonda</i>
AGA TTT GGA CCT GCG AGC	GAG CGG CTG TCT CCA CAA GT	TTC TGA CCT GAA GGC TCT GCG CGC

Anexo 3. Sequência de primers de PCR em tempo real para quantificação do gene endógeno ACE-2.

ACE-2	
<i>Primer sentido Forward</i>	<i>Primer sentido Reverse</i>
CGTCTGAATGACAACAGCCTAGA	AATGCCAACCACACTATCACTCCC

Anexo 4. Sequência de primers de PCR em tempo real para quantificação do gene endógeno GAPDH.

GAPDH	
<i>Primer sentido Forward</i>	<i>Primer sentido Reverse</i>

GCA CCG TCAAGG CTG AGAAC	GCC TTC TCC ATG GTG GTG AA
--------------------------	----------------------------