

Ana Filipa Maia Rodrigues

# Influência de Polimorfismos em Genes do Sistema Imunológico na Infecção por Rinovirus

Faculdade Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2019



Ana Filipa Maia Rodrigues

# Influência de Polimorfismos em Genes do Sistema Imunológico na Infecção por Rinovirus

Faculdade Ciências da Saúde

Universidade Fernando Pessoa

Porto, 2019

Influência de Polimorfismos em Genes do Sistema Imunológico na Infecção por  
Rinovirus

---

Ana Filipa Maia Rodrigues

(assinatura)

Trabalho apresentado à Universidade  
Fernando Pessoa como parte dos requisitos  
para obtenção de grau de Mestre em  
Ciências Farmacêuticas.

## **Resumo**

O Rinovírus Humano é um vírus de pequena dimensão que pertence à família *Picornaviridae*, sendo conhecidos neste momento mais de 160 serótipos e 3 espécies (A, B e C). Este vírus caracteriza-se por ter elevado tropismo para as células epiteliais das vias aéreas e por isso é um dos principais responsáveis pelas infeções do trato respiratório superior e também inferior. Em indivíduos saudáveis uma infeção por Rinovírus não acarreta grandes complicações, no entanto em crianças, idosos, indivíduos imunocomprometidos ou com condições respiratórias crónicas pode ser fatal. Não existe até ao momento nenhum tratamento para além do sintomático, o que pode ser um problema nas infeções severas.

No presente estudo, a presença de Rinovírus nas narinas de voluntários saudáveis da Universidade Fernando Pessoa foi testada durante um ano e em simultâneo identificaram-se polimorfismos genéticos dos mesmos relacionados com o Sistema Imunitário (TOLLIP rs5743899, IL6 rs18000795, IL1B rs16944 e TNFA rs1800629), tipados por PCR-RFLP, que poderiam influenciar a infeção por Rinovírus.

Os resultados obtidos foram particularmente interessantes a nível dos genes TOLLIP e IL6. Verificou-se que o alelo G do TOLLIP aumenta a probabilidade de resultados negativos para Rinovírus ao longo de todo o ano, no entanto, ao avaliar indivíduos sem o alelo G do TOLLIP, verificou-se que há maior título viral em indivíduos que não possuem o alelo C do IL6.

Este estudo permitiu assim concluir que existem polimorfismos em pelo menos dois genes do Sistema Imunológico que influenciam a suscetibilidade à infeção por Rinovírus.

**Palavras-chave:** Rinovírus, doenças respiratórias, polimorfismos, suscetibilidade viral

**Abstract**

Human Rhinovirus is a small virus that belong to the family *Picornaviridae* with more than 160 serotypes and 3 species (A, B e C). This virus is characterized by an high tropism for the epithelial cells of the airways making it one the major causes of upper and lower respiratory tract infections. In healthy individuals, a Rhinovirus infection doesn't result in major complications, however in children, elders, immunocompromised individuals or those with chronic respiratory conditions can be fatal. There is as yet no treatment beyond the symptomatic which can be a problem for severe infection cases.

In the present study, rhinovirus presence in the nostrils of healthy volunteers of Fernando Pessoa University was monthly tested for a year and correlated to Immune system related genetic polymorphisms (TOLLIP rs5743899, IL6 rs18000795, IL1B rs16944 e TNFA rs1800629), typed by PCR-RFLP.

The results were particularly interesting for TOLLIP and IL6 genes. It was found that the G allele of TOLLIP increases the likelihood of year-long negative results for Rhinovirus. Additionally, when evaluating individuals without the TOLLIP G allele, viral titres were higher among individuals without the IL6 C allele.

In conclusion, the present study identified two genetic polymorphisms that mediate the individual susceptibility to Rhinovirus infection.

**Key words:** Rhinovirus, respiratory diseases, polimorphisms, viral susceptibility

“Recomeça... se puderes  
sem angústia e sem pressa  
E os passos que deres,  
nesse caminho duro do futuro,  
dá-os em liberdade.  
Enquanto não alcançares não descanses,  
de nenhuma fruta queiras só metade...”  
Miguel Torga

## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar quero agradecer a todos os voluntários e à Dra. Carita Savolainen-Kopra do Instituto Nacional de Saúde e Assistência Social, sem eles não seria possível a concretização deste projeto.

Um agradecimento em especial ao meu orientador, Professor Doutor José Cabeda, por toda a dedicação e entrega a este projeto de investigação e também por todo o auxílio, disponibilidade e paciência ao longo destes anos. É um gosto trabalhar ao lado daqueles que mais sabem.

As minhas colegas Ana e Mafalda, obrigada pelo companheirismo e ajuda prestada tanto em laboratório como fora dele.

E como não poderia deixar de ser quero agradecer aos meus pais e ao meu namorado por confiarem em mim, por me apoiarem constantemente e por me motivarem a concretizar este trabalho.

## Índice

I. Introdução.....	1
II. Desenvolvimento .....	2
1. Vírus .....	2
2. O Rinovirus .....	3
2.1. Caracterização .....	3
2.2. Variabilidade genética .....	5
2.2.1. As espécies de Rinovirus A, B e C.....	6
2.2.2. Mutações virais e recombinação genética .....	9
2.3. Ciclo de infecções por Rinovirus .....	11
2.3.1. Transmissão .....	11
2.3.2. Recetores virais.....	13
2.3.3. Tropismo.....	15
2.3.4. O ciclo da infecção .....	17
2.4. Tratamento.....	19
2.5. Patofisiologia da infecção por Rinovirus .....	22
2.5.1. Constipação .....	24
2.5.2. Potencial de patologias graves.....	25
2.5.2.1. RHV e asma.....	25
2.5.2.2. RHV e DPOC .....	31
2.5.2.3. RHV e fibrose cística.....	31
2.5.2.4. RHV e pneumonia .....	32
2.5.2.5. RHV em crianças e imunodeprimidos.....	32
2.5.2.6. RHV e bronquiolite .....	34
3. Resposta imunológica à infecção viral.....	34

3.1. Resposta inata e os TLR .....	36
3.2. Polimorfismos em genes do Sistema Imunológico.....	39
4. Diagnóstico laboratorial .....	43
4.1. Colheita e processamento das espécies .....	43
4.2. Culturas de vírus.....	44
4.3. Métodos moleculares.....	45
4.3.1. Técnicas de Amplificação de Ácidos Nucleicos .....	47
4.3.1.1. RT-PCR.....	48
4.4. Sequenciação e genotipagem.....	49
4.5. Genotipagem com enzimas de restrição .....	53
4.5.1. Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Limitação .....	53
5. Material e métodos .....	53
5.1. Voluntários .....	53
5.2. Controlos .....	54
5.3. Extração de RNA viral a partir de zaragatoas nasais.....	54
5.4. Detecção e quantificação do RNA viral.....	55
5.5. Extração de DNA a partir do sangue ou de células epiteliais da boca .....	56
5.6. Detecção de SNP's por PCR-RFLP .....	56
5.6.1. IL6 (rs1800795).....	56
5.6.2. TOLLIP (rs5743899).....	57
5.6.3. IL1B (rs16944) .....	58
5.6.4. TNFA (rs1800629) .....	58
6. Resultados.....	59
6.1. Detecção de RHV nas amostras dos voluntários.....	59
6.2. Influência de polimorfismos genéticos na detecção de RHV.....	61
7. Discussão .....	63

*Influência de Polimorfismos em Genes do S.I. na Infecção por Rinovirus*

III. Conclusão .....	66
IV. Bibliografia.....	67
Anexos.....	80

## **Índice de Figuras**

Figura 1- Possíveis mecanismos de entrada e descapsulação do RHV em células epiteliais nasais ciliadas.....	pag.13
Figura 2- Árvore filogenética de todos os serotipos conhecidos de RHV até 2009....	pag.51
Figura 3- Frequência de amostras de zaragatoas nasais positivas versus título de RNA de RHV nasal.....	pag.60
Figura 4- Resultados finais obtidos na identificação de SNP no gene IL6.....	pag.61
Figura 5- Resultados finais obtidos na identificação de SNP no gene TOLLIP.....	pag.61
Figura 6- Resultados finais obtidos na identificação de SNP no gene IL1B.....	pag.62
Figura 7- Resultados finais obtidos na identificação de SNP no gene TNFA.....	pag.62
Figura 8- Indivíduos TOLLIP G+ apresentam maior frequência da ausência de RHV ao longo do ano.....	pag.63
Figura 9- Indivíduos IL6 C+ apresentam alta concentração de RHV se indivíduos TOLLIP G+ forem excluídos.....	pag.63
Figura 10- O TOLLIP influencia a resposta do sistema imunológico ao RHV antes da entrada na célula, enquanto que o IL6 influencia a depuração viral após a infecção.	pag.64

## **Índice de Tabelas**

Tabela 1- Cronologia do diagnóstico por DNA.....	pag.46
Tabela 2- Primers e sonda utilizados na detecção de RNA.....	pag.55
Tabela 3- Condições experimentais utilizadas na genotipagem do IL6.....	pag.57
Tabela 4- Condições experimentais utilizadas na genotipagem do TOLLIP.....	pag.57
Tabela 5- Condições experimentais utilizadas na genotipagem do IL1B.....	pag.58
Tabela 6- Condições experimentais utilizadas na genotipagem do TNFA.....	pag.59

## **Abreviaturas**

CCL- Ligando da quimiocina de motivo C-C (do inglês C-C motif chemokine Ligand)

CDHR3- Membro 3 da Família das Caderinas (do inglês Cadherin Related Family Member 3)

CXCL- Ligando de quimiocina de motivo C-X-C (do inglês C-X-C motif Chemokine ligand)

DNA- Ácido desoxirribonucleico (do inglês Deoxyribonucleic Acid)

DPOC- Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica

EMTU- Unidade Trófica Mesenquimal Epitelial (do inglês Epithelial Mesenchymal Trophic Unit)

FEV1- Volume Expiratório Forçado no primeiro segundo (do inglês Forced Expiratory Volume in the first second )

FVC- Capacidade Vital Forçada (do inglês Forced Vital Capacity)

HIV-Vírus da Imunodeficiência Humana (do inglês Human Immunodeficiency Virus)

ICAM-1- Molécula de adesão Intercelular-1 (do inglês Intercellular Adhesion Molecule-1)

IFN- Interferão

Ig- Imunoglobulina

IL- interleucina

IRF- Fatores Reguladores do Interferão (do inglês Interferon Regulatory Factors)

I<sup>S</sup>A-Índice de Associação

LE- Equilíbrio de Ligação (do inglês Linkage Equilibrium)

LDLR-Recetor de Lipoproteína de Baixa Densidade (do inglês Low Density Lipoprotein Receptor)

NF- Fator Nuclear (do inglês Nuclear Factor)

ORF- Janela de Leitura Ribossomal (do inglês Open Reading Frame)

PCR-Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês Polymerase Chain Reaction)

RFPL- Polimorfismo de Comprimento dos Fragmentos de Restrição (do inglês Restriction Fragment Length Polymorphism)

RHV- Rinovirus Humano (do inglês Human Rhinovirus)

RNA- Ácido Ribonucleico (do inglês Ribonucleic Acid)

RT-PCR- Transcrição Reversa seguida de Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)

SI- Sistema Imunológico

SNP- Polimorfismos de nucleótido único (do inglês Single Nucleotide Polymorphism)

TGF- $\beta$ - Fator de crescimento e transformação  $\beta$  (do inglês Transforming Growth Factor beta)

Th- Linfócito T auxiliar (do inglês T helper)

TLR- Recetor do Tipo Toll (do inglês Toll-Like Receptor)

TNF- $\alpha$ - Fator de necrose tumoral alfa (do inglês Tumor Necrosis Factor alfa)

UTR- Região não traduzida (do inglês Untranslated Region)

UV- Ultra Violeta

VPg- Proteína associada ao genoma Viral (do inglês Viral Protein genome-linked)

## **I. Introdução**

O Rinovírus Humano (RHV) é um vírus humano pertencente à família *Picornaviridae* com mais de 160 serótipos diferentes e 3 espécies (A, B e C). É um vírus com capacidade de infectar células epiteliais do trato respiratório superior e inferior através de recetores celulares (ICAM-1, LDLR ou CDHR3 dependendo das espécies). É um dos responsáveis pela maior parte das constipações, causando principalmente infeções ligeiras, auto-limitadas, subclínicas e assintomáticas, no entanto, não deve ser completamente desconsiderado pois leva a ausência escolar e laboral. Em crianças, idosos, indivíduos imunocomprometidos ou com condições respiratórias crónicas (asma, doença pulmonar obstrutiva crónica e fibrose cística) pode causar doenças fatais.

A transmissão deste vírus pode ocorrer por transmissão fecal-oral ou por contacto direto com secreções infetadas ou aerossóis contendo partículas virais, contudo as opiniões ainda são um pouco controversas neste campo. Em relação à grande frequência de infeção, esta pode ser, pelo menos em parte, uma consequência da grande diversidade serológica e da baixa reatividade cruzada da resposta imunológica.

Nas últimas décadas, foram descritos polimorfismos em vários genes de citocinas (moduladores solúveis da atividade do Sistema Imunológico (SI)), indicando que a variação imunológica geneticamente codificada está apenas associada a polimorfismos do MHC. Assim, a suscetibilidade viral de cada indivíduo também pode ser afetada por essas variações genéticas. De facto, vários estudos indicam que polimorfismos em genes como TOLLIP, IL1B, IL6, e TNFA entre outros, influenciam a resposta imunológica a infeções virais.

No presente trabalho procuram-se fatores genéticos que poderiam influenciar a presença de RHV nas narinas dos voluntários. Para tal, testou-se por qPCR a presença de RHV durante 1 ano nas narinas dos voluntários e por PCR-RFLP foram genotipados polimorfismos de 4 genes (TOLLIP rs5743899, IL6 rs1800795, IL1B rs16944 e TNFA rs1800629) relacionados com o SI.

## **II. Desenvolvimento**

### **1. Vírus**

O primeiro registo de um vírus ocorreu em 1892 por Ivanowsky que teve a curiosidade de estudar a doença do mosaico na planta do tabaco. Este botânico, de nacionalidade russa, macerou folhas da planta do tabaco que apresentavam manchas e colocou esse mesmo macerado junto com plantas do tabaco saudáveis. Mais tarde, percebeu que as plantas do tabaco saudáveis também teriam ficado com manchas, ou seja, com a doença do mosaico, concluindo assim, que esta doença era transmissível por um agente capaz de passar por filtros com poros de um diâmetro tão reduzido que eram capazes de reter bactérias. Esse agente que antigamente era designado de *contagium vivium fluidum*, é hoje conhecido como vírus, contudo com a evolução dos conhecimentos teóricos e científicos verificou-se que nem todos os agentes filtráveis podiam ser classificados como vírus, pois estes têm muitas outras características para além do seu tamanho reduzido (Ferreira, W. e Sousa, J. 2002; Trabulsi, L. *et al.* 1998).

Os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios com dimensões entre 20 e 400 nanómetros, pelo que só são visíveis com recurso a um microscópio eletrónico. Possuem ácidos nucleicos (Ácido Desoxirribonucleico (DNA) ou Ácido Ribonucleico (RNA)), em cadeia simples ou dupla) que são protegidos por uma cápside, que é uma caixa proteica cujas subunidades são capsómeros e que também tem a função de ligação às células do hospedeiro. Os vírus não possuem um sistema enzimático completo (necessitam por isso de o complementar com o sistema enzimático da célula que infetam), e podem conter ou não um envelope. O envelope é uma camada lipídica exterior que deriva das membranas celulares do hospedeiro onde o vírus foi montado, e como o seu conteúdo é igual ao das outras células não é reconhecido pelo SI, para além disso tem a vantagem de se conseguir fundir muito mais facilmente com as células alvo. Os vírus que não o possuem, por norma são mais resistentes aos agentes físicos e químicos, já os que apresentam envelope são mais frágeis pois a presença de glicoproteínas e lipoproteínas torna-os incapazes de manter a sua virulência e de sobreviver ao meio ambiente por muito tempo (Ferreira, W. e Sousa, J. 2002; Trabulsi, L. *et al.* 1998).

Em geral, qualquer vírus para conseguir cumprir o seu ciclo biológico precisa de infetar um hospedeiro suscetível, replicar-se nesse mesmo hospedeiro, difundir-se no organismo infetado (localmente ou para zonas mais distantes do local de replicação) e libertar-se do hospedeiro, para isso necessita que a célula a infetar possua recetores específicos e de utilizar os seus recursos enzimáticos (Ferreira e Sousa, 2002; Trabulsi *et al.* 1998).

## **2. O Rinovirus**

### **2.1. Caracterização**

O RHV foi dos primeiros vírus a ser identificado. Foi descoberto em 1950, sendo um vírus de pequena dimensão (cerca de 30 nanómetros de diâmetro) que pertence à família *Picornaviridae* e ao género Enterovírus. É um dos vírus que causa mais morbidade humana em todo o mundo devido à sua ação sobre as vias aéreas tanto no trato respiratório superior como inferior (Halfon and Newacheck, 1993; Louie *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2007; McErlean *et al.*, 2007, 2008; Ann C Palmenberg *et al.*, 2009; Tapparel, Cordey, *et al.*, 2009; Kim, Ki and Lee, 2009; Mackay, 2010; Miller, 2010; William J. Doyle *et al.*, 2010; Bennett *et al.*, 2012; Gavala, Bertics and Gern, 2012; McIntyre, Knowles and Simmonds, 2013; Chalovich and Eisenberg, 2013; Defa *et al.*, 2013; Palmenberg *et al.*, 2014; Saba *et al.*, 2014; Waman *et al.*, 2014; Cabeda *et al.*, 2014; Dupouey *et al.*, 2014; Alves *et al.*, 2016; Royston and Tapparel, 2016).

Alguns estudos apresentam taxas de mortalidade e morbidade muito elevadas em comparação com outros estudos sugerindo surtos de RHV, no entanto isto não é completamente certo e suspeita-se de que tais resultados poderiam ser devido a uma superinfecção de *H. influenzae* e outras espécies bacterianas juntamente com o RHV, que foi o principal agente causador do surto (Halfon and Newacheck, 1993; Myatt *et al.*, 2003; Heikkinen and Järvinen, 2003; Louie *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2007; McErlean *et al.*, 2007; Ann C Palmenberg *et al.*, 2009; Mackay, 2010; William J. Doyle *et al.*, 2010; Bennett *et al.*, 2012; Gavala, Bertics and Gern, 2012; Chalovich and Eisenberg, 2013; Hershenson, 2013; Palmenberg *et al.*, 2014; Bochkov *et al.*, 2014; Cabeda *et al.*, 2014; L'Huillier *et al.*, 2015; Alves *et al.*, 2016; Royston and Tapparel, 2016; Stone and Miller, 2016).

Tal como o próprio nome indica o RHV infeta humanos. A similaridade genética torna também os primatas suscetíveis, o que não acontece com os roedores. Por este motivo, a nível laboratorial foram desenvolvidas, propositadamente, estirpes de ratos contendo a Molécula de Adesão Intercelular Humana-1 (ICAM-1), criando assim um modelo animal adequado para o estudo do RHV. Contudo, este modelo animal não mimetiza exatamente o organismo humano pelo que o RHV é também estudado em modelos *in vitro* reconstituindo o epitélio diferenciado das vias aéreas humanas (Gavala, Bertics and Gern, 2012; Chalovich and Eisenberg, 2013; L’Huillier *et al.*, 2015; Royston and Tapparel, 2016).

O RHV possui uma pequena cadeia simples de RNA positiva com aproximadamente 7200 pares de bases protegida pela cápside de forma icosaédrica regular, que por sua vez é constituída por 60 cópias de 4 proteínas (VP1, VP2, VP3 e VP4). A proteína VP1 situa-se na parte exterior da cápside formando um vale/cavidade que é a zona de ligação a recetores celulares e também a alguns fármacos anti-virais. Também as proteínas VP2 e VP3 contribuem para a antigenicidade ao contrário da VP4, que permite a ligação entre o RNA e a cápside (Savolainen-Kopra *et al.*, 2009; Mackay, 2010; Gavala, Bertics and Gern, 2012; Bochkov *et al.*, 2014; Cabeda *et al.*, 2014; Pretorius *et al.*, 2014; Blaas and Fuchs, 2016a).

Este vírus não apresenta involucro lipídico e, ao contrário de vírus muito próximos como o Enterovírus, não é capaz de resistir ao pH ácido do estômago (Mackay, 2010; Gavala, Bertics and Gern, 2012; Bochkov *et al.*, 2014; Cabeda *et al.*, 2014; Pretorius *et al.*, 2014; Saba *et al.*, 2014)

As variações na estrutura das 3 proteínas exteriores e especialmente da VP1 e VP2, são responsáveis pelo elevado número de serótipos existentes de RHV. Atualmente, são conhecidos mais de 160 serótipos do RHV, que segundo análises moleculares filogenéticas da região codificante da proteína VP1, podem ser divididos em 3 espécies: Rinovírus A, B e C e em 7 subpopulações geneticamente diferentes (A, A1, A2, A3, B, C1 e C2) (Heikkinen and Järvinen, 2003; Louie *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2007; McErlean *et al.*, 2007; Ann C Palmenberg *et al.*, 2009; Tapparel, Junier, *et al.*, 2009; Mackay, 2010;

Gavala, Bertics and Gern, 2012; McIntyre, Knowles and Simmonds, 2013; Hershenson, 2013; Palmenberg *et al.*, 2014; Pretorius *et al.*, 2014; Waman *et al.*, 2014; Bochkov *et al.*, 2014; Cabeda *et al.*, 2014; L’Huillier *et al.*, 2015; Blaas and Fuchs, 2016a; Chen *et al.*, 2016; Kamau *et al.*, 2018).

Estudos realizados por Mc Erlean *et al.* descobriram um novo RHV pertencente à subpopulação A2, o RHV-QPM, que foi detetado pela primeira vez por *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction* (RT-PCR) num lactante com bronquiolite, destacando-se da espécie A devido à resistência ao Pleconaril. Este RHV é mais prevalente no Inverno, no entanto também é detetado na Primavera e no Verão tendo uma distribuição mundial. Os seus sintomas assemelham-se aos dos RHV em geral, tal como descrito abaixo. Mostra-se distinto apenas na sua predisposição para causar bronquiolite sugerindo que está relacionado com infeções do trato respiratório inferior, ou seja, infeções mais graves, contudo existe pouca informação sobre este, sendo necessários mais estudos para se perceber melhor o papel deste vírus ao nível da patogénese humana (McErlean *et al.*, 2007, 2008; McIntyre, Knowles and Simmonds, 2013).

## **2.2. Variabilidade genética**

Diferentes espécies de RHV apresentam diferentes complexidades, tropismos, potenciais de virulência, apresentações clínicas e patogénese, para além disso, há muita diversidade genética, o que leva a variados síndromes clínicos (Tapparel, Cordey, *et al.*, 2009; Royston and Tapparel, 2016).

Em geral, vírus de RNA são bons para estudar a evolução genética pois possuem uma elevada taxa de mutação, têm grandes populações, genoma pequeno e curto tempo de vida. Esta diversidade genética ocorre devido à grande taxa de erro (nos Picornavirus a RNA polimerase tem uma taxa de erro de  $10^{-3}$  a  $10^{-4}$  por nucleótido em cada ciclo replicativo) e de mutações que ocorrem no RNA que dependem da RNA polimerase e também, mas raramente, da recombinação principalmente homóloga. Estes dois fenómenos genéticos intraespécies são uma força notável de evolução, introduzindo variabilidade genética dentro das espécies que originam rinovirose (Ann C Palmenberg

*et al.*, 2009; Bochkov *et al.*, 2014; Palmenberg *et al.*, 2014; Waman *et al.*, 2014; L'Huillier *et al.*, 2015; Royston and Tapparel, 2016).

### **2.2.1. As espécies de Rinovírus A, B e C**

A sequenciação parcial de regiões codificantes da cápside viral, das regiões não codificantes e de um número limitado de genomas completos, levou à divisão dos RHV em 3 espécies:

O Rinovírus A contém 77 serótipos e é o mais detetado em adultos. Tal como o Rinovírus C também está associado, mas não tanto, à asma e outras infeções do trato respiratório inferior, ou seja, levam a manifestações clínicas mais graves, principalmente em crianças. Contudo, estas duas espécies apresentam picos diferentes e em estações diferentes, o que sugere que podem interferir uma com a atividade da outra, ou então, que existe uma proteção cruzada da infeção prévia. O Rinovírus A é eliminado mais facilmente pelos adultos do que o Rinovírus C, mas estas duas espécies compartilham um ancestral comum (Lee *et al.*, 2007; Ann C Palmenberg *et al.*, 2009; Mackay, 2010; Arakawa *et al.*, 2012; Granados *et al.*, 2012; Pretorius *et al.*, 2014; Waman *et al.*, 2014; Bochkov *et al.*, 2014; Palmenberg *et al.*, 2014; Hasegawa *et al.*, 2015; L'Huillier *et al.*, 2015; Royston and Tapparel, 2016; Stone and Miller, 2016; Chen *et al.*, 2016; Scagnolari *et al.*, 2017).

Através de análises filogenéticas descobriu-se 3 serótipos muito distintos no Rinovírus A que foram denominados de grupo D. Esta divergência deve-se principalmente ao comprimento da sequência do genoma, neste mesmo grupo, os serótipos possuem elementos de RNA atípicos em relação às outras espécies de Rinovírus A. O grupo D poderá vir a ser uma quarta espécie, o Rinovírus D, porque há evidências filogenéticas e características na sua sequência muito claras para tal (Ann C Palmenberg *et al.*, 2009; Tapparel, Junier, *et al.*, 2009; Miller, 2010; Palmenberg *et al.*, 2014).

O Rinovírus B é o mais raro, fazendo parte desta espécie apenas 26 serótipos, o que indica que provoca infeções com menos frequência e com menos severidade do que as outras 2 espécies porque este induz menos citotoxicidade e menos produção de citocinas. Adicionalmente apresenta uma taxa de replicação mais lenta e mais baixa do que o Rinovírus A e C (Lee *et al.*, 2007; Mackay, 2010; Arakawa *et al.*, 2012; Granados *et al.*,

2012; Waman *et al.*, 2014; L'Huillier *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2016; Royston and Tapparel, 2016; Stone and Miller, 2016).

Com o desenvolvimento de tecnologias de elevada sensibilidade para identificação do RHV em amostras clínicas, conseguiu-se descobrir em 2007 um grupo com origem genética diferente das que já eram conhecidas, sendo sugerido pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus uma terceira espécie, o Rinovírus C. Até então esta espécie não teria sido descoberta porque não cresce *in vitro* nas culturas de linhas celulares padrão imortalizadas, o que dificulta ainda hoje o estudo deste RHV, conhecendo-se cerca de 52 estirpes de Rinovírus C (Ann C Palmenberg *et al.*, 2009; Miller, 2010; Mackay, 2010; Arakawa *et al.*, 2012; Gavala, Bertics and Gern, 2012; Granados *et al.*, 2012; Palmenberg *et al.*, 2014; Waman *et al.*, 2014; Bochkov *et al.*, 2014; Hasegawa *et al.*, 2015; L'Huillier *et al.*, 2015; Royston and Tapparel, 2016; Stone and Miller, 2016; Blaas and Fuchs, 2016a; Chen *et al.*, 2016).

Em 2011, Bochkov *et al.* foi o primeiro a fazer crescer Rinovírus C *in vitro*, utilizando tecidos da mucosa sinusal. Esta espécie não possui estirpes emergentes uma vez que há mais de 250 anos que não se tem conhecimento de patologias graves provocadas por esta. As infecções pelo Rinovírus C atingem o seu pico nos meses de Inverno, sendo que as manifestações clínicas provocadas são piores e mais disseminadas nas crianças com pneumonia e bebés com doença sibilante. Estas faixas etárias são as mais atingidas e onde há maior severidade da infecção, provocando exacerbações da asma e doenças semelhantes à gripe (Halfon and Newacheck, 1993; Lau *et al.*, 2007; McErlean *et al.*, 2008; Ann C Palmenberg *et al.*, 2009; Savolainen-Kopra *et al.*, 2009; Mackay, 2010; Miller, 2010; Arakawa *et al.*, 2012; Gavala, Bertics and Gern, 2012; Granados *et al.*, 2012; Palmenberg *et al.*, 2014; Waman *et al.*, 2014; Bochkov *et al.*, 2014; Hasegawa *et al.*, 2015; Hatchwell *et al.*, 2015; L'Huillier *et al.*, 2015; Royston and Tapparel, 2016; Stone and Miller, 2016; Chen *et al.*, 2016; Scagnolari *et al.*, 2017).

A sensibilidade à temperatura varia muito entre estirpes de Rinovírus C, sendo que a maioria das estirpes desta espécie conseguem crescer mais eficientemente a baixas temperaturas. Para isso acontecer é necessária uma exposição a ar frio, o que suporta o

facto de o trato respiratório superior ser o mais atingido porque é o que se encontra mais exposto ao ambiente. Em geral, considera-se que as infeções por Rinovírus C causam doenças mais severas, bem como mais hospitalizações do que as provocadas pelo Rinovírus A e B. Estudos recentes reportaram infeções sistémicas por Rinovírus C e também já foram detetados RHV em amostras de fezes de doentes hospitalizados com doenças entéricas (Lau *et al.*, 2007; Kiang *et al.*, 2008; McErlean *et al.*, 2008; Peltola *et al.*, 2008; Mackay, 2010; Carta, Silvestri and Rossi, 2013; Pretorius *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2016; Royston and Tapparel, 2016; Su *et al.*, 2018). A frequência deste vírus varia com a idade, sexo, condições socioeconómicas e sanitárias e ainda com as estações do ano (Mackay, 2010; Miller, 2010; Carta, Silvestri and Rossi, 2013; Cabeda *et al.*, 2014; Pretorius *et al.*, 2014).

Relativamente às estações do ano, têm sido desenvolvidos estudos longitudinais da epidemiologia e das características clínicas da infeção por RHV, descobrindo-se assim que, de uma forma geral, existem infeções por RHV todo o ano e em todo o mundo. Mais especificamente, nos países temperados é mais comum um pico de incidência na Primavera e no Inverno, já em regiões tropicais, subtropicais e semiáridas foram detetados RHV em todos os meses. No entanto, existem outros estudos com resultados contraditórios, demonstrando um pico de incidência de infeção por RHV na Primavera e no Outono, (chegando nesta última estação a causar cerca de 80% das infeções do trato respiratório superior), juntamente com outros realizados na África do Sul, em concordância com estudos feitos na Tailândia e mais recentemente no Quênia, que não consideram que exista uma sazonalidade clara para o Rinovírus A e C, pois é detetado todo o ano, ao contrário do que acontece com o Rinovírus B que só é detetado esporadicamente (Halfon and Newacheck, 1993; Heikkinen and Järvinen, 2003; Lee *et al.*, 2007; Mackay, 2010; Miller, 2010; Arakawa *et al.*, 2012; Gavala, Bertics and Gern, 2012; Cabeda *et al.*, 2014; Pretorius *et al.*, 2014; L'Huillier *et al.*, 2015; Stone and Miller, 2016).

A associação de serotipos com a incidência de infeção, aumento da virulência e libertação viral prolongada é controversa. Com efeito, enquanto alguns autores não encontram qualquer associação de serotipos com a gravidade da doença, outros relatam por exemplo

a associação entre o RHV16 e a infecção brônquica, resposta exagerada das vias aéreas e ainda exacerbação da asma (Louie *et al.*, 2005; Miller, 2010; Hershenson, 2013; Manifesto, 2013; Clark D. Russell, Griffiths and Haas, 2014; Scagnolari *et al.*, 2017).

### **2.2.2. Mutações virais e recombinação genética**

Embora ainda existam poucos estudos relativos à recombinações no RHV, pensa-se que estas possam ocorrer na zona entre a *Open Reading Frame* (ORF) da poliproteína e a Região 5' Não Traduzida (UTR), o gene da protease 2A ou os genes adjacentes à cápside. Tudo indica que o mais comum é ocorrerem recombinações dentro da mesma espécie e, em particular, no Rinovírus A (Ann C Palmenberg *et al.*, 2009; Tapparel, Junier, *et al.*, 2009; Bochkov *et al.*, 2014; Palmenberg *et al.*, 2014; Waman *et al.*, 2014; L'Huillier *et al.*, 2015; Royston and Tapparel, 2016).

As recombinações interespecies, ainda que mais raras podem ocorrer entre todas as espécies. A sua raridade resulta da grande heterogeneidade do RNA codificante entre as espécies, sendo raras as situações em que é possível originar uma recombinação viável e por norma as estirpes resultantes são menos virulentas do que as parentais. No entanto, conhece-se uma recombinação interespecie entre o Rinovírus A e o C devido à ligação entre a região 5' UTR e a poliproteína que originou uma subpopulação emergente, a C2 (Tapparel, Junier, *et al.*, 2009; Bochkov *et al.*, 2014; Palmenberg *et al.*, 2014; Waman *et al.*, 2014; L'Huillier *et al.*, 2015; Royston and Tapparel, 2016).

São conhecidas até ao momento 46 recombinações, pertencendo a maior parte à subpopulação A2, C1 e C2 (Ann C Palmenberg *et al.*, 2009; Palmenberg *et al.*, 2014; Waman *et al.*, 2014; L'Huillier *et al.*, 2015).

Foi realizado um estudo para analisar o Equilíbrio de Ligação (LE) do genoma usando o Índice de Associação ( $I^S A$ ), sendo que um  $I^S A$  de 0 corresponde a ausência de recombinação. Para o RHV o  $I^S A$  foi de 0,066, correspondendo este a um valor baixo que sugere uma fraca evidência de LE e indica a associação não aleatória de *loci* não polimórficos. Provavelmente estas recombinações ocorrem através da co-infecção, assim como através de sucessivas infeções por diferentes espécies de RHV. No entanto, também ocorrem co-infecções de RHV com outros vírus respiratórios, os mais comuns são o

adenovírus, bocavírus, coronavírus e vírus influenza (Peltola *et al.*, 2008; Ann C Palmenberg *et al.*, 2009; Miller, 2010; Palmenberg *et al.*, 2014; Waman *et al.*, 2014; L’Huillier *et al.*, 2015).

Quando ocorrem mutações e recombinações que são uma mais valia para o vírus, são alvo de seleção positiva. Os episódios de seleção positiva ocorrem tanto nas zonas que dão origem a proteínas estruturais como nas que dão origem a proteínas não estruturais (Waman *et al.*, 2014).

Nas zonas estruturais os processos de diversificação estão associados a propriedades fenotípicas como a antigenicidade e a especificidade de ligação aos recetores. Foi identificada seleção positiva em 24 codões, pertencendo estes a 3 proteínas estruturais (VP1, VP2 e VP3) e a 3 proteínas não estruturais (2A, 2C e 3D) (Waman *et al.*, 2014).

Destes 24 codões, 12 pertencem à proteína VP1, sendo que 8 deles estão associados a antigenicidade ou com o sítio de ligação ao Recetor de Lipoproteína de Baixa Densidade (LDLR) (nos vírus que o utilizam). Os codões 86, 91 e 95 fazem parte do sítio antigénico A, reconhecido pelos recetores LDLR e os codões 268 e 278 fazem parte do sítio antigénico B, reconhecido pelos mesmos recetores. Já os codões 88, 89 e 228 ocorrem na região mais comum de ligação ao recetor LDLR. Relativamente às ICAM’s, o sítio de ligação a estas pelos vírus é determinado por um aminoácido codificado pelo codão 80 (Waman *et al.*, 2014).

A proteína VP2 contém os codões 104, 235, 262 e 263 que também estão sujeitos a episódios de seleção positiva. O codão 235 que codifica o aminoácido serina precede o antigénio residual alanina, que pertence ao sítio antigénico C dos vírus que se ligam aos recetores LDLR (Waman *et al.*, 2014).

A proteína VP3 contém os codões 180, 234, 236 e 171 que também sofrem episódios de seleção positiva. O codão 180 no Rinovírus A2 corresponde ao codão 179 no Rinovírus B14. No Rinovírus A2 corresponde ao local de ligação ao recetor LDLR e no Rinovírus B14 corresponde ao local de ligação às ICAM’s. Já os codões 234 e 236 no Rinovírus A2 correspondem ao 233 e 235, respetivamente, no Rinovírus B14, situando-se perto do local de ligação às ICAM’s (Waman *et al.*, 2014).

Relativamente às proteínas não estruturais, a 2A inclui 4 codões o 2, 44, 74, 141 que estão igualmente sob o efeito de seleção positiva (Waman *et al.*, 2014).

Já a proteína 2C contém 3 codões o 72, 88, e 189 que se encontram na mesma situação, sendo esta proteína uma das mais bem conservadas e multifuncional na família Picornavírus, conhecida também pela sua atividade NTPase (Waman *et al.*, 2014).

### **2.3. Ciclo de infeções por Rinovírus**

#### **2.3.1. Transmissão**

No RHV a transmissão fecal-oral é a mais comum, pois este é um vírus que tem capacidade de permanecer viável durante muitas horas nas mãos, sendo que a falta de higiene nas mãos favorece este tipo de transmissão, para além disso também é possível ocorrer transmissão pessoa a pessoa através de contacto direto com secreções infetadas ou aerossóis que contêm partículas virais (Heikkinen and Järvinen, 2003; Myatt *et al.*, 2003, 2004; Mackay, 2010; Gavala, Bertics and Gern, 2012; Cabeda *et al.*, 2014).

Num estudo realizado o RHV foi detetado em 40% das mãos dos voluntários infetados e em 6% dos objetos da casa. Sabe-se que o contágio é elevado principalmente entre familiares, sendo que nos adultos para haver infeção é necessário um contacto mais prolongado, ao invés do que acontece em bebés e crianças que por serem mais suscetíveis sofrem contágio imediato (Heikkinen and Järvinen, 2003; Mackay, 2010; Gavala, Bertics and Gern, 2012; Carta, Silvestri and Rossi, 2013; Cabeda *et al.*, 2014).

Sob condições experimentais observou-se que o RHV permanece viável, horas a dias à temperatura ambiente num meio interno, e na pele cerca de 2 horas (Mackay, 2010).

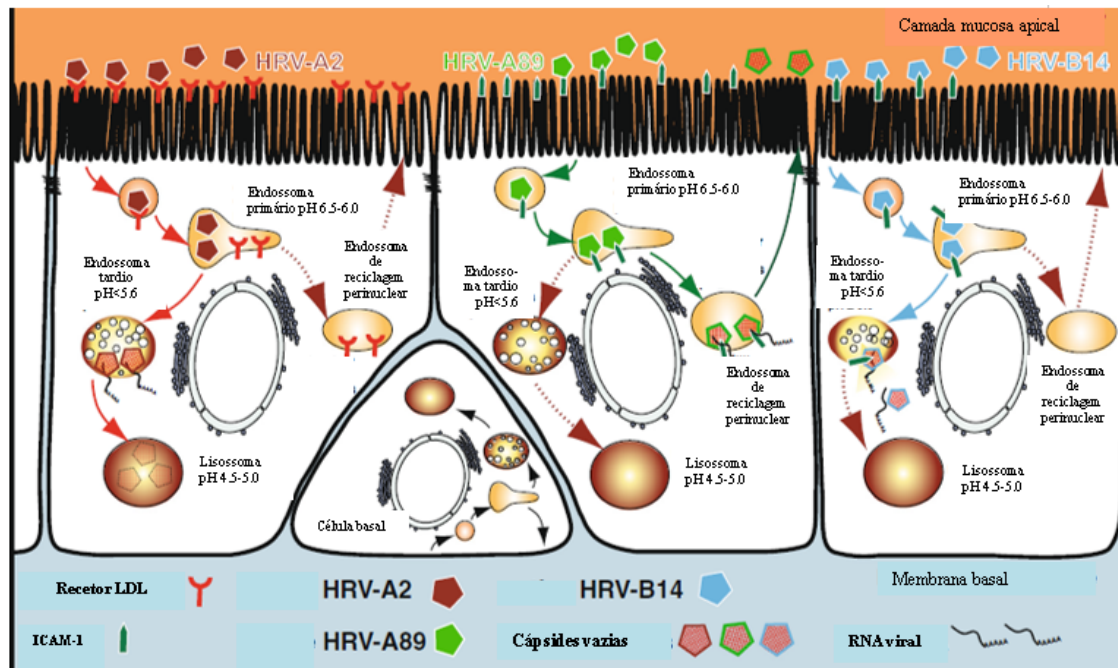
A inoculação do RHV no corpo humano pode ocorrer através da mucosa nasal e depois facilmente consegue atingir a nasofaringe ou então, através da conjuntiva do olho. Neste último caso, o vírus é transportado pelo ducto lacrimal até a cavidade nasal seguindo depois o mesmo percurso de um vírus que entra no organismo humano através da mucosa nasal. Desta forma, o epitélio das vias aéreas é o primeiro e o principal local a ser infetado, mais especificamente as células do epitélio nasal e nasofaringe, provavelmente devido à expressão limitada das ICAM's. No entanto, células do músculo liso das vias aéreas

também podem ser infetadas, causando broncoespasmo e respostas exacerbadas por parte das vias aéreas, contudo isto ainda não foi verificado *in vivo*. Para além disso, também se encontram macrófagos alveolares infetados contudo, sabe-se que não conseguem suportar todo o processo que envolve a infeção por RHV (Heikkinen and Järvinen, 2003; Mackay, 2010; Gavala, Bertics and Gern, 2012; Carta, Silvestri and Rossi, 2013; Manifesto, 2013; Saba *et al.*, 2014; Blaas and Fuchs, 2016a; Royston and Tapparel, 2016).

Assim que o RHV encontra a célula a infetar ocorre a ligação entre o vale na cápside viral (proteína VP1) e os recetores celulares existentes à superfície das células. Os Rinovírus A e B para que consigam infetar as células precisam que haja uma adesão desta proteína viral aos ICAM's, que existem nas células ciliadas e não ciliadas das vias aéreas (este é o fenómeno que ocorre mais frequentemente), ou então em alternativa, utilizam os recetores LDLR. Os Rinovírus C ligam-se a outros recetores menos comuns, designados Recetor *Cadherin Related Family Member 3* (CDHR3) (Mackay, 2010; Gavala, Bertics and Gern, 2012; Defa *et al.*, 2013; Hershenson, 2013; Cabeda *et al.*, 2014; Blaas and Fuchs, 2016b; Royston and Tapparel, 2016; Stone and Miller, 2016).

Após isto, há uma desestabilização da partícula viral levando à explosão da proteína VP4 e conseqüentemente, a formação de poros na cápside e de canais na membrana celular, seguindo-se a absorção viral que dependendo do tipo de recetor, pode ocorrer via clatrina dependente ou independente da endocitose ou macropinocitose. Nesta etapa o vírus sofre uma alteração da conformação devido a alterações de pH ou devido à ligação a recetores (mais especificamente ICAM's), que levam à exposição dos domínios hidrofóbicos, o que vai permitir a libertação do RNA viral dentro da célula (Mackay, 2010; Gavala, Bertics and Gern, 2012; Hershenson, 2013; Cabeda *et al.*, 2014; Blaas and Fuchs, 2016a; Royston and Tapparel, 2016; Stone and Miller, 2016; Yamaya *et al.*, 2016).

Tal como se pode observar na Figura 1, o RHV-A2 utiliza o recetor LDL, já o RHV-A89 e o RHV-B14 utilizam o recetor ICAM-1. Ambos os recetores são expressos pelas células epiteliais nasais ciliadas. Após a ligação a um destes recetores, estes RHV's são encaminhados para os endossomas primários, sendo que no caso do RHV-A2, o vírus e o recetor separam-se. O recetor é reciclado e o vírus encaminhado para o endossoma tardio,



**Figura 1-** Possíveis mecanismos de entrada e descapsulação do RSV em células epiteliais nasais ciliadas (adaptado de Blaas and Fuchs, 2016).

onde o pH extremamente ácido altera a conformação e liberta o RNA viral para o citoplasma enquanto a cápside é degradada. No caso do RSV-A89, a cápside permanece ligada ao recetor no endossoma primário, quando entra em contacto com o pH ácido do endossoma tardio, o RNA viral é libertado para o citoplasma, enquanto a cápside permanece provavelmente ligada ao recetor sendo também ela encaminhada para o exterior da célula. Já o RSV-B14 apesar de ligado ao ICAM-I é encaminhado para o endossoma tardio, contudo, sob a ação do pH ácido do endossoma tardio o vírus (cápside e RNA) rompe o endossoma sendo o seu RNA e a cápside libertados no citoplasma (Blaas and Fuchs, 2016).

### 2.3.2. Recetores virais

A classificação dos serótipos do Rinovírus A e B faz-se com base nos recetores específicos que usam para entrar nas células. Existem os vírus que usam as ICAM's (um membro da superfamília das imunoglobulinas) das células epiteliais das vias aéreas, são designados como recetores *major*, por ser o recetor utilizado por mais de 90% dos serótipos de RSV (alguns destes também usam sulfato de heparano como recetor

adicional) e existem os vírus que usam membros da família dos recetores LDLR (recetores *minor*) (Ann C Palmenberg *et al.*, 2009; Mackay, 2010; Gavala, Bertics and Gern, 2012; Carta, Silvestri and Rossi, 2013; Defa *et al.*, 2013; Hershenson, 2013; Waman *et al.*, 2014; Palmenberg *et al.*, 2014; Alves *et al.*, 2016; Yamaya *et al.*, 2016, 2017; Blaas and Fuchs, 2016a; Stone and Miller, 2016).

Há 12 serotipos do Rinovírus A que pertencem aos vírus que utilizam os recetores LDLR sendo que os restantes do Rinovírus A e todos os serotipos do Rinovírus B utilizam as ICAM's (Ann C Palmenberg *et al.*, 2009; Mackay, 2010; Gavala, Bertics and Gern, 2012; Hershenson, 2013; Palmenberg *et al.*, 2014; Waman *et al.*, 2014; Stone and Miller, 2016).

As ICAM's são detetadas em pequena quantidade nas células não ciliadas linfocitárias do tecido adenoide nasofaríngeo, assim como na camada basal do epitélio ciliado. No entanto, nas células epiteliais brônquicas, o RSV regula positivamente a expressão de ICAM's ligadas à membrana celular através de um mecanismo dependente de Fator Nuclear (NF)- $\kappa$ B que regula negativamente a libertação de ICAM's solúveis (Mackay, 2010; Yamaya *et al.*, 2016).

Tal como foi referido anteriormente o Rinovírus C utiliza recetores diferentes do Rinovírus A e B para entrar dentro das células, isto justifica o facto de ele não conseguir crescer em culturas de linhas celulares padrão imortalizadas. Estas células não têm os recetores necessários para a entrada destes vírus (Halfon and Newacheck, 1993; Gavala, Bertics and Gern, 2012; Royston and Tapparel, 2016).

Estudos feitos por Bochkov *et al* sugeriram que o recetor funcional para o Rinovírus C é o CDHR3, este está presente em grandes quantidades no epitélio respiratório, está envolvido na adesão celular, interação entre células e na polaridade de diferenciação do epitélio (Gavala, Bertics and Gern, 2012; Pretorius *et al.*, 2014; Blaas and Fuchs, 2016a; Huang *et al.*, 2016; Royston and Tapparel, 2016; Stone and Miller, 2016).

A associação de um Polimorfismo de Nucleótido Único (SNP) no gene que dá origem a este recetor e a exacerbação da asma acompanhada por sibilância, deve-se ao facto de este polimorfismo permitir uma maior ligação e replicação do Rinovírus C. Assim, pensa-se que a infecção por Rinovírus C, nestes indivíduos, pode induzir a asma, ou que as pessoas

(principalmente crianças) asmáticas e com este SNP são mais vulneráveis a infecções por este tipo de RHV, o que agrava a asma pré-existente (Peltola *et al.*, 2008; Gavala, Bertics and Gern, 2012; Esposito *et al.*, 2014; Pretorius *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2016; Royston and Tapparel, 2016; Stone and Miller, 2016; Scagnolari *et al.*, 2017).

### **2.3.3. Tropismo**

O RHV é um vírus que infeta principalmente células epiteliais das vias aéreas, mas poucas. De modo geral esta infecção não acarreta grandes complicações, causando principalmente infecções ligeiras, autolimitadas, subclínicas e assintomáticas. Esta última característica é muito comum e pode dever-se à libertação prolongada de vírus após a resolução de uma doença respiratória sintomática, sintomas leves ou devido a um período de incubação antes do início dos sintomas e por este motivo os vírus não são reconhecidos (Heikkinen and Järvinen, 2003; Lessler *et al.*, 2009; William J. Doyle *et al.*, 2010; Mackay, 2010; Gavala, Bertics and Gern, 2012; Carta, Silvestri and Rossi, 2013; Chalovich and Eisenberg, 2013; Hershenson, 2013; Cabeda *et al.*, 2014; Pretorius *et al.*, 2014; Hasegawa *et al.*, 2015; L'Huillier *et al.*, 2015; Royston and Tapparel, 2016; Stone and Miller, 2016).

O facto de ser uma doença assintomática pode explicar o motivo pelo qual não há um período de incubação definido, visto que não se consegue saber o tempo de exposição aos vírus, o início dos sintomas, nem o momento de contágio. Contudo, trabalhos com infecções experimentais apontam para um período de tempo entre 2 dias a 2 semanas com os sintomas respiratórios a durarem 1 a 2 dias após a inoculação (Heikkinen and Järvinen, 2003; Lessler *et al.*, 2009; William J. Doyle *et al.*, 2010; Mackay, 2010; Gavala, Bertics and Gern, 2012; Hershenson, 2013; Cabeda *et al.*, 2014; Pretorius *et al.*, 2014; Hasegawa *et al.*, 2015; L'Huillier *et al.*, 2015; Stone and Miller, 2016; Royston and Tapparel, 2016).

As crianças, idosos e imunocomprometidos (como por exemplo seropositivos para o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV)) são os principais alvos para doenças sintomáticas por RHV, sendo que nestes últimos a infecção dura aproximadamente 28 dias. Nestes 3 grupos o vírus mostra-se mais duradouro, severo e frequente, já nos indivíduos saudáveis a infecção tende a ser curta, com uma duração média de 2 a 4 dias. Relativamente

às crianças, estas são consideradas o maior reservatório de RHV, podendo ter episódios de infecção recorrentes por este entre 8 a 12 vezes num só ano, já os adultos sofrem apenas 2 a 3 infecções por ano (Heikkinen and Järvinen, 2003; Lessler *et al.*, 2009; Mackay, 2010; William J. Doyle *et al.*, 2010; Gavala, Bertics and Gern, 2012; Carta, Silvestri and Rossi, 2013; Hershenson, 2013; Cabeda *et al.*, 2014; Pretorius *et al.*, 2014; Hasegawa *et al.*, 2015; L'Huillier *et al.*, 2015; Blaas and Fuchs, 2016a; Royston and Tapparel, 2016; Stone and Miller, 2016; Huang *et al.*, 2016).

Devido à sua frequência, o RHV tem um grande impacto económico e social, envolvendo consultas ao médico e faltas ao trabalho e à escola. É responsável por metade dos casos de infeções do trato respiratório superior, com uma capacidade de infeção inversamente proporcional à temperatura, sendo 33°C a temperatura ideal para ocorrer a sua replicação (e a 37-39°C é muito reduzida) (Halfon and Newacheck, 1993; Heikkinen and Järvinen, 2003; McErlean *et al.*, 2007; Ann C Palmenberg *et al.*, 2009; Mackay, 2010; Patel *et al.*, 2010; Cabeda *et al.*, 2014; Palmenberg *et al.*, 2014; L'Huillier *et al.*, 2015; Stone and Miller, 2016; Royston and Tapparel, 2016).

Assim, o RHV apresenta maior facilidade para infetar o trato respiratório superior do que o trato respiratório inferior, pois o primeiro encontra-se muito mais perto do exterior do corpo e conseqüentemente apresenta uma temperatura mais baixa quando a temperatura ambiental é baixa. Adicionalmente o trato respiratório inferior situa-se mais longe do ponto de contágio sendo de mais difícil acesso ao vírus, o que permite ao SI atuar, inibindo assim a infeção e replicação pelo vírus. Chegou-se a pensar inclusive que, o RHV estava limitado a infeções das vias aéreas superiores, no entanto, existem casos em que o SI não é eficaz permitindo infeções do trato respiratório inferior ou então, situações de ventilação muito elevada em que as vias aéreas inferiores diminuem a sua temperatura normal. Estes casos foram confirmados por exame radiológico do tórax e exames físicos, sendo estas infeções menos comuns mas mais severas do que as do trato respiratório superior (McErlean *et al.*, 2007; Ann C Palmenberg *et al.*, 2009; Mackay, 2010; Gavala, Bertics and Gern, 2012; Cabeda *et al.*, 2014; Dupouey *et al.*, 2014; Palmenberg *et al.*, 2014; L'Huillier *et al.*, 2015; Blaas and Fuchs, 2016a; Stone and Miller, 2016; Royston and Tapparel, 2016; Su *et al.*, 2018).

Apesar disso, alguns estudos clínicos mostraram uma grande associação entre a infecção por RHV e a exacerbação da asma que não poderia ser apenas explicada por falhas do SI, levando isto a estudos mais aprofundados relativamente à infecção do trato respiratório inferior. Após vários estudos feitos, observou-se que nas infecções do trato respiratório inferior por RHV ocorriam sempre alterações histológicas a nível alveolar e indícios de bronquiolite, início de pneumonia, pneumonite intersticial, entre outras patologias levando isto a confirmar que o RHV infeta as vias respiratórias inferiores e induz uma resposta pró-inflamatória (McErlean *et al.*, 2007; Ann C Palmenberg *et al.*, 2009; Mackay, 2010; Gavala, Bertics and Gern, 2012; Manuscript and Regulation, 2013; Hershenson, 2013; Bochkov *et al.*, 2014; Palmenberg *et al.*, 2014; Saba *et al.*, 2014; Cabeda *et al.*, 2014; Esposito *et al.*, 2014; L’Huillier *et al.*, 2015; Royston and Tapparel, 2016; Chen *et al.*, 2016; Han *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2016; Scagnolari *et al.*, 2017).

O RHV, ao contrário de outros vírus respiratórios como o influenza ou o vírus sincicial respiratório, não leva à destruição das células epiteliais das vias aéreas nem causa um efeito citopático significativo. Contudo, a infecção pelo RHV perturba a função de barreira das células epiteliais, permitindo a passagem de bactérias e a exposição de recetores de células epiteliais basolaterais, como é o caso dos Recetor do Tipo Toll (TLR) (Mackay, 2010; Gavala, Bertics and Gern, 2012; Hershenson, 2013; Cabeda *et al.*, 2014; Han *et al.*, 2016; Royston and Tapparel, 2016).

Embora o seu tropismo seja maioritariamente para o trato respiratório, são conhecidas situações de disseminação (L’Huillier *et al.*, 2015).

#### **2.3.4. O ciclo da infecção**

O ciclo de infecção é um processo complexo e envolve várias etapas. A cadeia de RNA original tem carga positiva, através da qual se vai formar uma cadeia molde de RNA negativa e durante a replicação origina-se uma cadeia de RNA complementar, mas de sentido positivo. Tudo isto é coordenado pela polimerase do RHV dentro das células epiteliais, e permite que a molécula de RNA positiva sirva de molde para a tradução originando as proteínas virais, ou então que seja incorporada num novo vírus (Lee *et al.*, 2007; Ann C Palmenberg *et al.*, 2009; Mackay, 2010; Gavala, Bertics and Gern, 2012;

Hershenson, 2013; Bochkov *et al.*, 2014; Cabeda *et al.*, 2014; Palmenberg *et al.*, 2014; Alves *et al.*, 2016; Blaas and Fuchs, 2016).

A cadeia de RNA divide-se em 3 partes: a zona 5'UTR que contém um *internal ribosome entry site*, a região codificante ORF que representa 90% do seu comprimento e a zona 3'UTR (Ann C Palmenberg *et al.*, 2009; Mackay, 2010; Granados *et al.*, 2012; Bochkov *et al.*, 2014; Cabeda *et al.*, 2014; Palmenberg *et al.*, 2014; Pretorius *et al.*, 2014; Royston and Tapparel, 2016; Stone and Miller, 2016).

A região 5'UTR é constituída por 610 a 630 nucleótidos, tendo como principais funções regular a tradução, regular a ligação da cadeia de RNA aos ribossomas e também regular a escolha do codão de iniciação (o *internal ribosome entry site* nos Picornavirus tem uma papel semelhante à estrutura CAP nos eucariotas). Esta é uma região altamente conservada e com menor taxa de mutação do que nos Enterovirus, no entanto ocorrem sempre algumas mutações, até mesmo entre vírus do mesmo serotipo, sendo também isto verdade para a região 3'UTR (Ann C Palmenberg *et al.*, 2009; Mackay, 2010; Granados *et al.*, 2012; Bochkov *et al.*, 2014; Cabeda *et al.*, 2014; Palmenberg *et al.*, 2014; Pretorius *et al.*, 2014; Royston and Tapparel, 2016; Stone and Miller, 2016).

A região 3'UTR é constituída por 40 a 45 nucleótidos, começa no codão de terminação ORF e estende-se até à curta cauda poli-A. Esta região juntamente com a região 5' possui as sequências necessárias para regular a replicação e tradução do genoma viral (Mackay, 2010; Granados *et al.*, 2012; Bochkov *et al.*, 2014; Cabeda *et al.*, 2014; Pretorius *et al.*, 2014; Royston and Tapparel, 2016; Stone and Miller, 2016).

Já a região codificante vai dar origem a uma poliproteína precursora com cerca de 2100 aminoácidos, que por sua vez, através da ação das proteases virais é sucessivamente clivada, originando as 4 proteínas estruturais e 7 proteínas não estruturais do vírus (Ann C Palmenberg *et al.*, 2009; Mackay, 2010; Gavala, Bertics and Gern, 2012; Granados *et al.*, 2012; Bochkov *et al.*, 2014; Cabeda *et al.*, 2014; Palmenberg *et al.*, 2014; Pretorius *et al.*, 2014; Blaas and Fuchs, 2016; Stone and Miller, 2016; Royston and Tapparel, 2016).

A proteína P1 vai dar origem às proteínas estruturais que fazem parte da constituição da cápside (VP1 a VP4) (Cabeda *et al.*, 2014; Royston and Tapparel, 2016; Stone and Miller, 2016).

A P2 leva à formação de proteínas não estruturais (2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C e 3D), que ajudam na replicação e inibem os processos normais das células hospedeiras, como por exemplo a transcrição viral de forma a facilitar a replicação viral (Cabeda *et al.*, 2014; Royston and Tapparel, 2016; Stone and Miller, 2016).

Já a P3 forma proteínas que participam na replicação viral e no processamento do polipéptido (Cabeda *et al.*, 2014; Royston and Tapparel, 2016; Stone and Miller, 2016).

Uma vez concluída a tradução da região codificante, as partículas virais são libertadas da célula por lise celular ou exocitose (Cabeda *et al.*, 2014; Stone and Miller, 2016).

#### **2.4. Tratamento**

A análise da diversidade das populações de RHV, bem como os estudos de correlação fenotípica e genómica, têm um papel muito importante no desenvolvimento de novos fármacos e vacinas (Waman *et al.*, 2014).

Atualmente, ainda não existem agentes antivirais aprovados para a prevenção ou tratamento de infeções por RHV. Apesar de já existirem fármacos eficazes, numa patologia habitualmente sem complicações e auto-resolúvel torna-se ainda mais difícil aprovar agentes terapêuticos, já que estes apresentam muitas vezes potencial impacto na saúde igual ou superior ao da infeção ligeira que procuram tratar. Esta inexistência de fármacos aprovados não é grave pois este é um vírus que, de uma forma geral, não tem um impacto significativo ao nível da saúde pública (Mackay, 2010). Assim, o tratamento de uma infeção por RHV é apenas sintomático, uma vez que as infeções causadas são ligeiras e resolvem-se espontaneamente (utilizando-se a título excepcional, em casos mais graves, anti-histamínicos e antibiótico (normalmente amoxicilina + ácido clavulânico) em casos de co-infeção com *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* ou *Moraxella catarrhalis*). O tratamento sintomático é também justificado porque, como já foi referido, existem centenas de serótipos deste vírus e por esse motivo é difícil

desenvolver uma terapia específica (Mackay, 2010; Cabeda *et al.*, 2014; Blaas and Fuchs, 2016a).

A nível laboratorial, continuam a ser feitas experiências para o desenvolvimento de fármacos inibidores da descapsidação, inibidores das enzimas proteolíticas, fármacos que atuam na zona 5'UTR, ICAM-1 solúvel, imunoglobulina sérica intravenosa, equinácea, vitamina C e também corante vermelho neutro (Heikkinen and Järvinen, 2003; Mackay, 2010; Cabeda *et al.*, 2014).

O mecanismo de ação dos inibidores da descapsidação consiste na ligação à parte hidrófoba da cápside estabilizando-a, impedindo desta forma a descapsidação e consequentemente a saída do RNA para o interior da célula, bloqueando assim o ciclo de transmissão do vírus, alguns exemplos destes fármacos são o pleconaril, vapendavir e o pirodavir (Mackay, 2010; Cabeda *et al.*, 2014).

Os inibidores das enzimas proteolíticas inibem a protease 3C, pois esta é uma enzima codificada pelo vírus que tem a função de clivar poliproteínas virais em proteínas, função esta que é essencial para a replicação viral. Pertence a esta família de fármacos por exemplo o Rupintrivir. Este tipo de fármacos nunca chegaram a estar comercializados porque em situações de ensaios em que os voluntários estavam infetados naturalmente com RHV, os fármacos nunca conseguiram diminuir significativamente as cargas virais nem a gravidade dos sintomas (Mackay, 2010).

Já as ICAM-1 solúveis, como por exemplo tremacamra, impedem a entrada dos vírus nas células através da sua ligação a estas, antes deles atingirem as células (Mackay, 2010; Gavala, Bertics and Gern, 2012; Cabeda *et al.*, 2014).

A Equinácea é o fitoterápico mais estudado para o tratamento da infecção por RHV. Esta planta possui alquilamidas, polissacarídeos e derivados do ácido cafeico que lhe conferem um efeito imunológico, tais como estimulação dos macrófagos, monócitos e outras células. No entanto, há resultados muito variados em relação à eficácia desta planta, provavelmente devido a variações nos extratos e também variações na posologia e na duração de administração em relação ao início dos sintomas (Mackay, 2010).

A vitamina C desde 1970 que é usada para a prevenção e tratamento da constipação porque protege contra o stress oxidativo durante as infeções. Todavia, só com doses muito elevadas de vitamina C (8g/dia), é que se nota uma diminuição significativa nos sintomas (Mackay, 2010).

O corante vermelho neutro não impede as ligações do vírus às células, porém inibe drasticamente a replicação viral, abortando o ciclo viral e assim facilitando a eliminação dos vírus pelo SI (Gavala, Bertics and Gern, 2012).

Contudo estes fármacos ainda não conseguiram ser colocados no mercado porque os ensaios clínicos para agentes antivirais têm sido muito exigentes devido à toxicidade dos fármacos, interações entre eles e à falta de eficácia quando se tenta aplica-los às necessidades atuais (Mackay, 2010).

Para além do tratamento sintomático, o que se pode fazer é um tratamento para as doenças que surgem associadas à infeção por RHV. Por exemplo, naqueles doentes que o RHV provoca asma ou agrava a mesma, a teofilina passou a ser usada como antitússico pois descobriram que a sua utilização *in vivo* inibe as fibras C aferentes dos nervos, sendo que a nível humano provoca a despolarização do nervo vago. Já nos doentes com Doença Pulmonar Obstrutiva Crónica (DPOC), o tratamento com inibidor da fosfodiesterase 4 N-óxido de roflumilase pode ser aplicado, pois inibe o metabolismo da roflumilase, permitindo diminuir o risco da exacerbação do DPOC severo e ainda diminuir a resistência a corticosteroides (Peden and Bush, 2015).

A utilização do modelo murino por alguns investigadores mostrou que o Salmeterol exerce efeito anti-inflamatório nas infeções induzidas por alergénios e RHV através do aumento dos níveis fosfatase 2A, que diminuem a expressão do Ligando da quimiocina de motivo C-C (CCL)11, CCL20 e CCL2 (Peden and Bush, 2015).

Como tratamento profilático foi estudado também a nível laboratorial o interferão nasal pois tem efeitos antivirais, antiproliferativos e imunológicos que influenciam a suscetibilidade das células do hospedeiro à infeção, mas os efeitos secundários são elevados impedindo a sua utilização. Já a suplementação com zinco por 5 meses está associada a uma diminuição da incidência de constipações, absentismo laboral e escolar,

e a prescrição profilática de antibióticos. Isto demonstra a capacidade de inibir a replicação viral *in vitro*, assim como de bloquear a ligação de RHV às moléculas de ICAM, alterar as proteínas da cápside ao nível da sua configuração para prevenir o seu papel na proteólise, permitir a montagem do vírus e também diminuir a libertação da histamina (Mackay, 2010; Cabeda *et al.*, 2014; Yamaya *et al.*, 2016).

Não foi ainda desenvolvida nenhuma vacina devido às recombinações virais e também porque, para além de existirem imensos serotipos de RHV com elevado nível de variabilidade de sequências dos sítios antigénicos, os antigénios dominantes são específicos, muito variáveis entre eles, juntando a isso a pouca neutralização cruzada entre serotipos, o que torna o desenvolvimento de uma vacina um imenso desafio. Para além disso, há falta de dados epidemiológicos que indiquem quais os serótipos de RHV mais comuns a causar infecção nos humanos (Heikkinen and Järvinen, 2003; Mackay, 2010; Cabeda *et al.*, 2014; Stone and Miller, 2016).

## **2.5. Patofisiologia da infecção por Rinovírus**

Dos últimos anos, 2014 foi o ano com mais registos de doenças das vias aéreas, em parte por causa das infeções por RHV. Alguns estudos reportam inclusive que este é o vírus respiratório humano mais prevalente, sendo capaz de provocar doenças mais severas do que o vírus respiratório sincicial e com muitas complicações associadas (Heikkinen and Järvinen, 2003; Gavala, Bertics and Gern, 2012; Peden and Bush, 2015; Alves *et al.*, 2016).

Segundo algumas investigações, 25 a 50 % das crianças com sintomas respiratórios, apresentam infecção por RHV. Esta mesma infecção pode levar na maioria das vezes a constipações suaves, síndromes febris inespecíficas e erupções cutâneas considerando-se estas infeções ligeiras e que se resolvem por norma espontaneamente; Podem também surgir, mais raramente, formas mais severas com exacerbação de doenças já existentes das vias aéreas (fibrose cística, asma e DPOC), bronquite, poliomielite, hepatite A, encefalite, miocardite, pneumonia severa (mais comum em crianças com menos de 5 anos, idosos e imunocomprometidos) e bronquiolite severa em bebés e crianças, ou mesmo gastroenterite e pericardite, ainda que muito raramente. A infecção por este vírus

pode ser acompanhada por otite média aguda, bronquite crônica e sinusite aguda (Halfon and Newacheck, 1993; Heikkinen and Järvinen, 2003; Blomqvist, 2004a; McErlean *et al.*, 2007; Peltola *et al.*, 2008; Lessler *et al.*, 2009; Tapparel, Junier, *et al.*, 2009; Ann C Palmenberg *et al.*, 2009; Mackay, 2010; Triantafilou *et al.*, 2011; Gavala, Bertics and Gern, 2012; Granados *et al.*, 2012; Hershenson, 2013; Palmenberg *et al.*, 2014; Cabeda *et al.*, 2014; Peden and Bush, 2015; Alves *et al.*, 2016; Yamaya *et al.*, 2016; Alvarez *et al.*, 2018).

Raramente existem situações de hospitalização e as que existem são principalmente em bebês e crianças com asma ou bronquiolite. Em suma, em indivíduos saudáveis, por norma, os sintomas são leves e as doenças não são graves, já em pacientes com condições respiratórias crônicas, idosos, imunocomprometidos e bebês há maior probabilidade de complicações, principalmente ao nível do trato respiratório inferior (Laham *et al.*, 2004; Louie *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2007; McErlean *et al.*, 2007; Peltola *et al.*, 2008; Lessler *et al.*, 2009; Mackay, 2010; Miller, 2010; William J. Doyle *et al.*, 2010; Gavala, Bertics and Gern, 2012; Granados *et al.*, 2012; Hershenson, 2013; Bochkov *et al.*, 2014; Pretorius *et al.*, 2014; Cabeda *et al.*, 2014; Peden and Bush, 2015; Hasegawa *et al.*, 2015; L'Huillier *et al.*, 2015; Stone and Miller, 2016; Chen *et al.*, 2016; Alvarez *et al.*, 2018).

A otite média aguda pode surgir como co-infecção com patogêneos bacterianos associados a RHV, ocorrendo isto em 66 % dos pacientes, sendo as co-infecções de RHV mais comuns com *Moraxella Catarrhalis* e *Streptococcus pneumoniae*. Estudos epidemiológicos mostraram que a maioria dos episódios de otite média têm pouca duração e resolução espontânea, no entanto se estivermos perante uma condição assintomática por algum tempo, pode ocorrer agravamento (Alper *et al.*, 2009; Mackay, 2010).

A sinusite aguda é muito comum em situações de constipação, quando isto acontece os seios maxilares e etmoidais mostram-se afetados em adultos infetados por RHV (Mackay, 2010).

No que diz respeito as erupções cutâneas e gastroenterites foram surpreendentemente elevadas em alguns estudos, no entanto, sabe-se que o RHV não tem capacidade de replicar no trato gastrointestinal devido à sua sensibilidade ao pH ácido, o que sugere que

as gastroenterites podem estar correlacionadas com condições subjacentes do hospedeiro ou co-infecções não documentadas (L'Huillier *et al.*, 2015).

### **2.5.1. Constipação**

Embora anteriormente tenha sido referido que este vírus causa infecções assintomáticas, pode também causar infecções sintomáticas, sendo que os sinais e sintomas mais frequentes são rinorreia, rinite, congestão nasal, espirros, tosse, garganta inflamada, dorida ou áspera, perda do odor e olfato, cefaleias, febre ligeira, suores frios, vômitos, diarreia, dor abdominal, dor de costas, dor de ouvidos, faringe e amígdalas ruborizadas, mal estar e ardência dos olhos (Heikkinen and Järvinen, 2003; Laham *et al.*, 2004; Peltola *et al.*, 2008; Lessler *et al.*, 2009; William J. Doyle *et al.*, 2010; Gavala, Bertics and Gern, 2012; Granados *et al.*, 2012; Cabeda *et al.*, 2014; L'Huillier *et al.*, 2015; Blaas and Fuchs, 2016a; Stone and Miller, 2016; Yamaya *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2016).

Todos estes sintomas são típicos de uma constipação que pode durar cerca de 7 dias, no entanto, o primeiro e segundo dia são os que apresentam sintomas de forma mais persistente e a partir deste, vão diminuindo. Contudo, os sintomas produzidos não são proporcionais à gravidade dos danos diretos causados no epitélio viral (Heikkinen and Järvinen, 2003; William J. Doyle *et al.*, 2010; Gavala, Bertics and Gern, 2012; Granados *et al.*, 2012; Stone and Miller, 2016).

As cargas virais não têm variações significativas entre pessoas infetadas em comunidade e a nível hospitalar, independentemente do tipo de RHV com que estão infetadas, nem entre diferentes faixas etárias (Laham *et al.*, 2004; Lessler *et al.*, 2009; William J. Doyle *et al.*, 2010; Gavala, Bertics and Gern, 2012; Granados *et al.*, 2012; Cabeda *et al.*, 2014; L'Huillier *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2016; Stone and Miller, 2016; Kamau *et al.*, 2018).

Segundo alguns estudos que utilizam métodos moleculares e culturas virais, demonstrou-se que o RHV é umas das principais etiologias das constipações, causando 2 a 3 episódios por pessoa num ano, tendo um período de incubação de 2 dias, um período de duração de 7 a 14 dias e a sua eliminação é, em geral, mais rápida nos adultos do que nas crianças, ao contrário daquilo que acontece com as infecções por influenza (Mackay, 2010;

William J. Doyle *et al.*, 2010; Granados *et al.*, 2012; Cabeda *et al.*, 2014; Pretorius *et al.*, 2014; Hasegawa *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2016; Kamau *et al.*, 2018).

### **2.5.2. Potencial de patologias graves**

A infecção por RHV foi associada a doença respiratória aguda grave e a constipações em vários estudos, já que foram detetadas diferenças significativas entre a prevalência de RHV em pacientes com estas doenças em relação ao grupo controlo (Pretorius *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2016).

Adicionalmente, o Rinovírus C foi associado a admissões hospitalares por problemas respiratórios, no entanto os RHV são detetados em igual proporção fora e dentro do ambiente hospitalar. Compreensivelmente, os doentes em ambiente hospitalar apresentem sintomas (essa é a razão para terem ido ao hospital), ao contrário da generalidade das infeções por RHV fora do ambiente hospitalar (Pretorius *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2016).

Em indivíduos saudáveis há pouca informação sobre a epidemiologia e características clínicas uma vez que, a infecção passa quase sempre despercebida, no entanto, os RHV têm capacidade de agravar situações de diabetes, DPOC, sibilância e asma, sendo esta última muito comum, o que indica que há diferenças na patogénese viral e na imunidade do hospedeiro (Heikkinen and Järvinen, 2003; Miller, 2010; Granados *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2016; Royston and Tapparel, 2016).

Ensaios para detetar o genoma viral *por Polymerase Chain Reaction* (PCR) realizados em indivíduos com doenças crónicas das vias aéreas mostram que há mais prevalência de infeções virais durante as exacerbações de doenças respiratórias crónicas (Hershenson, 2013).

#### **2.5.2.1. RHV e asma**

Uma vez que o RHV tem grande tropismo para as células epiteliais das vias aéreas, o epitélio respiratório torna-se um forte alvo. Numa situação normal, o epitélio respiratório funciona como uma barreira estrutural que impede a passagem de várias substâncias, faz a comunicação e coordena a atividade das células do SI inato ou adaptativo. Desde a traqueia até aos brônquios, o epitélio é pseudo-estratificado e colunar, é composto por

células epiteliais ciliadas (possuindo cada uma delas cerca de 200 cílios) que fazem o movimento mucociliar, sendo constituído também por outras células, tais como, as produtoras de muco e as secretoras de surfactante que são encontradas mais à periferia e são ausentes nos brônquios e ainda por células basais que parecem ser células tronco(*stem-cells*) pluripotentes encontradas em camadas, em grupos ou isoladas. Estas últimas podem ter um papel importante no crescimento e regeneração das vias aéreas (Carta, Silvestri and Rossi, 2013; Grainge and Davies, 2013; Blaas and Fuchs, 2016a).

Na asma, o epitélio respiratório apresenta danos evidentes, (*airway remodeling*). Este epitélio está mais suscetível à inalação de substâncias estranhas, ocorrendo a perda de células do epitélio colunar devido à sua má reparação, aparecimento de linfócitos *T helper* (Th<sub>1</sub>), corpos de Creola (agrupamento de células epiteliais ciliadas em cacho com mais de 100 células), produção de uma maior quantidade de células produtores de muco e células tronco (até 40 vezes mais do que o normal), isto pode significar uma desregulação celular e ciclos celulares contínuos de mau funcionamento e reparação característicos de doenças crónicas, no entanto, não há diferenças na morfologia e no funcionamento destas células (Miller, 2010; Gavala, Bertics and Gern, 2012; Defa *et al.*, 2013; Grainge and Davies, 2013; Hershenson, 2013).

A nível do funcionamento, a barreira epitelial das vias aéreas é mais permeável a substâncias e mais sensível ao stress oxidativo, para além disso, mostra uma deficiência na resposta do SI inato às infeções virais no trato respiratório quando comparado com indivíduos normais (Grainge and Davies, 2013; Clark D. Russell, Griffiths and Haas, 2014).

Nestes doentes o epitélio é hiperplásico e metaplásico, com um número exagerado de células caliciformes em diferenciação, sendo este um indício do início da doença (Gavala, Bertics and Gern, 2012; Grainge and Davies, 2013; Hershenson, 2013).

Os asmáticos apresentam ainda anomalias na Unidade Trófica Mesenquimal Epitelial (EMTU) que é um tecido conjuntivo indiferenciado, constituído pelo epitélio e a bainha de fibroblastos (Gavala, Bertics and Gern, 2012; Grainge and Davies, 2013).

No interior do EMTU, as células estruturais das vias aéreas trabalham em conjunto para controlar o microambiente deste local, incluindo reparação dos tecidos, recapitulação de respostas e vias de sinalização que contribuem para o crescimento pulmonar e desenvolvimento durante a embriologia, só que na asma o EMTU está desregulado. Assim, vai haver uma anormal regulação das respostas ao ambiente ou a fatores produzidos endogenamente, isto é, há um aumento da sensibilidade ao que é inalado.

No caso do recetor do fator de crescimento epidermal, quando é ativado controla a migração e proliferação das células. A regulação positiva da sua expressão é uma resposta normal à lesão, só que em situações de asma a reparação é mais demorada devido ao aumento da expressão do inibidor do ciclo celular – p21<sup>waf1</sup> – podendo ser induzida pelo Fator de crescimento e transformação  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) (Gavala, Bertics and Gern, 2012; Jackson *et al.*, 2012; Grainge and Davies, 2013).

Através de biopsias realizadas em adultos e crianças juntamente com estudos que utilizam forças mecânicas que mimetizam a força induzida pela broncoconstrição sabe-se que, nestas situações se desencadeia a sinalização mesenquimal epitelial e há um aumento da expressão do recetor do fator de crescimento epidermal, que por sua vez, está altamente envolvido no aumento da proliferação dos fibroblastos, na produção de fibronectina e colagénio do tipo III e V (Gavala, Bertics and Gern, 2012; Grainge and Davies, 2013).

Nos últimos 50 anos, a asma que se caracteriza por chiado, respiração rápida, hipoxia e hipoventilação aumentou significativamente e isto sugere que a etiologia deste aumento não se deve só a alterações genéticas, mas principalmente à exposição ambiental dos novos estilos de vida e também devido, por exemplo, ao baixo volume pulmonar ao nascimento, presença de doenças atópicas, aumento da intensidade da secreção de muco na infância quando as crianças são infetadas por vírus e elevada produção de interferão (IFN) 1 e 3 em resposta a infeções virais (Halfon and Newacheck, 1993; Hilty *et al.*, 2010; Gavala, Bertics and Gern, 2012; Defa *et al.*, 2013; Grainge and Davies, 2013; Esposito *et al.*, 2014; Manuscript *et al.*, 2014; Peden and Bush, 2015; Stone and Miller, 2016; Yamaya *et al.*, 2016, 2017; Huang *et al.*, 2016; Scagnolari *et al.*, 2017).

Fatores ambientais que estimulam a asma e que levam à sua exacerbação são por exemplo: os oxidantes provenientes da poluição ambiental, paracetamol, tabagismo, stress, vírus (como por exemplo o RHV) e agentes que causam a fragilidade da barreira (por exemplo: ácaros), isto porque todas as partículas ambientais inaladas interagem com o pulmão através do epitélio respiratório (Martinez, 2009; Miller, 2010; Gavala, Bertics and Gern, 2012; Grainge and Davies, 2013; Esposito *et al.*, 2014; Manuscript *et al.*, 2014; Miller and Peden, 2014; Peden and Bush, 2015; Herbert *et al.*, 2017).

Normalmente, um epitélio respiratório normal secreta no surfactante, que recobre as vias aéreas, defesas antioxidantes não enzimáticas (albumina, transferrina e lactoferrina) e defesas antioxidantes enzimáticas (glutathione-S-transferase, catalase e superóxido dismutase). Contudo, em indivíduos com asma estas defesas estão diminuídas, tornando-os mais sensíveis à apoptose mediada por oxidantes, o que diminui a barreira de defesa ao tabaco e a espécies reativas de oxigênio e azoto, permitindo que estas últimas causem danos oxidativos nas membranas lipídicas das células epiteliais, nas proteinases e no DNA epitelial (stress oxidativo) (Grainge and Davies, 2013).

Modelos animais de infecção por RHV têm sido utilizados para elucidar a imunologia da exacerbação da asma induzida por este vírus, permitindo que o estudo se faça em condições mais controladas (Grainge and Davies, 2013).

A partir de 1990, através do PCR foi possível comprovar que as exacerbações da asma eram causadas por infecções respiratórias virais na maioria das vezes, sendo o RHV responsável por 2/3 dessas infecções. Inicialmente questionava-se se o RHV provocava asma infetando diretamente o trato respiratório inferior ou se existia algum mecanismo que permitia que a infecção se propagasse ao trato respiratório inferior através da infecção inicial no trato respiratório superior. Contudo, o aparecimento de neutrófilos no lavado brônquico, a chamada de células T, eosinófilos e o aumento da expressão de ICAM-1 nas vias aéreas inferiores sugere que o RHV se replica neste mesmo local (Mackay, 2010; Gavala, Bertics and Gern, 2012; Granados *et al.*, 2012; Jackson *et al.*, 2012; Carta, Silvestri and Rossi, 2013; Defa *et al.*, 2013; Grainge and Davies, 2013; Manifesto, 2013; Saba *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2016; Yamaya *et al.*, 2017; Herbert *et al.*, 2017).

Desta forma o RHV é hoje reconhecido como um dos principais responsáveis pela exacerbação da asma em crianças e adultos podendo inclusive, aumentar a inflamação das vias aéreas, mas o risco parece ser diferente consoante o tipo de RHV que causa a infecção (Ann C Palmenberg *et al.*, 2009; Mackay, 2010; Gavala, Bertics and Gern, 2012; Granados *et al.*, 2012; Jackson *et al.*, 2012; Grainge and Davies, 2013; Palmenberg *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2016; Scagnolari *et al.*, 2017; Yamaya *et al.*, 2017). Em geral, o Rinovírus A e B têm maior capacidade de desencadear uma resposta imune por parte das crianças asmáticas do que o Rinovírus C, e por este mesmo motivo o Rinovírus C está mais associado a exacerbações da asma (Mackay, 2010; Granados *et al.*, 2012; Grainge and Davies, 2013; Huang *et al.*, 2016).

Alguns estudos indicam que se a sensibilização aos aeroalergénios for induzida por RHV em bebés ou crianças mais novas, aumenta o risco de sibilância no início de vida, levando ao desenvolvimento de infeções do trato respiratório inferior como asma por volta dos 6 anos de idade. Os mecanismos propostos para este acontecimento são interações entre os mecanismos inflamatórios inatos e alérgicos, que podem levar a doenças virais mais graves em indivíduos alérgicos, outro mecanismo poderá ser a inflamação alérgica levando ao comprometimento da barreira das células epiteliais e também da resposta antiviral do hospedeiro (Halfon and Newacheck, 1993; Ann C Palmenberg *et al.*, 2009; Mackay, 2010; Miller, 2010; Gavala, Bertics and Gern, 2012; Granados *et al.*, 2012; Jackson *et al.*, 2012; Defa *et al.*, 2013; Grainge and Davies, 2013; Hershenson, 2013; Palmenberg *et al.*, 2014; Esposito *et al.*, 2014; Yamaya *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2016).

Pensa-se que a asma, devido a infeções por RHV, seja mais comum em bebés e crianças porque os pulmões e o SI ainda estão em desenvolvimento, tornando estes mais vulneráveis pois desenvolvem respostas antivirais mais fracas e consequentemente desenvolvem doenças mais graves (Halfon and Newacheck, 1993; Ann C Palmenberg *et al.*, 2009; Mackay, 2010; Gavala, Bertics and Gern, 2012; Granados *et al.*, 2012; Jackson *et al.*, 2012; Grainge and Davies, 2013; Hershenson, 2013; Palmenberg *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2016).

O que se observa em situações de infecção por RHV em indivíduos com asma é um aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, incluindo eotaxina-1/CCL11, interleucina (IL)-4, IL-5 e IL-13, bem como um aumento do número de neutrófilos, mastócitos, eosinófilos e macrófagos broncoalveolares e pulmonares. Para além disso nota-se uma diminuição significativa no Volume Expiratório Forçado no primeiro segundo (FEV1), levando tudo isto a uma remodelação das vias aéreas. Dados *in vitro* sugerem respostas imunes inatas e adquiridas debilitadas em indivíduos com asma, incluindo indução de IFN- $\gamma$  e respostas Th1 deficientes, adicionalmente, o RHV pode estimular a síntese de fatores que regulam a remodelação. Os IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$  têm um papel importante no controlo das rinoviroses e no que diz respeito a prevenir respostas prejudiciais das Th2 (Mackay, 2010; S.B., 2011; Gavala, Bertics and Gern, 2012; Jackson *et al.*, 2012; Grainge and Davies, 2013; Manifesto, 2013; Hatchwell *et al.*, 2015; Peden and Bush, 2015; Alves *et al.*, 2016; Royston and Tapparel, 2016; Stone and Miller, 2016; Han *et al.*, 2016; Yamaya *et al.*, 2017; Herbert *et al.*, 2017).

Outra situação comum em asmáticos é o aumento das imunoglobulinas (Ig)E's e a sensibilização aos ácaros ou outro tipo de alérgenos que mostram ter influência na probabilidade de sibilância por RHV. Sabe-se que doenças sibilantes causadas por RHV durante a infância estão associadas à sibilância recorrente e ao desenvolvimento de asma até aos 6 anos, principalmente se essas crianças frequentaram a creche, já em crianças mais velhas e adultas as infeções por RHV levam ao aparecimento de doenças mais leves, contudo são reportadas exacerbações da asma também nestas faixas etárias. Isto apoia a hipótese de muitas doenças crónicas em adultos terem origem em patologias que ocorreram na infância (Halfon and Newacheck, 1993; Heikkinen and Järvinen, 2003; Martinez, 2009; Mackay, 2010; Miller, 2010; Gavala, Bertics and Gern, 2012; Stone and Miller, 2016).

Para além disso também há estudos que reportam que níveis do inibidor do ativador do plasminogénio 1 estão aumentados nas vias aéreas e nos fluidos de lavagem nasal dos pacientes asmáticos comparando com doentes sem asma e ainda mais elevados após a infeção viral. Numa situação de fisiologia normal, isto é, sem asma e sem infeção por

RHV, este mediador inibe os dois sistemas (fibrinolítico e metaloproteinase da matriz extracelular) que facilitam a remodelação das vias aéreas (Peden and Bush, 2015).

#### **2.5.2.2. RHV e DPOC**

Um doente com DPOC caracteriza-se por apresentar bronquite crónica e enfisema, que se repercute numa diminuição significativa do pico de fluxo expiratório pós broncodilatador e da capacidade de difusão de monóxido de carbono (Martinez, 2009; Mackay, 2010; Carta, Silvestri and Rossi, 2013; Hershenson, 2013; Manifesto, 2013; Saba *et al.*, 2014; Han *et al.*, 2016; Yamaya *et al.*, 2017).

Numa situação de infeção por RHV estes doentes, para além das complicações referidas anteriormente vão apresentar níveis elevados de neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, linfócitos, IL-6 e IL-8, respostas deficientes de IFN's por parte dos macrófagos alveolares e baixos níveis de Fator de Necrose Tumoral (TNF)- $\alpha$  (Martinez, 2009; Mackay, 2010; Gavala, Bertics and Gern, 2012; Defa *et al.*, 2013)

Em situações de exacerbação de DPOC, há maior probabilidade de desenvolver uma infeção por RHV, uma vez que pequenas quantidades do vírus conseguem desenvolver infeção e sintomatologia. Já em ambulatório, 2/3 dos casos de exacerbações agudas de DPOC estão associadas a sintomas da constipação, sendo novamente o RHV a causa mais comum de infeção viral (Martinez, 2009; Mackay, 2010; Gavala, Bertics and Gern, 2012; Hershenson, 2013).

Através do aperfeiçoamento das técnicas de diagnóstico molecular, mais especificamente do PCR, foi possível perceber que 24 a 64% dos paciente com exacerbações de DPOC apresentavam vírus, sendo 50% desses o RHV, permitindo assim concluir que este é um patógeno ameaçador para a saúde destes doentes (Martinez, 2009; Mackay, 2010; Gavala, Bertics and Gern, 2012; Defa *et al.*, 2013).

#### **2.5.2.3. RHV e fibrose cística**

Tem sido documentado que a infeção por RHV pode aumentar a obstrução das vias aéreas na fibrose cística (Gavala, Bertics and Gern, 2012) causando exacerbação da doença (Hershenson, 2013), o que faz com que a infeção pro RHV seja mais frequentemente encontrada em doentes de fibrose cística com exacerbação da doença, do que nos que não

apresentam exacerbação (Hershenson, 2013). Este é um fator importante a ter em conta na gestão clínica destes doentes, já que se numa situação normal, o movimento dos cílios faz com que o muco arraste juntamente com ele as partículas que tem aderidas até à cavidade oral, sendo posteriormente deglutido e destruído no pH ácido do estômago, já em doentes com fibrose cística, a viscosidade, o pH e a composição do muco estão alterados, tornando os indivíduos mais suscetíveis à infecção por RHV (Blaas and Fuchs, 2016).

#### **2.5.2.4. RHV e pneumonia**

Na pneumonia adquirida na comunidade, o RHV é um dos patogéneos encontrados nas crianças, no entanto, é difícil estabelecer uma relação causa-efeito porque ocorrem infeções bacterianas e coinfeções virais em simultâneo em 60% dos casos. As pneumonias estão associadas a complicações muito graves principalmente em crianças com condições médicas crónicas subjacentes. Já nos adultos o RHV é identificado em poucos casos de pneumonias víricas, contudo, há registo de dois surtos de doenças respiratórias agudas associadas a RHV em idosos em que o RHV provocou uma considerável morbidade (Peltola *et al.*, 2008; Mackay, 2010; Miller, 2010; Granados *et al.*, 2012; Unger *et al.*, 2012; Defa *et al.*, 2013; Clark D. Russell, Griffiths and Haas, 2014; Saba *et al.*, 2014; Alves *et al.*, 2016).

#### **2.5.2.5. RHV em crianças e imunodeprimidos**

Estudos realizados na Finlândia em crianças infetadas com RNA de RHV e/ou DNA do Bocavirus Humano permitiram descobrir que as interações entre o hospedeiro e o vírus e entre diferentes vírus modulam a biologia das vias aéreas, levando a infeções respiratórias virais que são a principal causa de internamentos em crianças mais pequenas e, sobretudo, em lactentes (Halfon and Newacheck, 1993; Laham *et al.*, 2004; Carta, Silvestri and Rossi, 2013; Peden and Bush, 2015).

Um outro estudo sugere que a idade da infecção por RHV pode ser um fator importante no risco para o desenvolvimento da asma já que, em ratinhos recém-nascidos e ratinhos adultos infetados com RHV, observou-se que a resposta à infecção nos recém-nascidos, mas não nos adultos estava associada a um aumento da resposta com IL-25 e IL-13,

envolvendo a expansão de células linfoides inatas do tipo 2 secretoras de IL-13. Isto pode ser devido à função pulmonar imatura e suscetibilidade genética dos recém-nascidos, podendo-se ainda acrescentar que quase todos os bebês desenvolvem pelo menos uma infecção por RHV no primeiro ano após o nascimento (Carta, Silvestri and Rossi, 2013; Peden and Bush, 2015; Drysdale *et al.*, 2016).

Contudo existem outros vírus como: vírus sincicial respiratório, influenza e parainfluenza, entre outros, capazes de causar doenças relacionadas com o frio, podendo ocorrer em simultâneo otite média na população pediátrica (Alper *et al.*, 2009; Bisgaard *et al.*, 2010; Patel *et al.*, 2010; Stone and Miller, 2016).

Ainda relativamente a crianças, o RHV também está incluído na lista de patógenos respiratórios associados a infeções severas nas creches. O regresso às aulas em setembro coincide com exacerbações da asma e infeções, principalmente por RHV (Hershenson, 2013; Stone and Miller, 2016).

No que diz respeito a prematuros, 52 % apresentam infecção por um vírus respiratório, quando estão hospitalizados logo à nascença e estes têm tendência a ficar hospitalizados durante mais tempo e a utilizar suporte de ventilação (Bennett *et al.*, 2012; Carta, Silvestri and Rossi, 2013).

Posteriormente, estes mesmos bebês prematuros desenvolveram frequentemente displasia broncopulmonar e têm tendência a desenvolver doença pulmonar crónica da prematuridade possivelmente devido a hospitalização prolongada. Por norma, nestes casos, a infecção é assintomática, no entanto, quando apresentam sintomas, estes são atípicos, como falta de apetite e respiração descontrolada (Bennett *et al.*, 2012; Carta, Silvestri and Rossi, 2013).

No que diz respeito aos indivíduos imunocomprometidos, foi possível determinar por PCR em tempo real, que o RHV tem sido uma causa significativa de doenças respiratórias agudas e que a gravidade da infecção por este vírus, nestas pessoas, se assemelha a uma infecção pelo vírus influenza (Peirson, 2003; Shain and Clemens, 2008; Tapparel, Cordey, *et al.*, 2009; Tapparel, Junier, *et al.*, 2009; Mackay, 2010; L'Huillier *et al.*, 2015).

### **2.5.2.6. RHV e bronquiolite**

Em crianças hospitalizadas, a bronquiolite é a manifestação clínica mais comum da infecção por RHV, sendo responsável por 14% dos internamentos de infecções do trato respiratório inferior associado ao RHV. No entanto, existem estudos que suportam a hipótese de a bronquiolite ser causada por um outro agente patogénico e que o RHV causa uma infecção secundária ou então co-infecção, tornando neste último caso a doença mais grave. Pensa-se que o RHV poderá estar envolvido na infecção primária quando existem marcadores de suscetibilidade ou quando ocorre em imunocomprometidos. Na infância a bronquiolite associada à infecção por RHV está relacionada com o risco de sibilância e desenvolvimento de asma a longo prazo (Mackay, 2010; Miller, 2010; Gavala, Bertics and Gern, 2012; Defa *et al.*, 2013; McIntyre, Knowles and Simmonds, 2013; Hasegawa *et al.*, 2015; L’Huillier *et al.*, 2015; Drysdale *et al.*, 2016; Alvarez *et al.*, 2018).

### **3. Resposta imunológica à infecção viral**

Em espécies com elevado número de serótipos, como é o caso do RHV, a proteção imunológica é reduzida porque os antigénios dominantes são específicos e variáveis entre serótipos, sendo este um dos motivos pelo qual ainda não foi possível criar uma vacina contra este vírus (Cabeda *et al.*, 2014; Royston and Tapparel, 2016).

Quando o vírus entra em contacto com o hospedeiro, a primeira barreira à infecção é o epitélio nasal. No entanto, nem sempre este é suficiente para impedir a passagem do RHV, permitindo a infecção das células por estes vírus. Assim que os RHV são detetados pelo SI, começa a desenvolver-se uma resposta por parte deste para eliminar estes corpos estranhos, que tem sido associada a danos e remodelações nas vias aéreas. Inicialmente, há uma ligação entre antigénios virais reconhecidas pelos recetores TLR ou LRLR presentes nas células imunológicas (Halfon and Newacheck, 1993; Cabeda *et al.*, 2014; Royston and Tapparel, 2016).

Os recetores TLR-3, TLR-7 e TLR-8 respondem a antigénios no interior da célula enquanto o TLR-2 atua na superfície da célula. Estes reconhecimentos levam à ativação de cascata de sinalização que por consequência ativa fatores de transcrição como Fatores Reguladores do Interferão (IRF)-3, IRF-7 e NF- $\kappa$ B, levando à expressão de interferões do

tipo I e de vários genes de citocinas (Heikkinen and Järvinen, 2003; Gavala, Bertics and Gern, 2012; Saba *et al.*, 2014; Hatchwell *et al.*, 2015; Han *et al.*, 2016; Royston and Tapparel, 2016; Yamaya *et al.*, 2016; Herbert *et al.*, 2017; Alvarez *et al.*, 2018).

Os LRLR produzem o mesmo efeito que os TLR, mas para se desencadear uma resposta estes ativam a molécula adaptadora mitocondrial MAVS. Este recetor produzido pelos genes RIG-I, MDA-5 e LGP-2, permite reconhecer o genoma viral (Heikkinen and Järvinen, 2003; Gavala, Bertics and Gern, 2012; Royston and Tapparel, 2016).

Em geral, os Picornavirus não exibem o 5' trifosfato, pois nesse local encontra-se a Proteína associada ao Genoma viral (VPg) que é reconhecida pelo produto do gene MDA-5 que atua como um recetor de reconhecimento padrão (Mackay, 2010; Cabeda *et al.*, 2014; Saba *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2016; Royston and Tapparel, 2016).

O SI também responde à presença do RHV através de uma resposta pro-inflamatória, com produção de citocinas como bradicinina, IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-6 e IL-8, ativação e atração ao local de infeção de granulócitos, macrófagos, células dendríticas e monócitos. Posteriormente ocorre a produção de IgA (ao nível das mucosas), IgM e IgG. Estes últimos demoram cerca de 2 a 3 semanas a aparecer mas não desaparecem facilmente, sendo detetados durante 1 ou mais anos, (principalmente nos adultos), conferindo proteção contra reinfeções pelo mesmo serotipo. Alguns destes anticorpos são neutralizantes, já que ligando-se a antigénios virais, bloqueiam a ligação do vírus aos seus recetores celulares. Assim, estes anticorpos impedem a entrada dos vírus nas células e a transmissão viral. Esta imunidade adquirida passa de mãe para filho e é muito eficaz, apesar de ser pouco duradoura e só atuar no mesmo serotipo viral que a desencadeou (Mackay, 2010; Jackson *et al.*, 2012; Carta, Silvestri and Rossi, 2013; Cabeda *et al.*, 2014; Saba *et al.*, 2014; Blaas and Fuchs, 2016a; Yamaya *et al.*, 2016, 2017; Chen *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2016; Royston and Tapparel, 2016; Pyle *et al.*, 2017).

O RHV pode ser detetado por recetores de reconhecimento viral, como por exemplo o TRL-3 ao nível dos endossomas, o que leva a ativação do IRF-3 e consequentemente, à indução do IFN- $\beta$  para atuar a nível autócrino e parácrino, ativação de outros IFN's (como

o IFN 5 e 7) e ativação dos genes envolvidos na sinalização imunológica e apoptose. Todos estes mecanismos de defesa por parte do organismo desencadeiam a apoptose das células infetadas e uma consequente diminuição da replicação viral, limitando a disseminação do vírus dentro do epitélio e nos tecidos mais profundos. Contudo, estudos *in vitro* mostram que as células do epitélio brônquico de pessoas com asma (especialmente com asma moderada ou severa) não conseguem produzir quantidades normais de IFN- $\beta$  e IFN- $\lambda$  em resposta à infecção por RHV, devido ao aumento da produção de TGF- $\beta$  ou ao bloqueio da produção de TGF- $\beta$  nestas células. No entanto, a atividade por exemplo do IFN- $\lambda$  é crucial na defesa do hospedeiro contra infecções por RHV sendo estas as principais causas de uma resposta anormal ao RHV pois com a redução na produção de IFN ocorre uma redução da apoptose e consequentemente replicação viral e propagação da infecção pelo RHV (Carta, Silvestri and Rossi, 2013; Defa *et al.*, 2013; Grainge and Davies, 2013; Manifesto, 2013; Hatchwell *et al.*, 2015; Han *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2016; Scagnolari *et al.*, 2017).

O que sucede numa situação normal é que o IFN protege contra a infecção e reduz as respostas inflamatórias induzidas pelo vírus. Assim, uma resposta pro-inflamatória adequada é aquela que consegue atenuar a infecção viral, sem causar uma inflamação exagerada das vias aéreas porque isso poderá levar a danos no hospedeiro, como por exemplo uma exacerbação da asma em vez de proteger da infecção (Carta, Silvestri and Rossi, 2013; Huang *et al.*, 2016).

### **3.1. Resposta inata e os TLR**

A resposta imunes inata tem como objetivo combater a infecção de modo rápido e eficiente, sem necessitar de contacto prévio com o agente desta. Este é um processo que envolve recetores especializados em muitas células do SI e que exige uma coordenação minuciosa (Lee *et al.*, 2007).

Um dos possíveis estímulos para a resposta do SI inato é a formação da cadeia dupla de RNA. Embora estas respostas não tenham tanta especificidade como o sistema adaptativo do hospedeiro, têm um papel importante no controlo da infecção pelo RHV, mas os mecanismos envolvidos não estão totalmente esclarecidos. Sabe-se, contudo, que após a

formação da cadeia dupla de RNA se desenvolve uma resposta envolvendo interferões tipo I mediada pelo MDA-5 (Laham *et al.*, 2004; Mackay, 2010; Triantafilou *et al.*, 2011; Gavala, Bertics and Gern, 2012; Hershenson, 2013; Manifesto, 2013; Huang *et al.*, 2016; Royston and Tapparel, 2016).

Os recetores TLR têm um papel muito importante no SI inato, sendo responsáveis pelo reconhecimento genérico de vírus, bem como de RNA citoplasmático dos mesmos (utilizando o RIG-I e MDA-5) através do TLR-2 que possui a capacidade de detetar padrões moleculares da cápside do vírus, o que ocorre mesmo na ausência de replicação e antes de o vírus infectar a célula alvo. Se, no entanto, o vírus infectar a célula, a cadeia de RNA simples passa para o interior desta, dando início à replicação viral, originando um intermediário de RNA de cadeia dupla. Esta vai ser reconhecida pelo TLR-3. Por outro lado, o TLR-7 e TLR-8 reconhecem o RNA viral de cadeia simples, o que parece importante na clearance viral já que se falhar a sinalização do TLR 7, ocorre uma produção deficiente de IFN e inflamação exagerada provocada por Th2 (Laham *et al.*, 2004; Slater *et al.*, 2010; Mackay, 2010; Triantafilou *et al.*, 2011; Gavala, Bertics and Gern, 2012; Hershenson, 2013; Manifesto, 2013; Saba *et al.*, 2014; Hatchwell *et al.*, 2015; Han *et al.*, 2016; Huang *et al.*, 2016; Royston and Tapparel, 2016).

Os TLR são assim importantes no despoletar da resposta imunológica (Huang *et al.*, 2016), sendo a expressão de alguns deles negativamente controlados pelo Tollip (*Toll Inhibitor*). Estudos recentes propõem que o Tollip tenha também alguma função na autofagia, outros estudos têm sido realizados para avaliar e perceber o papel do Tollip na variação das respostas das vias aéreas quando ocorre uma infecção por RSV num indivíduo com asma (Huang *et al.*, 2016).

A ligação dos TLR aos seus ligandos levam à ativação da cascata de sinalização que, por consequência, ativa fatores de transcrição como IRF-3, IRF-7 e NF- $\kappa$ B e que, por sua vez, estes levam à expressão dos interferões de tipo I e de vários genes de citocinas pro-inflamatórias como IL-1 $\beta$  (interage com neutrófilos desencadeando um aumento da fagocitose), TNF- $\alpha$  (intervém na quimiotaxia de neutrófilos nos pulmões), IL-6 (responsável pela febre, pela produção de componentes de fase aguda e anticorpos), IL-

8 (induz neutrófilos mais potentes) e IL-12 (responsável pela modificação das respostas das células T CD4+ para Th1 em resposta à ativação de células NK) e posteriormente ocorre a chamada de células inflamatórias ao local tais como neutrófilos, eosinófilos, células T e ainda Ligando de Quimiocina de Motivo C-X-C (CXCL) 8, CCL5, CCL11 e CXCL10, que têm um papel importante na patogênese pois quando a doença é grave observam-se elevados níveis de citocinas inflamatórias e quimiocinas produzidas pela imunidade inata nas secreções respiratórias (Laham *et al.*, 2004; Mackay, 2010; Slater *et al.*, 2010; Gavala, Bertics and Gern, 2012; Defa *et al.*, 2013; Hershenson, 2013; Blaas and Fuchs, 2016a; Huang *et al.*, 2016; Royston and Tapparel, 2016; Herbert *et al.*, 2017).

O primeiro passo do SI contra a infecção viral é o contacto das células monocíticas com o epitélio das vias aéreas, tanto superiores como inferiores. Existem evidências de que este primeiro passo é capaz de influenciar toda a resposta imune posterior podendo ter repercussões na exacerbação da asma. Para além disso, a protease 3C também está associada à ativação celular e expressão de citocinas (Lee *et al.*, 2007).

Embora ainda haja muito por descobrir relativamente à resposta imunológica às células infetadas com vírus, sabe-se que a primeira linha de defesa das células epiteliais numa situação destas é a libertação de IFN variados, citocinas, quimiocinas e outros mediadores inflamatórios que induzem o influxo de leucócitos e promovem a inflamação respiratória. Adicionalmente, são ainda produzidos fatores de crescimento que prolongam a vida útil dos leucócitos e contribuem para a remodelação das vias aéreas nos pulmões de doentes asmáticos (Lee *et al.*, 2007; Patel *et al.*, 2010; Scagnolari *et al.*, 2017).

O aumento do número total de leucócitos, deve-se possivelmente ao aumento do número de neutrófilos, estes permitem uma diminuição da quantidade de vírus que infetam as células, no entanto estão associados à obstrução das vias aéreas, sintomas específicos do trato respiratório, exacerbações de doenças respiratórias e também aumento da broncoconstrição em resposta a compostos irritantes, o que é muito comum na asma. Assim sendo, percebe-se que uma estratégia para diminuir a gravidade das infeções por RHV seja modelar as respostas inflamatórias neutrófilas (Lee *et al.*, 2007; Mackay, 2010; Hatchwell *et al.*, 2015).

Uma via para o fazer é através da IL-8 a qual possui propriedades quimiotáticas e de ativação de neutrófilos e leucócitos que são importantes na resposta à infecção por RHV. Se estas propriedades não forem controladas podem levar a lesões tecidulares e efeitos sistémicos prejudiciais (Mackay, 2010; Slater *et al.*, 2010; Gavala, Bertics and Gern, 2012; Esposito *et al.*, 2014).

Com efeito, observou-se que SNP's de IL-8 estavam correlacionados com a gravidade dos sintomas, como por exemplo concentrações elevadas de cininas, rinorreia, sibilância e obstrução nasal. Isto acontece quando os níveis de TLR 3 são elevados devido à infecção por RHV. Com efeito, há evidências de que a heterozigotia (TC) para o rs53752291 (TLR 3) está associada a um risco elevado para desenvolver bronquiolite e a homozigotia (CC) para o rs53752291 (TLR 3) está associada a sibilância recorrente (Mackay, 2010; Slater *et al.*, 2010; Gavala, Bertics and Gern, 2012; Esposito *et al.*, 2014; Alvarez *et al.*, 2018).

Já os níveis de IL-6 estão constantemente elevados em situações de infecção, e descobriu-se que o polimorfismo de genótipo C/C se correlaciona com a gravidade da doença (Mackay, 2010; Slater *et al.*, 2010; Gavala, Bertics and Gern, 2012; Pyle *et al.*, 2017).

### **3.2. Polimorfismos em genes do Sistema Imunológico**

As variações nas respostas das vias aéreas às infeções por RHV podem ser devido à virulência do patógeno ou a variações genéticas, como por exemplo os SNP's em genes do SI (Clark D. Russell, Griffiths and Haas, 2014; Esposito *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2016; Toivonen *et al.*, 2016).

São conhecidos vários SNP's em genes do SI, alguns dos quais com potencial para modular a resposta a vírus em geral e ao RHV em particular (Esposito *et al.*, 2014; Huang *et al.*, 2016).

O SNP rs5743899 do gene TOLLIP, consiste numa variação A/G, pelo que os indivíduos podem ser portadores dos genótipos AA, GG ou AG. O genótipo AG é mais frequente em indivíduos asmáticos do que em indivíduos normais, já o genótipo GG é pouco frequente em ambas as populações. Indivíduos asmáticos que apresentam genótipos AG ou GG do Tollip, têm células epiteliais traqueobrônquicas com pouca quantidade de

Tollip e uma relação FEV1/ Capacidade Vital Forçada (FVC) menor do que a esperada, quando comparados com indivíduos asmáticos que apresentam o genótipo AA. Isto permite inferir que, os indivíduos asmáticos portadores do alelo G apresentam uma maior limitação no fluxo de ar (Huang *et al.*, 2016).

Quanto à atividade autofágica, conseguiu-se confirmar uma correlação positiva entre esta e o Tollip, sendo que na presença de RHV, as células com genótipos AG ou GG mostraram uma autofagia diminuída em comparação com aquelas que têm o genótipo AA. Em geral, consegue-se perceber que os polimorfismos no Tollip estão envolvidos na fisiopatologia da asma (Huang *et al.*, 2016).

No que diz respeito à produção de citocinas pró-inflamatórias em células infetadas por RHV, quando se compara os genótipos TOLLIP AG ou GG com o genótipo AA, os primeiros produzem mais IL-8 e mais eotaxina-3 (devido ao aumento da produção de IL-13), menor expressão de genes antivirais e maior atividade de NF- $\kappa$ B e por isso, estes indivíduos podem desenvolver uma inflamação neutrófila exagerada após uma infecção por RHV. A IL-6 não apresenta uma variação significativa com os diferentes genótipos de TOLLIP (Huang *et al.*, 2016).

Relativamente à expressão de genes antivirais em células epiteliais traqueobrônquicas expostas a RHV, verifica-se um aumento da expressão de IFN- $\lambda$ 1, que é ainda mais acentuado na presença de IL-13, principalmente nas células com genótipo AA. Já as células que apresentam genótipo AG ou GG, mostram uma baixa expressão de IFN- $\lambda$ 1. Tal como já foi referido anteriormente, o IFN- $\lambda$ 1 tem um papel muito importante na defesa do hospedeiro contra infecções virais pois induz genes como o Mx1, com atividade antiviral direta os quais vão, por isso, sofrer também um aumento ou diminuição da sua expressão, consoante o genótipo da célula. Quanto menos IFN- $\lambda$ 1 mais graves se apresentam os sintomas e maior a carga viral (Clark D. Russell, Griffiths and Haas, 2014; Huang *et al.*, 2016; Scagnolari *et al.*, 2017).

No entanto, quando se avaliou em laboratório ratinhos sem Tollip infetados por RHV, verificou-se que os níveis de inflamação neutrófila pulmonar e carga viral eram mais

elevados e os níveis de expressão génica antiviral mais baixos quando expostos a ácaros (Huang *et al.*, 2016).

As citocinas, sendo, por excelência, as moléculas de comunicação entre as células do SI e estas e as restantes células do corpo, são responsáveis por coordenar as respostas imunológicas durante as infeções do trato respiratório superior. Com efeito, nas secreções nasais de pessoas com sinais e sintomas de infeção por RHV são detetáveis níveis significativos de IL-1, IL-6, IL-8 e IL-10 (William J. Doyle *et al.*, 2010).

Apesar de ainda haver pouca informação sobre o papel do polimorfismo de citocinas na modulação das respostas do hospedeiro a uma infeção do trato respiratório superior, tal como acontece com o gene TOLLIP também existem SNPs em genes de citocinas, sendo o mais discutido nas infeções virais, o polimorfismo na posição -174 do gene IL6 (rs1800795). Por exemplo, os genótipos de IL-6 podem influenciar a imunogenicidade das vacinas contra o vírus da gripe (Patel *et al.*, 2010; William J. Doyle *et al.*, 2010; Pyle *et al.*, 2017).

Um estudo realizado por Patel *et al.* com a finalidade de comparar a distribuição dos polimorfismos TNF- $\alpha$  (rs1800629), IL-1 $\beta$  (rs16944) e IL-6(rs1800795) em grupos de crianças com e sem história de otite média obteve resultados um pouco discordantes em relação a outros estudos. Segundo Patel *et al.* a elevada produção do fenótipo TNF- $\alpha$  e IL-6 são frequentes no grupo com otite média. No entanto os outros estudos concordam que o genótipo C/C é o envolvido nas variações relacionadas com o fenótipo IL-6 só que Patel *et al.* dizem que este é produzido em grande quantidade em situações de OM e os outros estudos mostram que é produzido em baixa quantidade. Uma vez que Patel *et al.* foi o único a obter este resultado, acredita-se que a baixa produção de IL-6 (genótipo CC) e elevada produção de TNF- $\alpha$  é que são fatores predisponentes para otite média em simultâneo com infeção por RHV, uma vez que quanto mais baixa a produção de IL-6 mais sintomas e complicações estão associados às infeções. Observa-se um efeito contrário quando estão em causa os genótipos CG ou GG (Alper *et al.*, 2009; Patel *et al.*, 2010; William J. Doyle *et al.*, 2010; Yamaya *et al.*, 2016; Pyle *et al.*, 2017).

Outros estudos foram realizados para comparar as distribuições de polimorfismos de citocinas em populações de crianças propensas para otite média e populações não propensas uma vez que se sabe que as citocinas pro- e anti-inflamatórias modulam a resposta imunológica do hospedeiro à infecção e outros estímulos e também estão associadas a algumas complicações. Foram analisados polimorfismos nos genes TNFA, IL1B, IL4, IL6, IL8 e IL10 e foram reportadas diferenças entre os grupos nas distribuições dos genótipos IL6 e TNFA, sendo que para o TNFA os genótipos G/A ou A/A foram muito detetados e o G/G pouco detetado, já para o IL6 os genótipos G/G foram muito detetados e o C/C pouco. Com estes resultados percebe-se que há uma grande possibilidade de o polimorfismo em regiões promotoras de certas citocinas pro e anti-inflamatórias permitirem inferir o risco das crianças para desenvolver otite média durante uma infecção por um vírus respiratório (Alper *et al.*, 2009; Patel *et al.*, 2010; William J. Doyle *et al.*, 2010; ‘1876 JID 2011:203 (15 June) CORRESPONDENCE’, 2011).

Também as complicações ao nível do trato respiratório superior parecem estar ligadas à produção local de citocinas específicas, pelo que polimorfismos nos seus genes podem influenciar o risco para complicações associadas à infecção viral. Por exemplo, os resultados de um estudo feito em bebés hospitalizados com infecção por RHV revelaram uma associação significativa entre a elevada produção de IL-10 e a ocorrência de pneumonia e entre a baixa produção de IL-6 e doença severa (Alper *et al.*, 2009; Patel *et al.*, 2010; William J. Doyle *et al.*, 2010).

Doyle *et al.* mostraram que indivíduos que apresentem o genótipo CC para a IL-6 apresentam infecção do trato respiratório superior durante mais dias e com sintomas mais graves do que aqueles que são portadores do alelo G.

O SNP's no nucleótido -1082 do gene IL10 também pode ter um efeito significativo nas infeções por RHV em recém-nascidos, neste caso o alelo A faz com que os recém-nascidos sejam mais propensos a ser hospitalizados por bronquiolite causada por RHV do que aqueles que possuem o alelo G (Drysdale *et al.*, 2016; Alvarez *et al.*, 2018).

Apesar das grandes dificuldades no estudo de polimorfismos de citocinas, pois os resultados obtidos *in vitro* podem não estar relacionados com a produção de citocinas *in*

vivo na mucosa nasal, sangue, etc. e para além disso, poderem ocorrer interações entre polimorfismos que não foram alvo de estudo, mas que têm o potencial de interagir com os polimorfismos testados, há evidências suficientes para suportar a hipótese de que os genótipos de citocinas, principalmente da IL-6, estão envolvidas na modulação das infecções do trato respiratório superior (Alper *et al.*, 2009; William J. Doyle *et al.*, 2010; Pyle *et al.*, 2017).

A apoiar todos estes dados surge um estudo de Dayle *et al.* que avaliou a relação entre genótipos promotores de IL-6 e a magnitude dos sintomas durante a infecção por RHV. Constatou-se que o fenótipo de baixa produção de IL-6, correspondente ao genótipo CC do rs1800795), obteve sintomatologia mais grave. Este estudo foi concordante com os anteriores feitos para o RHV (Mackay, 2010; Pyle *et al.*, 2017).

Para além de SNP's em citocinas, também existem SNP's no gene que codifica para o recetor da vitamina D (importante na imunidade inata), que foram associados a desenvolvimento de infecções do trato respiratório inferior por RHV e ainda SNP's em TLR's que promovem a suscetibilidade ou proteção, dependendo do polimorfismo, a infecções respiratórias (Drysdale *et al.*, 2016; Toivonen *et al.*, 2016).

#### **4. Diagnóstico laboratorial**

##### **4.1. Colheita e processamento das espécies**

O RNA do RHV só é detetado nas células epiteliais, seios maxilares, células epiteliais de descamação de doentes com sinusite crónica bem como na cavidade do ouvido médio de crianças com otite média (Cabeda *et al.*, 2014).

As amostras para diagnóstico laboratorial devem ser colhidas nos primeiros 2 dias em que surgem os sintomas, pois é nessa altura que os títulos de RHV são mais altos no trato respiratório. No entanto, o vírus pode ser isolado desde 1 dia antes a 6 dias após o início dos sintomas (Mackay, 2010; Bochkov *et al.*, 2014; Cabeda *et al.*, 2014).

Para diagnóstico laboratorial de infecções do trato respiratório superior faz-se a colheita através de zaragatoas nasais, lavagens nasais ou aspirados nasofaríngeos, já para infecções do trato respiratório superior faz-se a colheita através de zaragatoas orofaríngeas. Caso

seja necessário fazer o transporte das amostras colhidas, este deverá ser feito a baixa temperatura e se por ventura a amostra não for analisada 2 dias após a sua colheita, deve ser congelada a -70 °C e transportadas em gelo seco (Myatt *et al.*, 2003, 2004; Heikkinen and Järvinen, 2003; Lau *et al.*, 2007; Spyridaki *et al.*, 2009; Mackay, 2010; Blaschke *et al.*, 2011; Gavala, Bertics and Gern, 2012; Hasegawa *et al.*, 2015; L'Huillier *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2016; Drysdale *et al.*, 2016; Kamau *et al.*, 2018).

Após isto, decide-se em que agente infeccioso irá assentar o estudo porque a pesquisa de muitos agentes patogénicos em simultâneo leva a dificuldades nas técnicas de deteção, principalmente em técnicas de deteção de antigénios e culturas virais (Blomqvist, 2004a; Kiang *et al.*, 2008; Bennett *et al.*, 2012; Dupouey *et al.*, 2014).

Relativamente à deteção antigénica e serológica, nenhuma delas é praticável para a deteção de uma infeção por RHV porque não há nenhum antigénio em comum entre todos os RHV e existem demasiados serotipos de RHV. Utilizar esta técnica implicaria utilizar um anti soro específico para cada serotipo, o que seria muito caro, trabalhoso e pouco sensível (Heikkinen and Järvinen, 2003; Lee *et al.*, 2007; Kiang *et al.*, 2008; Mackay, 2010; Granados *et al.*, 2012; Cabeda *et al.*, 2014).

De igual modo, a deteção de anticorpo não é possível para fins diagnósticos, uma vez que a ausência de um único antigénio em comum entre todos os serotipos origina habitualmente respostas primárias, o que só permite a deteção de níveis significativos de anticorpos 1 a 3 semanas após a infeção (Heikkinen and Järvinen, 2003; Lee *et al.*, 2007; Mackay, 2010; Granados *et al.*, 2012; Cabeda *et al.*, 2014).

#### **4.2. Culturas de vírus**

Os RHV são isolados originalmente de células renais de macaco, embora estas tenham a limitação de só suportarem o crescimento de alguns RHV (Blomqvist, 2004a; Mackay, 2010; Miller, 2010).

Num estudo realizado, demonstrou-se que as células WI-38 e células HeLa suscetíveis ao RHV eram um bom modelo devido a possuírem elevados níveis de expressão de ICAM's. Isto permite estudar a síntese de RNA viral, a tradução e processamento de proteínas,

localização de proteínas intracelulares e interferência nas funções das células do hospedeiro. Melhor do que isto seria utilizar a combinação de diferentes linhas celulares para obter os RHV nas melhores condições possíveis (Mackay, 2010; Herbert *et al.*, 2017).

As condições ideais para o crescimento do RHV em culturas celulares são pH neutro (uma vez que os RHV são sensíveis ao ácido) e incubação a 33°C (em vez de 36°C ou 37°C como é habitual em culturas celulares humanas), contudo, as diferenças observadas da replicação do vírus a esta temperatura ou a 36/37°C não são muito significativas (Mackay, 2010).

As culturas convencionais devem ser incubadas pelo menos 14 dias, no entanto, já surgiram métodos de confirmação mais rápidos que consistem em lâminas multicâmara contendo células HeLa suscetíveis a RHV. Estas lâminas multicâmara entram em contacto com o agente viral e permitem obter um resultado de imunofluorescência 48h após a infecção (Heikkinen and Järvinen, 2003; Mackay, 2010).

Comparativamente com as culturas convencionais estes métodos são mais sensíveis, no entanto, continuam a ser pouco utilizados porque o problema da ausência de um antígeno comum entre todos os RHV mantém-se, não permitindo obter resultados confiáveis e específicos (Heikkinen and Järvinen, 2003; Mackay, 2010).

### **4.3. Métodos moleculares**

Há apenas alguns anos atrás as dificuldades técnicas para o estudo molecular, evolutivo e epidemiológico do RHV eram significativas. Contudo, como se pode ver na Tabela 1, a evolução das tecnologias no estudo dos ácidos nucleicos nos últimos anos tem sido exponencial, permitindo hoje em dia a acessível sequenciação do genoma viral e a utilização de várias técnicas baseadas no PCR para o diagnóstico e estudo extremamente sensível e específico deste vírus (Heikkinen and Järvinen, 2003; Ann C Palmenberg *et al.*, 2009; Cabeda and Moreno, 2014; Palmenberg *et al.*, 2014).

O PCR, constituiu uma mais valia para o número crescente de deteções de vírus respiratórios tanto a nível do trato respiratório superior como inferior, principalmente em

**Tabela 1-** Cronologia do diagnóstico por DNA (Adaptado de Cabeda and Moreno, 2014)

<b>Data</b>	<b>Principais Desenvolvimentos</b>
1953	Descoberta da estrutura em dupla hélice do DNA
1958-59	Descoberta e isolamento de DNA polimerases
1960	Primeiras técnicas de hibridização e detecção eletroquímica de DNA
1965	Síntese enzimática de RNA
1969	Hibridização <i>in situ</i>
1970	Descoberta da transcriptase reversa e das enzimas de restrição
1975	Southrem Blot
1977	Métodos para sequenciação de DNA
1983-85	Primeira síntese de olinucleótidos modificados
1985-86	Invenção dos primeiros passos do PCR
1986	Automatização da sequenciação de DNA
1987-88	Descoberta das primeiras sondas de de DNA
1990	Aparecimento da nanotecnologia de DNA
1991	Ligase chain reaction
1992	Primeiros métodos para sequenciação do genoma
1992-93	PCR em tempo real
1995	Primeira bactéria ( <i>Haemophilus influenza</i> ) sequenciada
1996	Sondas moleculares beacon e primeiro eucariota é sequenciado
2000	Sequenciação genómica da mosca da fruta ( <i>Drosophila melanogaster</i> )
2001	Primeiras versões da sequenciação do genoma humano
2008	Publicada utilização de NGS para sequenciação do genoma de James Watson
2018	Lançamento comercial do primeiro sistema NGS de 4ª Geração

indivíduos com asma, bebês, idosos e imunocomprometidos porque melhorou a sensibilidade de detecção e aumentou a diversidade de Picornavírus detetáveis. Para além disso, este método tornou-se uma alternativa muito vantajosa ao crescimento fastidioso do RHV em culturas celulares (Heikkinen and Järvinen, 2003; Lee *et al.*, 2007; Mackay, 2010; Bennett *et al.*, 2012; Granados *et al.*, 2012; Carta, Silvestri and Rossi, 2013; Bochkov *et al.*, 2014; Cabeda and Moreno, 2014; L’Huillier *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2016).

#### **4.3.1. Técnicas de Amplificação de Ácidos Nucleicos**

A PCR foi criada em 1984 por Kary Mullis, serve para analisar pequenas quantidades de DNA através da produção de muitas cópias da amostra que existia inicialmente. Esta nova técnica é simples, aumenta a taxa de detecção de RHV e permite diagnósticos mais rápidos, em poucas horas e a baixo custo. Este método de diagnóstico permite determinar cargas virais, proliferação dos vírus e monitorizações de respostas aos tratamentos (Heikkinen and Järvinen, 2003; Mackay, 2010; Blaschke *et al.*, 2011; Bennett *et al.*, 2012; Granados *et al.*, 2012; Bochkov *et al.*, 2014; Cabeda and Moreno, 2014; Hasegawa *et al.*, 2015; L’Huillier *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2016).

No caso do RHV, a maioria das reações de PCR tem como alvo a região 5’UTR. Esta é uma região conservada em todos os RHV, mas também nos Enterovírus, o que coloca a possibilidade de haver reações cruzadas e consequentemente, haver dificuldade na diferenciação. Por norma utiliza-se este alvo quando se pretende uma maior sensibilidade para a detecção do genoma do RHV e usa-se como alvo as sequências de genes estruturais (VP4/VP2 e VP1) amplificadas para identificação da espécie viral. Alternativas para executar esta diferenciação são por exemplo: *Restriction Fragment Length Polymorphism* (RFPL), hibridização com sondas específicas de RHV, RT-PCR seguido de sequenciação, RT-PCR em tempo real, etc. (Peirson, 2003; Heikkinen and Järvinen, 2003; Lau *et al.*, 2007; Shain and Clemens, 2008; Mackay, 2010; Granados *et al.*, 2012; Carta, Silvestri and Rossi, 2013; Bochkov *et al.*, 2014; Hasegawa *et al.*, 2015; L’Huillier *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2016; Kamau *et al.*, 2018).

Para além de PCR, também se usam reações isotérmicas e de amplificação para a deteção de RHV, sendo que a alternativa mais usada é a NASBA. Esta técnica mostrou um desempenho comparável ao RT-PCR e uma sensibilidade superior à das culturas virais (Batsch *et al.*, 2008; Mackay, 2010).

Com isto, alguns vírus que antes só podiam ser analisados em alguns laboratórios mais sofisticados, agora podem ser analisados rapidamente na maioria das instalações de microbiologia. Isto foi uma mais valia porque permitiu obter mais dados sobre a elevada incidência de infeções por RHV, identificar a capacidade de infeção e novas espécies de RHV, levando a uma maior atenção e consciencialização das manifestações disseminadas e por vezes graves da doença provocada por RHV (Heikkinen and Järvinen, 2003; Blomqvist, 2004a; Mackay, 2010; Bochkov *et al.*, 2014; Chen *et al.*, 2016).

No entanto, isto só foi utilizado para RHV em casos especiais e só em alguns laboratórios, pois acreditava-se que as infeções por RHV não levavam a problemas graves, sendo a maior parte das vezes o responsável por constipações comuns e por isso, não mereciam o esforço e tempo requerido por parte destes. Contudo, com o aumento dos conhecimentos acerca deste vírus e com o aumento da sua incidência em doenças mais graves, surgiu uma preocupação maior, sendo que no final nos anos 80 notou-se a importância da inclusão de várias técnicas para a deteção de vírus respiratórios que permitiram compreender melhor os mecanismos patológicos e servem de base para o diagnóstico e investigação científica, tais como RT-PCR e RT-PCR em tempo real, PCR multiplex, Nested PCR e PCR digital tanto a nível da comunidade como a nível hospitalar (Peirson, 2003; Heikkinen and Järvinen, 2003; Blomqvist, 2004a; Lau *et al.*, 2007; Shain and Clemens, 2008; Tapparel, Cordey, *et al.*, 2009; Mackay, 2010; Granados *et al.*, 2012; Bochkov *et al.*, 2014; Cabeda and Moreno, 2014; Hasegawa *et al.*, 2015; L'Huillier *et al.*, 2015; Chen *et al.*, 2016).

#### **4.3.1.1. RT-PCR**

A RT-PCR é o melhor método de diagnóstico que permite detetar vírus de RNA, como é o caso do RHV (Lau *et al.*, 2007; Spyridaki *et al.*, 2009; Osterback *et al.*, 2013; Cabeda and Moreno, 2014).

Quando se recorre a este método, utiliza-se habitualmente como amostra secreções nasais, sendo analisada a região 5'UTR do genoma do RHV. Esta tecnologia, para além de ser rápida e precisa na deteção de RHV, permitiu descobrir que a carga viral de lactentes e crianças pequenas infetadas pelo mesmo era significativamente elevada quando comparada com adultos, para além de possibilitar a caracterização de serótipos de RHV (Osterback *et al.*, 2013).

Contudo, há uma limitação da RT-PCR que é a similaridade entre RHV e Enterovirus, pois torna a deteção mais complexa (Osterback *et al.*, 2013).

#### **4.4. Sequenciação e genotipagem**

Através do crescimento do RHV em culturas conseguiu-se fazer a divisão destes em dois grupos: os que usam os recetores ICAM's e os que usam os LDLR. De seguida, com base em 15 compostos antivirais conseguiu-se agrupar os 160 serótipos de RHV em Rinovírus A e B. Com o advento do PCR foram diferenciados em 3 grupos geneticamente diferentes: Rinovírus A, B e C. (Blomqvist, 2004; Mackay, 2010; Granados *et al.*, 2012; L'Huillier *et al.*, 2015; Alves *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2016; Stone and Miller, 2016).

O desenvolvimento de técnicas como a sequenciação e genotipagem permitiu avaliar as cargas virais de RHV e diferenciar os RHV em A, B e C, no entanto não permite a diferenciação de estirpes dentro dos grupos, portanto, esta caracterização genética serve principalmente para a identificação de fontes de surtos, investigação de graus de parentesco ou aparecimento de uma estirpe ainda não caracterizada (Lee *et al.*, 2007; Mackay, 2010; Granados *et al.*, 2012; Bochkov *et al.*, 2014).

No RHV os genes VP1 a VP4 são os mais utilizados para genotipagem viral, no entanto, a análise da sequenciação pode ser feita noutras regiões do genoma, como por exemplo nos genes da RNA polimerase, região 5'UTR ou região P1 e P2(Blomqvist, 2004; Mackay, 2010; Granados *et al.*, 2012; L'Huillier *et al.*, 2015; Alves *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2016; Stone and Miller, 2016).

Em 2009 foram publicadas as sequencias genómicas de todos os RHV e utilizadas para a sua classificação filogenética (figura 2). Estes dados revelaram a diversidade genética

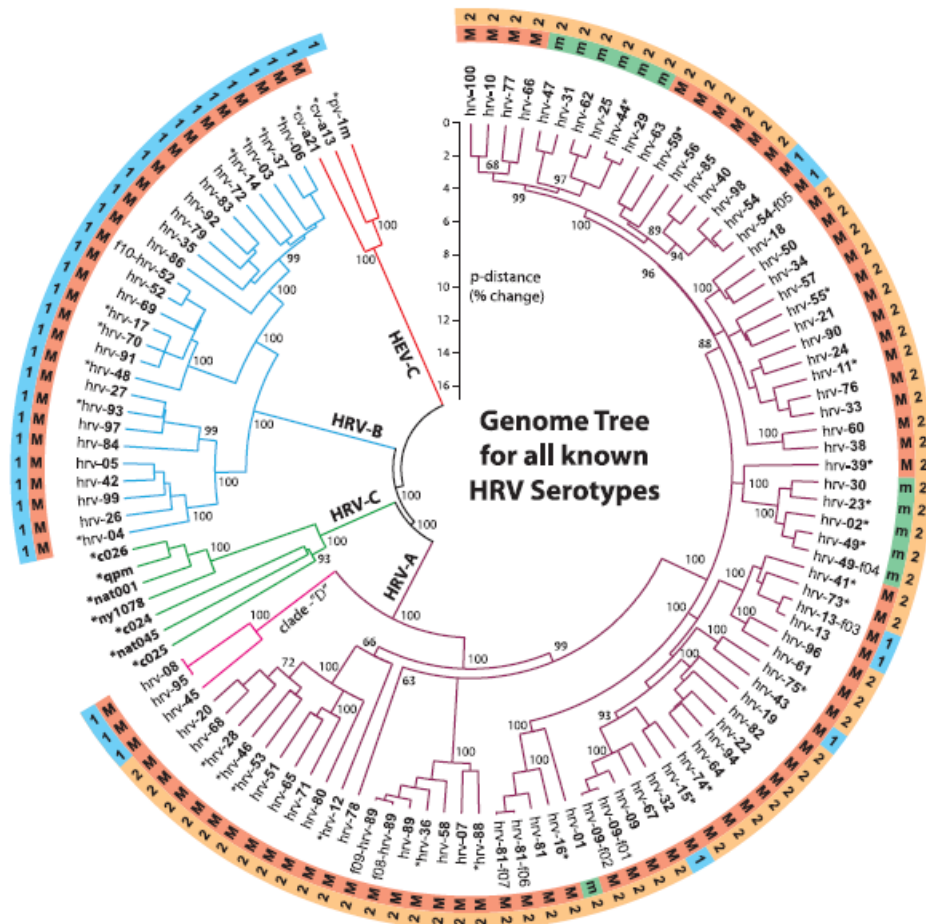
existente nas regiões VP1 a VP4, o que permitiu identificar recombinações entre RHV, perceber o que torna algumas estirpes mais virulentas do que outras e o que as torna mais propensas a causar infecções crônicas, identificar o tropismo para determinadas células ou tecidos e ainda, perceber o direcionamento para diferentes pacientes e suas predisposições genéticas para situações mais graves (Halfon and Newacheck, 1993; Ann C. Palmenberg *et al.*, 2009; Mackay, 2010; Chen *et al.*, 2016).

A sequenciação de ácidos nucleicos foi um grande avanço na genética e foi descrita pela primeira vez por Sanger em 1977. Tal como o próprio nome indica permite determinar a sequência de nucleótidos. Os nucleótidos são constituídos por polímeros que não têm composição regular porque embora todos sejam constituídos pelos mesmo monómeros, estes dispõem-se de forma diferente, o que permite uma enorme diversidade das suas funções moleculares, daí ser importante a sequenciação (Cabeda and Moreno, 2014).

Esta técnica foi sofrendo alterações ao longo do tempo de forma a se tornar automática e com elevada rentabilidade, designando-se esta fase de alterações como sequenciação de próxima geração ou sequenciação de 2º, 3º e mais recentemente 4º geração (Cabeda and Moreno, 2014).

A técnica de 1ª geração, também conhecida como método de sequenciação de Sanger é uma técnica com 99,9% de precisão que permite sequenciar fragmentos com aproximadamente 1000 pares de bases. Contudo esta técnica permite apenas obter uma sequenciação em cada ensaio por isso, é essencial garantir uma elevada quantidade de DNA molde e elevada sensibilidade de deteção dos produtos de reação. De uma forma muito simplificada, este é um método enzimático que se baseia numa reação simples de polimerização onde é preciso conhecer a sequência da extremidade 5' da zona a sequenciar para se desenvolver um primer (pequeno oligonucleótido com sequência complementar á da cadeia a sequenciar) que vai fornecer uma extremidade 3' livre para a DNA polimerase incorporar os nucleótidos complementares da cadeia molde que está a ser sequenciada. Este processo termina quando o nucleótido incorporado é um terminador (didesóxi). De seguida faz-se uma separação dos produtos da reação por eletroforese, o tamanho revela a posição em que cada nucleótido terminador surge (diferenciados por

fluorescência) sucessivamente na cadeia complementar, daqui se deduzindo a sequência nucleotídica (Cabeda and Moreno, 2014).



**.Figura 2-** Árvore filogenética de todos os serotipos conhecidos de RHV até 2009 (Adaptado de Palmenberg, 2009).

As técnicas de 2ª geração já permitem milhares a milhões de sequenciações em paralelo, permitindo obter milhões de pequenas sequências em cada ensaio. As reações de sequenciação são feitas a partir da adição de bases de nucleótidos através da DNA polimerase ou DNA ligase e observa-se o comportamento nos nucleótidos através de um método de fluorescência ou detecção de pH (Cabeda and Moreno, 2014).

Estas duas gerações de técnicas referidas anteriormente necessitam da amplificação dos ácidos nucleicos que se pretende sequenciar ao contrário das técnicas de 3ª e 4ª geração (Cabeda and Moreno, 2014).

As técnicas de 3ª geração realizam milhões de sequenciações em paralelo, mas, por não fazerem amplificação de ácidos nucleicos utilizam detetores mais sensíveis. Com a sequenciação de 3ª geração conseguiu-se modificações muito consideráveis e positivas em relação àquela que foi descrita inicialmente por Sanger, tais como: obter uma maior quantidade de dados de forma mais económica, possibilidade de sequenciar o genoma completo de vários organismos facilitando vários estudos e ainda permitiu observar como é que as doenças genéticas influenciam a saúde e doenças ao nível microbiológico pois todos eles podem ser estudados por sequenciação mas por culturas celulares apenas 10 % (Cabeda and Moreno, 2014).

As técnicas de sequenciação de 4ª geração utilizam poros moleculares, fazendo passar um a um os nucleótidos de uma molécula de ácidos nucleicos pelo poro. A passagem dos nucleótidos altera a passagem de corrente elétrica entre os dois lados do poro, de modo distinto para cada nucleótido, permitindo identificar a sequência de nucleótidos que sequencialmente passam pelo poro. Trata-se da única técnica que permite identificar sequências muito longas e ao mesmo tempo distinguir as alterações químicas características das alterações epigenéticas (Cabeda and Moreno, 2014).

A sequenciação é vantajosa na medida em que permite identificar a presença de mutações/polimorfismos associados a um perfil clínico específico, no entanto possui algumas limitações como por exemplo: não poder ser utilizada em diagnósticos urgentes, em situações em que a infeção clínica não permite suspeitar qual o gene envolvido na mutação, ou em situações em que se suspeita do envolvimento de um elevado número de genes (Cabeda and Moreno, 2014).

#### **4.5. Genotipagem com enzimas de restrição**

##### **4.5.1. Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Limitação**

Em 1984 o cientista Alec Jeffreys inventou a técnica do Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição (RFLP). É uma técnica utilizada para analisar fragmentos de DNA a fim de os diferenciar geneticamente. Apesar de ser uma técnica vantajosa exige várias etapas e é morosa, tornando-se pouco prático para ser utilizada frequentemente em laboratório (Diba *et al.*, 2014; Hatanaka *et al.*, 2017; Golfetto *et al.*, 2018).

Esta técnica envolve vários passos, em primeiro lugar é necessário extrair DNA de uma amostra de sangue, saliva ou outra. De seguida recorre-se ao PCR para que haja amplificação do DNA e posteriormente à fragmentação do mesmo. A fragmentação é feita através de endonucleases de restrição (enzimas) que cortam as cadeias de DNA em pequenos fragmentos, sendo que cada endonuclease corta num sítio específico da cadeia de DNA dando origem a fragmentos distintos entre eles. Por fim recorre-se à eletroforese em gel que vai separar os fragmentos com base no seu tamanho sob a ação de um campo elétrico. Os fragmentos mais pequenos migram mais no gel enquanto os menores migram menos (Diba *et al.*, 2014; Hatanaka *et al.*, 2017; Golfetto *et al.*, 2018).

#### **5. Material e métodos**

##### **5.1. Voluntários**

Após aprovação deste projeto de investigação pela Comissão de Ética da Universidade Fernando Pessoa (Anexo 7), procedeu-se ao recrutamento de 89 voluntários, todos eles estudantes da mesma universidade, mais especificamente da Faculdade de Ciências da Saúde. Estes estudantes foram devidamente informados em relação ao objetivo do estudo e qual a importância da sua participação no mesmo, bem como toda a informação e amostras que teriam de ser recolhidas. Posto isto, os mesmos aceitaram participar dando o seu consentimento informado (Anexo 8) e tendo a hipótese de abandonar o estudo a qualquer momento.

Os voluntários tinham entre 20 a 41 anos. Todos eles no início do estudo foram submetidos a um questionário (Anexo 9), onde se recolheram dados sobre aspetos

sociodemográficos, estilo de vida saudável e pré-condições de doença/alergias conhecidas.

Cada voluntário durante um ano, forneceu mensalmente amostras nasais recolhidas através de zaragatoas estéreis, acompanhadas do preenchimento de um inquérito (Anexo 10), no qual foram recolhidas informações sobre sinais e sintomas decorrentes no mês anterior ao preenchimento do mesmo. Cada colheita envolveu colocar uma zaragatoa nasal em cada narina (esquerda e direita) e raspar a mucosa interna, posteriormente foram colocadas juntas num *ependorf*, o qual continha 200 µL de RNA Lateral (Invitrogen). A amostra foi armazenada por 24 horas a 4°C sendo depois congeladas a -80°C até à extração de RNA viral.

Para além disso, no início e no final do estudo foram realizadas colheitas de sangue ou um cotonete de células endoteliais da boca, caso o voluntário não consentisse na doação de sangue, para a extração de DNA e identificação de polimorfismos através do mesmo. Estas foram armazenadas a -20°C até se proceder à extração de DNA.

## **5.2. Controlos**

Para obter os controlos utilizou-se uma amostra comprovadamente positiva de RHV 2 gentilmente cedida pela Dra. Carita Savolainen-Kopra, do Instituto Nacional de Saúde e Assistência Social (THL) de Helsinquia, Finlândia.

Os controlos positivos foram preparados na sala de culturas após a câmara de fluxo laminar estar com a luz Ultra Violeta (UV) ligada certa de 30 minutos. Utilizou-se controlos positivos com diluições de  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$  da amostra original. O controlo negativo consistiu apenas em água.

Todos os controlos positivos foram devidamente identificados e preservados a -80°C.

## **5.3. Extração de RNA viral a partir de zaragatoas nasais**

Este protocolo decorreu sempre na sala de culturas, sendo que 30 minutos antes de se começar a desenvolver os protocolos ligava-se a luz UV da câmara de fluxo laminar.

A extração de RNA a partir das zaragatoas nasais foi realizada a partir do mini kit Qiamp Viral RNA (Qiagen) seguindo as instruções do fabricante.

Resumidamente, foi adicionado um reagente de lise ao *eppendorf* que continha a amostra e após 10 minutos de incubação adicionou-se etanol absoluto (96-100%). Posteriormente a mistura obtida foi transferida para uma coluna por onde se fez passar duas soluções de lavagens diferentes, rejeitando-se sempre o eluído. No final, a amostra foi eluída em 60 µL de solução de eluição (AVE). A conservação da amostra foi realizada a -80°C até se proceder à detecção e quantificação do RNA viral.

#### **5.4. Detecção e quantificação do RNA viral**

A amplificação de RNA de RHV foi realizada por qPCR num Lightcycler 1.1 (Roche, Suíça) como anteriormente descrito (T. a Myatt et al. 2004), no entanto foi adaptado à utilização do Lightcycler 1.1 e do Kit BioRad Quantitec Probe RT-PCR (Qiagen, Alemanha).

Resumidamente, uma solução contendo a mistura principal de 1X Quantitec Probe RT-PCR, 0,8 µM de cada Primer (Tabela 2), 0,2 µM de sonda Rhino-Probe (Tabela 2) e 0,2 µL / reação da mistura de enzimas polimerase e transcriptase reversa fornecida pelo fabricante num volume final de 20 µL de reação contendo 5 µL de RNA. A mistura foi submetida ao seguinte perfil de temperatura: Inicialmente uma transcrição reversa a 50°C por 20 minutos seguida de desnaturação da transcrição reversa e ativação da polimerase a 95°C por 15 minutos. A amplificação por PCR foi então realizada por 45 ciclos consistindo num passo de desnaturação a 95°C durante zero segundos, seguido de um passo de emparelhamento/polimerização a 60°C durante 1 minuto.

**Tabela 2-** Primers e sonda utilizados na detecção de RNA

<b>Primer</b>	<b>Sequência</b>	<b>Concentração (µM)</b>
<b>RAF</b>	GAC AGT GTT CYA GCC TGC G	0,2
<b>RBF</b>	RAC HGT GTC YYA GCC TGC G	0,2
<b>LR</b>	GAA ACA CGG ACA CCC AAA GTA	0,2
<b>Rhino-Probe</b>	TCC TCC GGC CCC TGA ATG YGG C	0,4

A semi-quantificação foi obtida em relação a uma série de diluições de uma amostra positiva.

### **5.5. Extração de DNA a partir do sangue ou de células epiteliais da boca**

A extração de DNA a partir do sangue ou de uma zaragatoa de células epiteliais da boca fez-se utilizando o mini Kit DNA de sangue da Qiamp (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. Este protocolo decorreu sempre na sala de culturas, sendo que 30 minutos antes de se começar a desenvolver os protocolos ligava-se a luz UV da câmara de fluxo laminar.

Resumidamente, 200 µL de sangue ou uma zaragatoa de células epiteliais da boca, à temperatura ambiente, e 200 µL de tampão de lise foram adicionados a 20 µL de proteinase K (600 UI/mL). Posteriormente, a amostra foi incubada a 56°C durante 10 minutos, seguindo-se a adição de 200 µL de etanol absoluto (96-100%). Esta mistura foi transferida para uma coluna de sílica. A coluna foi então centrifugada e lavada com dois tampões de diferentes adstringências. Por fim, o DNA foi eluído com 200 µL água isenta de DNA, RNA, DNAsés e RNAsés.

A conservação foi feita a -20°C até se proceder à identificação de polimorfismos.

### **5.6. Detecção de SNP's por PCR-RFLP**

#### **5.6.1. IL6 (rs1800795)**

Para a identificação de polimorfismos ao nível da citocina IL-6, utilizou-se o PCR seguido do método Polimorfismo de Comprimento dos Fragmentos de Restrição (RFLP).

Resumidamente, 8 µL de DNA foram misturados com iProof High-Fidelity Master Mix (BioRad) e 1 µL de cada primer (Tabela 3) num volume total de 12 µL. De seguida esta mistura foi submetida às condições de ciclo térmico apresentadas na Tabela 3.

Concluído o PCR, 10 µL de amplicão foram misturados com o tampão NEBuffer 3.1 e 2 UI (1µL) da endonuclease de restrição *Sfa*NI durante 2h à temperatura de reação da enzima (37°C).

**Tabela 3-** Condições experimentais utilizadas na genotipagem do IL6

Gene/ SNP	Primers	Ciclo térmico por PCR
IL6 rs1800795	5'-TGA CTT CAG CTT TAC TCT TTG T-3'  5'-CTG ATT GGA AAC CTT ATT AAG-3'	3 min - 98°C 35x [30s-98°C;30s-55°C; 30s- 72°C]

Por fim os fragmentos de restrição por PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 4% Nusieve 3:1 (FMC, USA). Possíveis leituras deste gel são: A enzima corta o alelo G dando origem à banda de 140 e 59 pares de bases (pb). O alelo C não é cortado pela enzima dando origem à banda de 198 pb, correspondente ao amplicão.

#### 5.6.2. TOLLIP (rs5743899)

Para a identificação de polimorfismos ao nível da citocina Tollip, utilizou-se o PCR seguido do método RFLP.

Resumidamente, 5 µL de DNA foram misturados com iProof High-Fidelity Master Mix (BioRad) e 1 µL de cada primer (Tabela 4) num volume total de 15 µL. De seguida esta mistura foi submetida às condições de ciclo térmico apresentadas na tabela 4.

**Tabela 4-** Condições experimentais utilizadas na genotipagem do TOLLIP

Gene/ SNP	Primers	Ciclo térmico por PCR
TOLLIP rs5743899	5'-GGC AAT GGC AGT GGC CAC CAG TGA-3'  5'-CCG ATG CCC GCA CAC CTG TGT GAT-3'	3 min - 98°C 35x [30s-98°C;45s-72°C]

Concluído o PCR, 10 µL de amplicão foram misturados com o tampão CutSmart e 10 UI (1µL) da endonuclease de restrição *HhaI* durante 2h à temperatura de reação da enzima (37°C).

Por fim os fragmentos de restrição por PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 4% Nusieve 3:1 (FMC, USA). Possíveis leituras deste gel são: A enzima corta o alelo G dando origem às bandas de 125, 93 e 61 pb. O alelo A é cortado pela enzima dando origem às bandas de 218 e 61 pb.

### **5.6.3. IL1B (rs16944)**

Para a identificação de polimorfismos ao nível da citocina IL-1 $\beta$ , utilizou-se o PCR seguido do método RFLP.

Resumidamente, 5  $\mu$ L de DNA foram misturados com iProof High-Fidelity Master Mix (BioRad) e 1  $\mu$ L de cada primer (Tabela 5) num volume total de 15  $\mu$ L. De seguida esta mistura foi submetida às condições de ciclo térmico apresentadas na tabela 5.

Concluído o PCR, 10  $\mu$ L de amplificação foram misturados com o tampão CutSmart e 10 UI (1 $\mu$ L) da endonuclease de restrição *AvaI* durante 2h à temperatura de reação da enzima (37°C).

**Tabela 5-** Condições experimentais utilizadas na genotipagem do IL1B

Gene/ SNP	Primers	PCR thermal cycling
IL1B rs16944	5'-TGG CAT TGA TCT GGT TCA TC-3'	3 min - 98°C 35x [30s-98°C;30s-60°C; 30s- 72°C]
	5'-GTT TAG GAA TCT TCC CAC TT-3'	

Por fim os fragmentos de restrição por PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 4% Nusieve 3:1 (FMC, USA). Possíveis leituras deste gel são: A enzima corta o alelo C dando origem à banda de 190 e 115 pb. O alelo T não é cortado pela enzima pelo que o produto do corte tem o mesmo peso molecular que o amplificação (305 bp).

### **5.6.4. TNFA (rs1800629)**

Para a identificação de polimorfismos ao nível da citocina TNF- $\alpha$ , utilizou-se o PCR seguido do método RFLP.

Resumidamente, 1 µL de DNA foram misturados com iProof High-Fidelity Master Mix (BioRad) e 1 µL de cada primer (Tabela 6) num volume total de 19 µL. De seguida esta mistura foi submetida às condições de ciclo térmico apresentadas na tabela 6.

**Tabela 6-** Condições experimentais utilizadas na genotipagem do TNFA

Gene/ SNP	Primers	PCR thermal cycling
TNFA rs1800629	5'AGG CAA TAG GTT TTG AGG GCC AT-3'	3 min - 98°C 35x [30s-98°C;30s-68°C; 30s- 72°C]
	5'TCC TCC CTG CTC CGA TTC-3'	

Concluído o PCR, 3,3 µL de amplicão foram misturados com o tampão CutSmart e 20 UI (1µL) da endonuclease de restrição *NcoI* durante 2h à temperatura de reação da enzima (37°C).

Por fim os fragmentos de restrição por PCR foram separados por eletroforese em gel de agarose a 4% Nusieve 3:1 (FMC, USA). Possíveis leituras deste gel são: A enzima corta o alelo G dando origem às bandas de 87 e 20 pb. O alelo A é cortado pela enzima dando origem às bandas de 107 pb.

## 6. Resultados

Com o objetivo de avaliar a influência dos polimorfismos de algumas citocinas em indivíduos infetados com RHV recrutou-se 89 voluntários. Todos os voluntários contribuíram com zaragoas nasais para avaliar se havia infecção por RHV, sendo desta forma analisadas 640 amostras de zaragoas nasais de Abril de 2017 a Março de 2018.

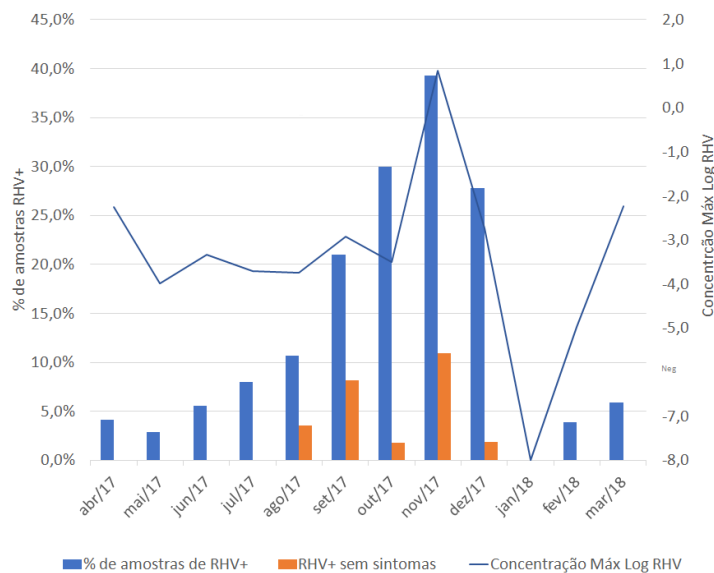
As dadivas de zaragoas nasais variaram entre um máximo de 73 em Abril e um mínimo de 25 no mês de Julho (média=  $53,7 \pm 15,8$  amostras / mês).

### 6.1. Detecção de RHV nas amostras dos voluntários

Analisando todas as amostras recolhidas ao longo de um ano, foi possível perceber que ocorreram infecções por RHV durante todo o período de observações, com exceção das

amostras de Janeiro de 2018. No entanto, foi notada uma frequência crescente de RHV deste a Primavera até ao início do Inverno, atingindo um pico nesta última estação e um pico menor na Primavera, tal como se pode observar na Figura 3.

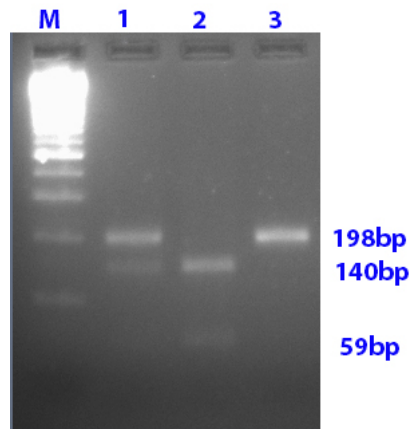
Foi detetado um mínimo de 3% de amostras positivas em Maio e um máximo de 40% de amostras positivas em Novembro, coincidindo isto com valores mais elevados de concentração de RHV nas amostras nasais de Novembro, tal como se pode observar pelas quantificações realizadas (Figura 3). Curiosamente apenas foram detetadas amostras positivas para RHV em voluntários sem sintomas durante o período do pico de inverno (fig. 3). Neste período, parece haver bastante maior atividade viral, o que aumenta a possibilidade de ser detetada a presença de RHV, antes de a infeção viral estar estabelecida.



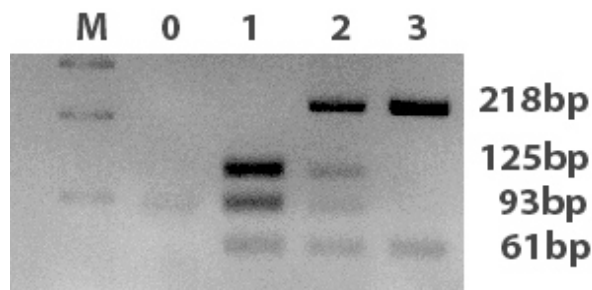
**Figura 3-** Frequência de amostras de zaragatoas nasais positivas (barras azuis) versus título de RNA de RHV nasal (linha azul). A concentração foi medida em relação a uma amostra controlo positivo, a partir da qual foi realizada uma diluição em série de 10 vezes e testada.

## 6.2. Influência de polimorfismos genéticos na detecção de RHV

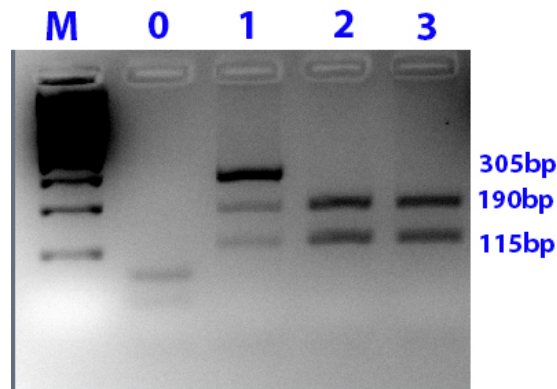
Para identificação de polimorfismos que influenciam infecções por RHV, apenas 60 voluntários contribuíram com amostras de sangue e 13 com células epiteliais da boca. Foram analisados os genes IL6 (rs1800795) (Figura 4), TOLLIP (rs5743899) (Figura 5), IL1B (rs16944) (Figura 6) e TNFA (rs1800629) (Figura 7).



**Figura 4-** Resultados finais obtidos na identificação de SNP no gene IL6. Observam-se bandas de 140 (alelo G) e bandas de 198 pb (alelo C).



**Figura 5-** Resultados finais obtidos na identificação de SNP no gene TOLLIP. Observam-se bandas de 125 e 93 pb (alelo G) e bandas de 218 pb (alelo A).

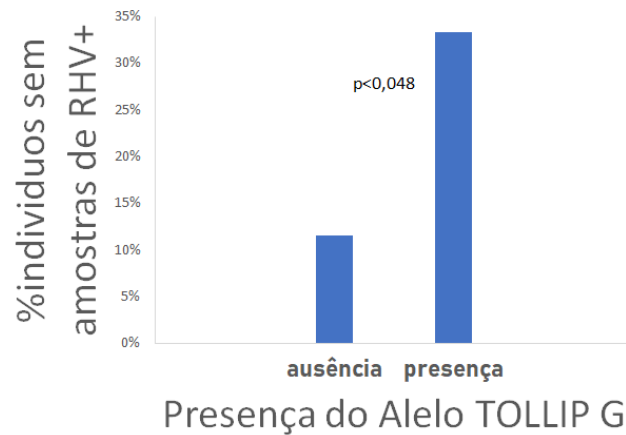


**Figura 6-** Resultados finais obtidos na identificação de SNP no gene IL1B. Observam-se bandas de 190 e 115 pb (alelo C) e bandas de 305 pb (alelo T).

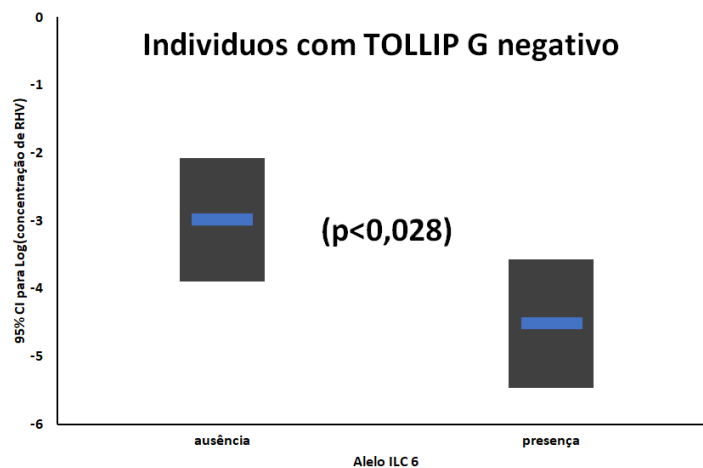


**Figura 7-** Resultados finais obtidos na identificação de SNP no gene TNFA. Observam-se bandas de 87 e 20 pb (alelo G) e bandas de 107 pb (alelo A)

Avaliou-se se havia ou não associações entre cada um dos polimorfismos testados das citocinas e a infecção por RHV tendo-se verificado que não existia nenhuma diferença entre indivíduos portadores dos vários alelos de IL1B e TNFA. Já em relação ao alelo G do TOLLIP verificou-se que aumenta significativamente ( $p < 0.048$ ) a probabilidade dos resultados serem RHV negativo, ao longo de todo o ano (Figura 8). Para além disso, ao excluir o efeito dos SNP do TOLLIP e avaliando somente indivíduos sem o alelo G do TOLLIP há probabilidade de encontrar um título viral significativamente superior ( $p < 0.028$ ) em indivíduos que não possuem o alelo C do IL6 (Figura 9).



**Figura 8-** Percentagem de indivíduos com resultados de RHV- em amostras nasais ao longo do período de observações é significativamente maior ( $p < 0.048$ ) entre os indivíduos com o alelo G TOLLIP (rs5743899).

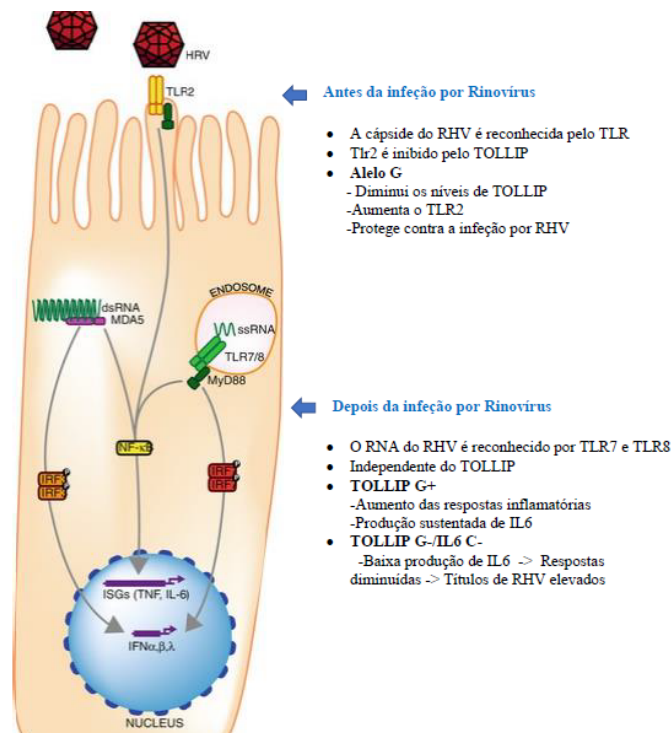


**Figura 9-** Considerando apenas indivíduos sem o alelo G TOLLIP (rs5743899), a concentração de RHV nas amostras nasais é significativamente maior na ausência do alelo C IL6 (rs1800795).

## 7. Discussão

Os resultados obtidos revelaram a existência de infecções por RHV ao longo de todo o ano, havendo um aumento da sua incidência no Inverno e um pico menor na Primavera. Adicionalmente, a concentração viral de RHV nas amostras revelou títulos de RHV mais elevados nos picos do Inverno e da Primavera.

Relativamente à influência de alguns polimorfismos em genes do SI na infecção por RHV sabe-se que o TOLLIP é um regulador negativo do TLR2. O TLR2 é um recetor do SI que reconhece a cápsula de RHV antes da entrada deste para as células (Figura 10). Os indivíduos que são portadores do alelo G do TOLLIP, têm a expressão de TOLLIP reduzida e por conseguinte, a expressão de TLR2 aumentada, ou seja, irá ocorrer uma melhor deteção e depuração de RHV pelo SI antes da entrada na célula, prevenindo assim a infecção por RHV.



**Figura 10-** O TOLLIP influencia a resposta do sistema imunológico ao RHV antes da entrada na célula, enquanto que o IL6 influencia a depuração viral após a infecção (adaptado de Mackay I.M., Arden K.E. (2014)).

No caso do RHV conseguir entrar nas células o seu reconhecimento será feito por TLR7 e TLR8 que são especializados em fazer o reconhecimento de RNA viral de cadeia simples. Estes dois recetores enviam um sinal de emergência através da indução de IL6.

O IL6 é um regulador anti-inflamatório crítico da imunopatologia induzida por vírus no trato respiratório. Esta ação é independente do efeito do TOLLIP e sua relação com o TLR2 e por isso só faz sentido falar em IL6 após a entrada do vírus na célula (Figura 10).

No entanto, o TOLLIP demonstra sustentar a produção de IL6 em várias condições anti-inflamatórias e por isso para se conseguir observar o efeito do polimorfismo do gene IL6 é necessário que este não esteja sobre controlo do TOLLIP pois dessa forma os resultados serão influenciados. Ou seja, avaliar os resultados com a presença do alelo G do TOLLIP faz com que os resultados do alelo C do IL6 sejam mascarados e portanto, teve que se fazer uma avaliação na ausência do alelo G do TOLLIP. Nestas condições (ausência do alelo G do TOLLIP) percebe-se que a ausência do alelo C do IL6 diminui os níveis de IL6, diminuindo assim a regulação anti-inflamatória após o estabelecimento da infecção por RHV, levando por consequência a títulos virais elevados.

### **III. Conclusão**

O RHV apresenta grande variabilidade genética (3 espécies e mais de 160 serótipos), o que a par da baixa patogenicidade explica praticamente a grande incidência de infecções por este vírus. O Rinovírus A infeta mais frequentemente adultos, o Rinovírus B é o mais raro e o Rinovírus C infeta com mais frequência crianças. Este é um vírus que causa principalmente infecções ligeiras, auto-limitadas, subclínicas e assintomáticas, no entanto, em indivíduos imunocomprometidos, com asma, DPOC e outras doenças relacionadas com o sistema respiratório podem surgir complicações.

No que diz respeito ao modo de transmissão, ainda há opiniões muito controversas, sendo a transmissão fecal-oral e o contacto direto com secreções infetadas ou aerossóis contendo partículas virais, hipóteses válidas para causar infecções por RHV.

No presente trabalho observamos a presença de RHV nas narinas dos voluntários ao longo de todo o ano, mas com aumentos de frequência e concentração na Primavera e Inverno. A concentração viral, apesar de apresentar maior dificuldade tecnológica, deve ser tida em conta quando se estuda a epidemiologia destes vírus porque tal permitiu observar um pico menor na primavera, que de outro modo teria passado despercebido, e pode estar associado a uma maior intensidade replicativa do vírus.

Após o estudo dos polimorfismos em alguns genes do SI conclui-se que apenas dois dos quatro que foram estudados têm capacidade para modular o risco de infecção por RHV, são estes o IL6 (rs18000795) e o TOLLIP (rs5743899). A presença do alelo G do TOLLIP (rs5743899) parece estar associada ao aumento da resistência à infecção. Por outro lado, a presença do alelo C do IL6 (rs1800795) parece estar associada a um aumento dos títulos de RHV quando ocorre uma infecção. Ou seja, os presentes resultados mostram que a infecção por RHV é influenciada pela suscetibilidade genética definida por polimorfismos em genes relacionados com o SI.

#### **IV. Bibliografia.**

- Alper, C. M. *et al.* (2009) 'Cytokine polymorphisms predict the frequency of otitis media as a complication of rhinovirus and RSV infections in children', *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, 266(2), pp. 199–205. doi: 10.1007/s00405-008-0729-2.
- Alvarez, A. E. *et al.* (2018) 'Association between single nucleotide polymorphisms in TLR4, TLR2, TLR9, VDR, NOS2 and CCL5 genes with acute viral bronchiolitis', *Gene*. Elsevier B.V, 645, pp. 7–17. doi: 10.1016/j.gene.2017.12.022.
- Alves, M. P. *et al.* (2016) 'Comparison of innate immune responses towards rhinovirus infection of primary nasal and bronchial epithelial cells', *Respirology*, 21(2), pp. 304–312. doi: 10.1111/resp.12692.
- Arakawa, M. *et al.* (2012) 'Molecular epidemiological study of human rhinovirus species A, B and C from patients with acute respiratory illnesses in Japan', *Journal of Medical Microbiology*, 61(3), pp. 410–419. doi: 10.1099/jmm.0.035006-0.
- Araujo, F. J. *et al.* (2015) 'Polymorphisms in the TOLLIP gene influence susceptibility to cutaneous leishmaniasis caused by leishmania guyanensis in the amazonas state of Brazil', *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(6), pp. 1–10. doi: 10.1371/journal.pntd.0003875.
- Batsch, A. *et al.* (2008) 'Simultaneous fitting of real-time PCR data with efficiency of amplification modeled as Gaussian function of target fluorescence', *BMC Bioinformatics*, 9, pp. 1–11. doi: 10.1186/1471-2105-9-95.
- Bennett, N. J. *et al.* (2012) 'Unrecognized viral respiratory tract infections in premature infants during their birth hospitalization: A prospective surveillance study in two neonatal intensive care units', *Journal of Pediatrics*. Mosby, Inc., 161(5), p. 814–818.e3. doi: 10.1016/j.jpeds.2012.05.001.
- Bisgaard, H. *et al.* (2010) 'Association of bacteria and viruses with wheezy episodes in young children: Prospective birth cohort study', *BMJ (Online)*, 341(7776), p. 770. doi:

10.1136/bmj.c4978.

Blaas, D. and Fuchs, R. (2016a) 'Mechanism of human rhinovirus infections', *Molecular and Cellular Pediatrics*. *Molecular and Cellular Pediatrics*, 3(1), p. 21. doi: 10.1186/s40348-016-0049-3.

Blaas, D. and Fuchs, R. (2016b) 'Mechanism of human rhinovirus infections', *Molecular and Cellular Pediatrics*. *Molecular and Cellular Pediatrics*, 3, pp. 21–24. doi: 10.1186/s40348-016-0049-3.

Blaschke, A. J. *et al.* (2011) 'Non-invasive sample collection for respiratory virus testing by multiplex PCR', *Journal of Clinical Virology*. Elsevier B.V., 52(3), pp. 210–214. doi: 10.1016/j.jcv.2011.07.015.

Blomqvist, S. (2004a) *Epidemiology of Human Rhinoviruses, Environmental Sciences*.

Blomqvist, S. (2004b) *Epidemiology of Human Rhinoviruses, Environmental Sciences*.

Bochkov, Y. A. *et al.* (2014) 'Improved molecular typing assay for rhinovirus species A, B, and C', *Journal of Clinical Microbiology*, 52(7), pp. 2461–2471. doi: 10.1128/JCM.00075-14.

Bochkov, Y. A. and Gern, J. E. (2016) 'Rhinoviruses and Their Receptors: Implications for Allergic Disease', *Current Allergy and Asthma Reports*. doi: 10.1007/s11882-016-0608-7.

Cabeda, J. M. *et al.* (2014) 'Picornavírus', *Microbiologia Médica - vol.2*, pp. 116–128.

Cabeda, J. M. and Moreno, A. C. (2014) *Sequenciação de Ácidos Nucleicos em Biomedicina*.

Carta, S., Silvestri, M. and Rossi, G. A. (2013) 'Modulation of airway epithelial cell functions by Pidotimod: NF-kB cytoplasmatic expression and its nuclear translocation are associated with an increased TLR-2 expression', *Italian Journal of Pediatrics*, 39(1), pp. 1–9. doi: 10.1186/1824-7288-39-29.

Chalovich, J. M. and Eisenberg, E. (2013) 'NIH Public Access', *Magn Reson Imaging*,

31(3), pp. 477–479. doi: 10.1016/j.immuni.2010.12.017.Two-stage.

Chen, W. *et al.* (2016) ‘adults’, pp. 74–82. doi: 10.1016/j.jcv.2015.01.007.Epidemiologic.

Defa, A. *et al.* (2013) ‘This article is protected by copyright. All rights reserved.’, *International journal of cancer. Journal international du cancer*, pp. 1–23. doi: 10.1002/elsc.201200179.

Diba, K. *et al.* (2014) ‘Development of RFLP-PCR method for the identification of medically important *Aspergillus* species using single restriction enzyme Mwo I’, 507, pp. 503–507.

Doyle, S. L. *et al.* (2007) ‘Signaling by Toll-like receptors 8 and 9 requires Bruton’s tyrosine kinase.’, *The Journal of biological chemistry*, 282(51), pp. 36953–60. doi: 10.1074/jbc.M707682200.

Doyle, W. J. *et al.* (2010) ‘THE IL-6 (–174, C/C) GENOTYPE PREDICTS GREATER RHIN’, *The Journal of infectious diseases*, 201(2), pp. 199–206. doi: doi:10.1086/649559.

Doyle, W. J. *et al.* (2010) ‘The Interleukin 6 –174 C/C Genotype Predicts Greater Rhinovirus Illness’, *The Journal of Infectious Diseases*, 201(2), pp. 199–206. doi: 10.1086/649559.

Drysdale, S. B. *et al.* (2016) ‘Functional and genetic predisposition to rhinovirus lower respiratory tract infections in prematurely born infants.’, *European journal of pediatrics*. *European Journal of Pediatrics*, 175(12), pp. 1943–1949. doi: 10.1007/s00431-016-2780-0.

Dupouey, J. *et al.* (2014) ‘Molecular detection of human rhinoviruses in respiratory samples: A comparison of Taqman probe-, SYBR green I- and BOXT0-based real-time PCR assays’, *Virology Journal*, 11(1), pp. 1–7. doi: 10.1186/1743-422X-11-31.

Esposito, S. *et al.* (2014) ‘Genetic polymorphisms and risk of recurrent wheezing in pediatric age’, *BMC Pulmonary Medicine*, 14(1), pp. 1–10. doi: 10.1186/1471-2466-14-

162.

Ferreira, W. e Sousa, J. (2002). *Microbiologia Volume 3*. Lisboa, Lidel.

Gavala, M., Bertics, P. J. and Gern, J. E. (2012) ‘Rhinoviruses, allergic inflammation, and asthma’, *Immunol Rev*, 242(1), pp. 69–90. doi: 10.1111/j.1600-065X.2011.01031.x.Rhinoviruses.

Gern, J. E. (2002) ‘Rhinovirus respiratory infections and asthma.’, *The American journal of medicine*, p. 19S--27S.

Giuseppina La Rosa, Marta Fratini, Simonetta Della Libera, M. I. and Muscillo, M. (2013) ‘Viral infections acquired indoors through airborne, droplet or contact transmission’, *Ann Ist Super Sanità*, 49(2), pp. 124–132. doi: 10.4415/ANN.

Golfetto, L. *et al.* (2018) ‘PCR-RFLP assay as an option for primary HPV test’, 51, pp. 1–7. doi: 10.1590/1414-431X20177098.

Grainge, C. L. and Davies, D. E. (2013) ‘Epithelial injury and repair in airways diseases’, *Chest*, 144(6), pp. 1906–1912. doi: 10.1378/chest.12-1944.

Granados, A. *et al.* (2012) ‘Use of an improved quantitative polymerase chain reaction assay to determine differences in human rhinovirus viral loads in different populations’, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. Elsevier Inc., 74(4), pp. 384–387. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2012.08.023.

Halfon, N. and Newacheck, P. W. (1993) ‘Childhood asthma and poverty: differential impacts and utilization of health services’, *Pediatrics*, 91(1), pp. 56–61. doi: 10.1097/ACI.0b013e3283352f7c.The.

Han, M. *et al.* (2016) ‘Toll-like receptor 2–expressing macrophages are required and sufficient for rhinovirus-induced airway inflammation’, *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Elsevier Inc., 138(6), pp. 1619–1630. doi: 10.1016/j.jaci.2016.01.037.

Hasegawa, K. *et al.* (2015) ‘Detection of respiratory syncytial virus and rhinovirus in healthy infants’, *BMC Research Notes*. BioMed Central, 8(1), pp. 1–5. doi: 10.1186/s13104-015-1695-6.

Hatanaka, N. *et al.* (2017) 'A PCR-RFLP assay to detect and type cytolethal distending toxin ( cdt ) genes in *Campylobacter hyointestinalis*', pp. 336–342. doi: 10.1292/jvms.16-0263.

Hatchwell, L. *et al.* (2015) 'Toll-like receptor 7 governs interferon and inflammatory responses to rhinovirus and is suppressed by IL-5-induced lung eosinophilia', *Thorax*, 70(9), pp. 854–861. doi: 10.1136/thoraxjnl-2014-205465.

Heikkinen, T. and Järvinen, A. (2003) 'The common cold', *The Lancet*, 361(9351), pp. 51–59. doi: 10.1016/S0140-6736(03)12162-9.

Herbert, C. *et al.* (2017) 'Allergic environment enhances airway epithelial pro-inflammatory responses to rhinovirus infection', *Clinical Science*, 131(6), pp. 499–509. doi: 10.1042/CS20160939.

Hershenson, M. B. (2013) 'Rhinovirus-Induced Exacerbations of Asthma and COPD', *Scientifica*, 2013, pp. 1–12. doi: 10.1155/2013/405876.

Hilty, M. *et al.* (2010) 'Disordered microbial communities in asthmatic airways', *PLoS ONE*, 5(1). doi: 10.1371/journal.pone.0008578.

Honsawek, S. *et al.* (2011) 'Association of the IL-6 -174G/C gene polymorphism with knee osteoarthritis in a Thai population', *Genetics and Molecular Research*, 10(3), pp. 1674–1680. doi: 10.4238/vol10-3gmr1161.

Huang, C. *et al.* (2016) 'Tollip SNP rs5743899 modulates human airway epithelial responses to rhinovirus infection', *Clinical and Experimental Allergy*, 46(12), pp. 1549–1563. doi: 10.1111/cea.12793.

Humbert-Claude, M. *et al.* (2016) 'Tollip, an early regulator of the acute inflammatory response in the substantia nigra.', *Journal of neuroinflammation*, 13(1), p. 303. doi: 10.1186/s12974-016-0766-5.

Ishii, T. *et al.* (2000) 'Neither IL-1 $\beta$ , IL-1 receptor antagonist, nor TNF- $\alpha$  polymorphisms are associated with susceptibility to COPD', *Respiratory Medicine*, 94(9), pp. 847–851. doi: 10.1053/rmed.2000.0808.

- Jackson, D. J. *et al.* (2012) 'Evidence for a causal relationship between allergic sensitization and rhinovirus wheezing in early life', *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 185(3), pp. 281–285. doi: 10.1164/rccm.201104-0660OC.
- Jacobs, S. E. *et al.* (2013) 'Human rhinoviruses', *Clinical Microbiology Reviews*, 26(1), pp. 135–162. doi: 10.1128/CMR.00077-12.
- Jennings, L. C. and Dick, E. C. (1987) 'Transmission and control of rhinovirus colds.', *European journal of epidemiology*, 3(4), pp. 327–335.
- Kaan, P. M. and Hegele, R. G. (2003) 'Interaction between Respiratory Syncytial Virus and Particulate Matter in Guinea Pig Alveolar Macrophages', *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 28(6), pp. 697–704. doi: 10.1165/rcmb.2002-0115OC.
- Kamau, E. *et al.* (2018) 'An Intensive, Active Surveillance Reveals Continuous Invasion and High Diversity of Rhinovirus in Households', *The Journal of Infectious Diseases*, 219(7), pp. 1049–1057. doi: 10.1093/infdis/jiy621.
- Kiang, D. *et al.* (2008) 'Assay for 5' noncoding region analysis of all human rhinovirus prototype strains', *Journal of Clinical Microbiology*, 46(11), pp. 3736–3745. doi: 10.1128/JCM.00674-08.
- Kim, S. R., Ki, C. S. and Lee, N. Y. (2009) 'Rapid detection and identification of 12 respiratory viruses using a dual priming oligonucleotide system-based multiplex PCR assay', *Journal of Virological Methods*, 156(1–2), pp. 111–116. doi: 10.1016/j.jviromet.2008.11.007.
- Kowalski, E. J. A. and Li, L. (2017) 'Toll-Interacting Protein in Resolving and Non-Resolving Inflammation', *Frontiers in Immunology*, 8. doi: 10.3389/fimmu.2017.00511.
- L'Huillier, A. G. *et al.* (2015) 'Molecular epidemiology of human rhinoviruses and enteroviruses highlights their diversity in sub-saharan Africa', *Viruses*, 7(12), pp. 6412–6423. doi: 10.3390/v7122948.
- Laham, F. R. *et al.* (2004) 'Differential Production of Inflammatory Cytokines in

Primary Infection with Human Metapneumovirus and with Other Common Respiratory Viruses of Infancy’, *The Journal of Infectious Diseases*, 189(11), pp. 2047–2056. doi: 10.1086/383350.

Lau, S. K. P. *et al.* (2007) ‘Clinical features and complete genome characterization of a distinct human rhinovirus (HRV) genetic cluster, probably representing a previously undetected HRV species, HRV-C, associated with acute respiratory illness in children’, *Journal of Clinical Microbiology*, 45(11), pp. 3655–3664. doi: 10.1128/JCM.01254-07.

Lee, W. M. *et al.* (2007) ‘A diverse group of previously unrecognized human rhinoviruses are common causes of respiratory illnesses in infants’, *PLoS ONE*, 2(10). doi: 10.1371/journal.pone.0000966.

Lessler, J. *et al.* (2009) ‘Incubation periods of acute respiratory viral infections: a systematic review’, *The Lancet Infectious Diseases*. Elsevier Ltd, 9(5), pp. 291–300. doi: 10.1016/S1473-3099(09)70069-6.

Louie, J. K. *et al.* (2005) ‘Rhinovirus Outbreak in a Long Term Care Facility for Elderly Persons Associated with Unusually High Mortality’, *Clinical Infectious Diseases*, 41(2), pp. 262–265. doi: 10.1086/430915.

Mackay, I. M. (2010) ‘Human rhinoviruses’, *PCR for Clinical Microbiology: An Australian and International Perspective*, 26(1), pp. 299–301. doi: 10.1007/978-90-481-9039-3\_47.

Manifesto, U. (2013) ‘Page 1 of 58 >’, pp. 1–58. doi: 10.1089/ars.2017.7112.

Manuscript, A. *et al.* (2014) ‘NIH Public Access’, 22(1), pp. 21–30. doi: 10.1016/j.intimp.2014.06.005.Perinatal.

Manuscript, A. and Regulation, T. (2013) ‘Telomerase regulation’, 730, pp. 20–27. doi: 10.1016/j.mrfmmm.2011.10.003.Telomerase.

Martinez, F. D. (2009) ‘The Origins of Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease in Early Life’, *Proceedings of the American Thoracic Society*, 6(3), pp. 272–277. doi: 10.1513/pats.200808-092RM.

- McErlean, P. *et al.* (2007) 'Characterisation of a newly identified human rhinovirus, HRV-QPM, discovered in infants with bronchiolitis', *Journal of Clinical Virology*, 39(2), pp. 67–75. doi: 10.1016/j.jcv.2007.03.012.
- McErlean, P. *et al.* (2008) 'Distinguishing molecular features and clinical characteristics of a putative new rhinovirus species, Human rhinovirus C (HRV C)', *PLoS ONE*, 3(4). doi: 10.1371/journal.pone.0001847.
- McIntyre, C. L., Knowles, N. J. and Simmonds, P. (2013) 'Proposals for the classification of human rhinovirus species A, B and C into genotypically assigned types', *Journal of General Virology*, 94(PART8), pp. 1791–1806. doi: 10.1099/vir.0.053686-0.
- Miller, E. K. (2010) 'New Human Rhinovirus Species and Their Significance in Asthma Exacerbation and Airway Remodeling', *Immunology and Allergy Clinics of North America*, 30(4), pp. 541–552. doi: 10.1016/j.iac.2010.08.007.
- Miller, R. L. and Peden, D. B. (2014) 'Environmental effects on immune responses in patients with atopy and asthma.', *The Journal of allergy and clinical immunology*, 134(5), pp. 1001–8. doi: 10.1016/j.jaci.2014.07.064.
- Myatt, T. A. *et al.* (2003) 'Airborne rhinovirus detection and effect of ultraviolet irradiation on detection by a semi-nested RT-PCR assay', *BMC Public Health*, 3, pp. 1–7. doi: 10.1186/1471-2458-3-5.
- Myatt, T. A. *et al.* (2004) 'Detection of Airborne Rhinovirus and Its Relation to Outdoor Air Supply in Office Environments', *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 169(11), pp. 1187–1190. doi: 10.1164/rccm.200306-760OC.
- Nenna, R. *et al.* (2017) 'Respiratory syncytial virus bronchiolitis, weather conditions and air pollution in an Italian urban area: An observational study.', *Environmental research*. Netherlands, 158, pp. 188–193. doi: 10.1016/j.envres.2017.06.014.
- Noah, T. L. *et al.* (1995) 'Nasal Cytokine Production In Viral Acute Upper Respiratory Infection Of Childhood', *Journal of Infectious Diseases*, 171(3), pp. 584–592. doi:

10.1093/infdis/171.3.584.

O'Neill, L. A. J. and Bowie, A. G. (2007) 'The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signalling.', *Nature reviews. Immunology*, 7(5), pp. 353–64. doi: 10.1038/nri2079.

Osterback, R. *et al.* (2013) 'Simultaneous Detection and Differentiation of Human Rhino- and Enteroviruses in Clinical Specimens by Real-Time PCR with Locked Nucleic Acid Probes', *Journal of Clinical Microbiology*, 51(12), pp. 3960–3967. doi: 10.1128/JCM.01646-13.

Palmenberg, A. C. *et al.* (2009) 'Sequencing and Analyses of All', *Science*, 324(April), pp. 55–59.

Palmenberg, A. C. *et al.* (2009) 'Sequencing and analyses of all known human rhinovirus genomes reveal structure and evolution', *Science*, 324(5923), pp. 55–59. doi: 10.1126/science.1165557.

Palmenberg, A. C. *et al.* (2014) 'NIH Public Access', *Science*, 324(5923), pp. 55–59. doi: 10.1126/science.1165557.Sequencing.

Patel, J. A. *et al.* (2010) 'Interleukin-6<sup>-174</sup> and Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ <sup>-308</sup> Polymorphisms Enhance Cytokine Production by Human Macrophages Exposed to Respiratory Viruses', *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 30(12), pp. 917–921. doi: 10.1089/jir.2010.0033.

Peden, D. B. and Bush, R. K. (2015) 'Advances in environmental and occupational disorders in 2014', *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. Elsevier Ltd, 136(4), pp. 866–871. doi: 10.1016/j.jaci.2015.08.008.

Peirson, S. N. (2003) 'Experimental validation of novel and conventional approaches to quantitative real-time PCR data analysis', *Nucleic Acids Research*, 31(14), p. 73e–73. doi: 10.1093/nar/gng073.

Peltola, V. *et al.* (2008) 'Clinical effects of rhinovirus infections', *Journal of Clinical Virology*, 43(4), pp. 411–414. doi: 10.1016/j.jcv.2008.08.014.

- Pretorius, M. A. *et al.* (2014) 'Genetic diversity and molecular epidemiology of human rhinoviruses in South Africa', *Influenza and other Respiratory Viruses*, 8(5), pp. 567–573. doi: 10.1111/irv.12264.
- Pyle, C. J. *et al.* (2017) 'Early IL-6 signalling promotes IL-27 dependent maturation of regulatory T cells in the lungs and resolution of viral immunopathology', *PLoS Pathogens*, 13(9), pp. 1–27. doi: 10.1371/journal.ppat.1006640.
- Romero, O. C. *et al.* (2011) 'Role of Temperature and Suwannee River Natural Organic Matter on Inactivation Kinetics of Rotavirus and Bacteriophage MS2 by Solar Irradiation', *Environmental Science & Technology*, 45(24), pp. 10385–10393. doi: 10.1021/es202067f.
- Royston, L. and Tapparel, C. (2016) 'Rhinoviruses and respiratory enteroviruses: Not as simple as ABC', *Viruses*, 8(1). doi: 10.3390/v8010016.
- Russell, C. D., Griffiths, S. J. and Haas, J. (2014) 'Interferon lambda genetic polymorphisms and viral infection: the tip of the iceberg?', *DNA and Cell Biology*, 33(2), pp. 60–63. doi: 10.1089/dna.2013.2261.
- Russell, C. D., Griffiths, S. J. and Haas, J. (2014) 'Interferon Lambda Genetic Polymorphisms and Viral Infection: The Tip of the Iceberg?', *DNA and Cell Biology*, 33(2), pp. 60–63. doi: 10.1089/dna.2013.2261.
- S.B., G. (2011) 'Update on rhinovirus and coronavirus infections', *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*, 32(4), pp. 433–446. doi: 10.1055/s-0031-1283283.
- Saba, T. G. *et al.* (2014) 'Rhinovirus-induced macrophage cytokine expression does not require endocytosis or replication', *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 50(5), pp. 974–984. doi: 10.1165/rcmb.2013-0354OC.
- Sandhya, P. *et al.* (2013) 'Tumour necrosis factor (TNF)- $\alpha$ -308 gene polymorphism in Indian patients with Takayasu's arteritis - a pilot study.', *The Indian journal of medical research*, 137(4), pp. 749–52.

- Savolainen-Kopra, C. *et al.* (2009) '5'Noncoding Region Alone Does Not Unequivocally Determine Genetic Type of Human Rhinovirus Strains', *Journal of Clinical Microbiology*, 47(4), p. 1278. doi: 10.1128/JCM.02130-08.
- Scagnolari, C. *et al.* (2017) 'Rhinovirus species/genotypes and interferon- $\lambda$ : Subtypes, receptor and polymorphisms – Missing pieces of the puzzle of childhood asthma?', *European Respiratory Journal*, 49(3). doi: 10.1183/13993003.00060-2017.
- Shah, J. A. *et al.* (2012) 'Human TOLLIP regulates TLR2 and TLR4 signaling and its polymorphisms are associated with susceptibility to tuberculosis.', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*. United States, 189(4), pp. 1737–1746. doi: 10.4049/jimmunol.1103541.
- Shain, E. B. and Clemens, J. M. (2008) 'A new method for robust quantitative and qualitative analysis of real-time PCR', *Nucleic Acids Research*, 36(14), pp. 1–7. doi: 10.1093/nar/gkn408.
- Slater, L. *et al.* (2010) 'Co-ordinated role of TLR3, RIG-I and MDA5 in the innate response to rhinovirus in bronchial epithelium', *PLoS Pathogens*, 6(11). doi: 10.1371/journal.ppat.1001178.
- Spannhake, E. W. *et al.* (2002) 'Synergism between rhinovirus infection and oxidant pollutant exposure enhances airway epithelial cell cytokine production.', *Environmental health perspectives*, 110(7), pp. 665–670. doi: 10.1289/ehp.02110665.
- Spyridaki, I. S. *et al.* (2009) 'Comparison of four nasal sampling methods for the detection of viral pathogens by RT-PCR-A GA2LEN project', *Journal of Virological Methods*, 156(1–2), pp. 102–106. doi: 10.1016/j.jviromet.2008.10.027.
- Stone, C. A. and Miller, E. K. (2016) 'Understanding the association of human rhinovirus with asthma', *Clinical and Vaccine Immunology*, 23(1), pp. 6–10. doi: 10.1128/CVI.00414-15.
- Su, Y. T. *et al.* (2018) 'High correlation between human rhinovirus type C and children with asthma exacerbations in Taiwan', *Journal of Microbiology, Immunology and*

*Infection*. Elsevier Taiwan LLC, (xxxx). doi: 10.1016/j.jmii.2018.12.001.

Tanaka, T., Narazaki, M. and Kishimoto, T. (2014) 'Il-6 in inflammation, Immunity, And disease', *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(10), pp. 1–16. doi: 10.1101/cshperspect.a016295.

Tapparel, C., Cordey, S., *et al.* (2009) 'New molecular detection tools adapted to emerging rhinoviruses and enteroviruses', *Journal of Clinical Microbiology*, 47(6), pp. 1742–1749. doi: 10.1128/JCM.02339-08.

Tapparel, C., Junier, T., *et al.* (2009) 'New respiratory enterovirus and recombinant rhinoviruses among circulating picornaviruses', *Emerging Infectious Diseases*, 15(5), pp. 719–726. doi: 10.3201/eid1505.081286.

Toivonen, L. *et al.* (2016) 'Polymorphisms of mannose-binding lectin and toll-like receptors 2, 3, 4, 7 and 8 and the risk of respiratory infections and acute otitis media in children', *Pediatric Infectious Disease Journal*, 36(5), pp. e114–e122. doi: 10.1097/INF.0000000000001479.

Trabulsi, L. *et al.* (1998). *Microbiologia 2ª edição*. São Paulo, Atheneu.

Triantafilou, K. *et al.* (2011) 'Human rhinovirus recognition in non-immune cells is mediated by toll-like receptors and MDA-5, which trigger a synergetic pro-inflammatory immune response', *Virulence*, 2(1), pp. 22–29. doi: 10.4161/viru.2.1.13807.

Unger, B. L. *et al.* (2012) 'Rhinovirus Attenuates Non-typeable Hemophilus influenzae-stimulated IL-8 Responses via TLR2-dependent Degradation of IRAK-1', *PLoS Pathogens*, 8(10). doi: 10.1371/journal.ppat.1002969.

Waman, V. P. *et al.* (2014) 'Population structure and evolution of rhinoviruses', *PLoS ONE*, 9(2). doi: 10.1371/journal.pone.0088981.

Wine, T. M. and Alper, C. M. (2012) 'Cytokine responses in the common cold and otitis media', *Current Allergy and Asthma Reports*, 12(6), pp. 574–581. doi: 10.1007/s11882-012-0306-z.

Yamaya, M. *et al.* (2016) ‘Increased rhinovirus replication in nasal mucosa cells in allergic subjects is associated with increased ICAM-1 levels and endosomal acidification and is inhibited by L-carbocysteine’, *Immunity, Inflammation and Disease*, 4(2), pp. 166–181. doi: 10.1002/iid3.102.

Yamaya, M. *et al.* (2017) ‘Clarithromycin decreases rhinovirus replication and cytokine production in nasal epithelial cells from subjects with bronchial asthma: effects on IL-6, IL-8 and IL-33’, *Archives of Pharmacal Research*. Pharmaceutical Society of Korea, pp. 1–14. doi: 10.1007/s12272-017-0950-x.

Yang, W. and Marr, L. C. (2011) ‘Dynamics of Airborne Influenza A Viruses Indoors and Dependence on Humidity’, *PLoS ONE*. Edited by R. A. M. Fouchier, 6(6), p. e21481. doi: 10.1371/journal.pone.0021481.

Zhang, G. and Ghosh, S. (2002) ‘Negative regulation of toll-like receptor-mediated signaling by Tollip’, *Journal of Biological Chemistry*, 277(9), pp. 7059–7065. doi: 10.1074/jbc.M109537200.

# **Anexos**

Anexos 1- Poster apresentado no 28º Encontro Anual da Sociedade de Virologia de 2018 (Würzburg, Alemanha)

P 348

## Year-long detection of Rhinovirus on the nostrils of university students in Porto, Portugal

Ana Filipa Rodrigues, Ana Mafalda Santos, Ana Maria Ferreira, José Manuel Cabeda  
IF-PAAS Research Centre, CHBIMHD Univ. Porto, Portugal  
 Universidade Fernando Pessoa, Health Sciences Faculty, Porto, Portugal




### SUMMARY

**INTRODUCTION**

- Rhinovirus is a common picornavirus with over 150 serotypes and 3 species
- Responsible for 50% of common cold cases
- Tropism for the upper respiratory tract, but can also infect the lower respiratory tract
- Can be the remaining in people with chronic respiratory conditions and older
- Transmission routes are controversial but involve:
  - human-to-human
  - indirect transmission (surfaces<sup>1</sup> and/or aerosols<sup>2,3</sup>)

**STUDY**

- Here we tested the year-long presence of rhinovirus in:
  - Monthly on nostrils of 60 healthy university students (40 male) 2x/week sampled
  - Weekly on indoors and outdoors air in the university campus
  - RHA was detected and quantified by qPCR on a Lightcycler 1.1.
  - Sampling varied (n=72) in April, (n=25) in July (52.7/15.6 samples per month).

**RESULTS**

- Nostril samples showed an increasing frequency of rhinovirus from spring to Autumn
- Minimum of 26 positive samples in May
- Maximum of 405 positive samples in November
- No indoor air samples were found positive
- Several positive outdoor samples
  - Peak in November with all samples positive.
  - Strikingly quantification showed higher values showing in November

**CONCLUSIONS** Results show a close relationship between the presence of viral RHA in the nostrils of volunteers and the presence of the viral RHA in outdoor air, supporting the possibility of airborne viral transmission. The absence of viral results in indoor air samples may indicate a possible efficiency of the air conditioning filtering in the university campus where samples were collected.

### RESULTS

**Rhinovirus presence in the Nostrils of Volunteers**

- 400 nostril swab samples collected from April to December 2017
- Sampling varied (n=72) in April, (n=25) in July, 50.7/15.6 samples/month.
- Nostril samples:
  - Increasing frequency of rhinovirus from spring to Autumn (Fig.1)
  - Minimum of 26 positive samples in May
  - Maximum of 405 positive samples in November
  - Strikingly found for RHA concentration of Rhinovirus in positive nostril swabs

**Rhinovirus presence in Indoor and Outdoor Air Samples**

- All indoor air samples tested negative for rhinovirus.
- Several outdoor air samples showed Rhinovirus RHA
  - one in June, one in October, all in November and one in December
  - Viral RHA relative quantification with higher values showing up in the end of the year (Fig.2)
  - Nostril Rhinovirus relative concentration was also found to strongly correlate (R=0.985, p<0.0001) to the Outdoor air Rhinovirus relative concentration (Fig.3).



**Fig. 1 – Frequency of positive nostril swab samples versus Rhinovirus RHA in positive nostril swab samples.**



**Fig. 2 – Percentage of positive nostril samples and the relative concentration of Rhinovirus in Outdoor air samples.**



**Fig. 3 – Correlation between Rhinovirus relative concentration in the nostrils of volunteers and outdoor air samples.**

### MATERIALS AND METHODS

**Recruitment of volunteers:** A total of 60 volunteers were recruited among students of Fernando Pessoa University. Students were required to read and sign an informed consent, and to fill in an epidemiological inquiry. All procedures were approved by the University Ethics Committee. Database was registered to the national Personal Data Protection Organization. Nasal sample collection: Volunteers carry out their nasal swab collection. Samples were collected from each nostril using sterile cotton swabs. Swabs from left and right nostrils were stored together (n=100) of RN A (small Intimidator) solution for 24h at 4°C and then transferred to -80°C freezer until RHA detection procedures.

**Air Sample Collection:** Indoor and outdoor air samples were collected aseptically as previously described<sup>4</sup>. RHA in air was filtered for 1 hour at a flow rate using 0.9 µm 2.0 µm Teflon filters (SQ) in closed cassette with the help of a air pump (140 ml/min, legio dry pump). Filters were then cut in two (1 piece under sterile conditions using fresh sterile disposable scalpels and stored during 24 hr at 4°C with 200 µl of RN A (small Intimidator). Filters were then stored at -80°C until viral RHA detection.

**Viral RNA extraction:** Viral RHA extraction was performed using QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen) following the manufacturer instructions. Final elution volume was 60 µl. RHA samples were stored at -80°C.

**Rhinovirus RNA detection and quantification:** Rhinovirus RHA amplification was performed by qPCR on a Lightcycler 1.1 (Roche, Germany) as previously described<sup>5</sup>. Semi-quantification was obtained relative to a dilution series of a positive sample.

### BIBLIOGRAPHY

1. Hensling A, Grollman A, et al. (2015)
2. Jones K, et al. (2015)
3. Grollman A, et al. (2015)
4. Jones K, et al. (2015)
5. Jones K, et al. (2015)

### ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by Portuguese Science Foundation (FCT) grants UIDB/04464/2016 and UIDB/04464/2016.

Anexo 2- Poster apresentado no XLIV Annual Meeting of Portuguese Society for Immunology, Lisbon, 27-29/6/2018



**P3**



## Tollip G allele (SNP rs5743899) is associated with a lower year-long incidence of Rhinovirus presence in the nostrils of healthy university students in Porto

Roberta Marino<sup>1,2,3</sup>, Ana Filipa Rodrigues<sup>1,2</sup>, Ana Mafalda Santos<sup>1,2</sup>, Ana Maria Ferreira<sup>1,2</sup>, Esmeralda Barreira<sup>1,2</sup> and José Manuel Cebada<sup>1,2</sup>

1) I3-FAAS Research Centre, CIBERSAM Unit, Porto, Portugal  
 2) Universidade Fernando Pessoa, Health Sciences Faculty, Porto, Portugal  
 3) University of Bari, Bari, Italy

### SUMMARY

**INTRODUCTION**

- Rhinovirus is a common picornavirus with over 150 serotypes and 3 species<sup>1</sup>
- Responsible for 50% of common cold cases<sup>2</sup>
- Can be the triggering in people with chronic respiratory afflictions and asthma<sup>3</sup>
- Tropes to the upper respiratory tract, but can also infect the lower respiratory tract<sup>4</sup>

**STUDY**

- Year-long
- Examined the year-long presence of rhinovirus monthly in nostrils of 60 healthy university students (60 nasal swab samples) by qRT-PCR on a Lightcycler 1.1
- Genotyped volunteers for Innate Immune related proteins gene polymorphisms
  - TOLLIP rs5743899
  - IL6 rs1800471
  - IL6 rs1800795
  - THF1 rs1800252

**RESULTS**

- Nasal samples showed an increasing frequency of rhinovirus from spring to early-summer
  - Minimum of 2% positive samples in May
  - Maximum of 20% positive samples in November
- Both IL6 and TOLLIP gene polymorphisms, but not IL1B nor THF1 polymorphisms were found to influence Rhinovirus detection on the volunteers' nostrils
  - TOLLIP-G+ individuals more frequently were found to be year-long RRV free
  - IL6-G+ individuals were found to show higher rates of RRV in positive nasal samples

**CONCLUSIONS** This is the first description of an association between Innate Immune related genetic polymorphisms and the year-long detection of Rhinovirus in the nostrils of otherwise healthy human subjects. The relevant polymorphisms impact on Innate Rhinovirus response Innate mechanisms as the TLR mediated signalling crucial for rhinovirus capsid recognition and IL6 mediated response for subsequent for viral clearing after infection.

### RESULTS

**Rhinovirus presence in the Nostrils of volunteers**

- 60 nasal swab samples analyzed from April 2017 to March 2018
- Samples were stored until April 2018 (July, 2017) in a -80°C refrigerator
- Frequency of rhinovirus positive or early-summer (Fig.1)



Fig.1 - Frequency of positive nasal swab samples for the duration of the study.

**Polymorphic Influence on year-long Rhinovirus detection**

- TOLLIP-G+ individuals showed more frequently a year-long absence of rhinovirus (Fig.2)
- Average TOLLIP-G- individuals, the IL6-G allele is associated with higher RRV concentrations (Fig.3)



Fig.2 - TOLLIP-G+ individuals show more frequently a year-long absence of rhinovirus



Fig.3 - IL6-G+ individuals present higher RRV concentrations if TOLLIP-G+ excluded

### DISCUSSION

- TOLLIP is a negative regulator of TLR mediated for RRV capsid recognition before cell entry
  - G allele
    - decrease TOLLIP → increase TLR → better RRV clearance before infection
- IL6 is needed for RRV clearance after cell entry
  - TOLLIP acts as a regulator of IL6 mediated for RRV clearance
    - Microprotein which TOLLIP-G+ rs5743899 affects
  - After infection RRV reaction is mediated by TLR, TLR, not TLR → TOLLIP less relevant

### CONCLUSION

- TOLLIP-G allele is associated with better RRV clearance before infection
  - Thus TOLLIP-G+ individuals show more often year-long RRV free
- IL6-G allele is associated with better response after infection
  - Lower RRV concentrations
  - Lower RRV samples idem not shown
    - TOLLIP-G+ IL6-G+ individuals show more often both very high frequency of RRV and absence of RRV idem not shown
- no effect of the related IL1B and THF1 polymorphisms

### MATERIALS AND METHODS

**Subjects:** 60 young students were enrolled. All agreed to an informed consent form. Procedures approved by the Ethics Comm. Univ. Barbaosa was registered to the national Personal Data Protection Organization. Volunteers who did not provide at least 6 samples were excluded from the Rhinovirus frequency analysis.

**Nasal sample collection:** A monthly nasal swab was collected from each nostril of each volunteer, submerged in 200µl of RNAlater (Invitrogen) solution for 24h at 4°C and then transferred into -80°C freezer until RRV detection procedures.

**Viral RRV detection:** Viral RRV detection was performed using Qiagen Viral RNA Mini Kit (Qiagen) following the manufacturer instructions. Final elution volume was 60µl. RRV samples were stored at -80°C.

**Rhinovirus RRV detection:** Rhinovirus RRV detection was performed by RT-qPCR on a Lightcycler 1.1 (Roche, Germany) as previously described<sup>5</sup>.

**SNP typing:** SNPs were typed by PCR-RFLP assembly as previously described by others<sup>6,7</sup>.


### BIBLIOGRAPHY

1. Ishiguro H, et al. *Journal of Virology* 2007; 81(12):6443-6448
2. Smith RT, et al. *Journal of Virology* 1993; 67(12):3673-3678
3. Gern J, et al. *Journal of Virology* 2004; 78(12):6443-6448
4. Smith RT, et al. *Journal of Virology* 1993; 67(12):3673-3678
5. Ishiguro H, et al. *Journal of Virology* 2007; 81(12):6443-6448
6. Smith RT, et al. *Journal of Virology* 1993; 67(12):3673-3678
7. Smith RT, et al. *Journal of Virology* 1993; 67(12):3673-3678

### ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by Portuguese Science Foundation (FCT) grants UIDB/04546/2016 and UIDB/04546/2016

Anexo 3- Poster apresentado na Conferência Europeia de Epidemiologia e Saúde Pública de 2018 (Lisboa, Portugal) e vencedor do prémio “The Best Poster Award for Presenting”



## Rhinovirus infection is influenced by polymorphisms in the Immune System related Genes TOLLIP and IL6

Rodrigues A.F.<sup>1,2</sup>, Santos A.M.<sup>1,2</sup>, Marino R.<sup>1,2</sup>, Ferreira A.M.<sup>1,2</sup>, Barreira M.E.<sup>1,2</sup>, Cabeda J.M.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> IP-ENAS Research Centre, CSRMIG Unit, Porto, Portugal (cabeda@ip.ulisboa.pt)  
<sup>2</sup> Universidade Fernando Pessoa, Health Sciences Faculty, Porto, Portugal



### SUMMARY

**INTRODUCTION:**

- Rhinovirus (RV) is a common picornavirus with over 150 serotypes and 3 species<sup>1</sup>
- Responsible for 50% of common cold cases<sup>2</sup>
- Tropism to the upper respiratory tract, but can also infect the lower respiratory tract<sup>3,4</sup>
- Can be life threatening in people with chronic respiratory affections and elderly<sup>5</sup>
- Transmission routes are controversial but may involve:
  - human-to-human
  - indirect transmission (surface<sup>6,7</sup> and/or aerosol<sup>8,9</sup>)

**AIM:** Study role of immune-system related genetic variations on RV infectivity.

**STUDY DESIGN:**

- Tested the year-long presence of RV in:
  - Monthly on nostrils of 89 healthy university students (540 nasal swab samples)
  - RNA was detected and semi-quantified by qPCR on a Lightcycler 1.1.
- All individuals were genotyped for immune-system related genetic variations (TOLLIP rs743899, IL6 rs1800795, IL18 rs19946, TNFA rs1800629).

**RESULTS:**

- Both IL6 and TOLLIP gene polymorphisms, but not IL18 nor TNFA polymorphisms were found to influence RV detection on the volunteer's nostrils.
- TOLLIP G+ individuals more frequently were found to be year-long RV free
- IL6 C+ individuals were found to show higher titres of RV in positive nostril samples

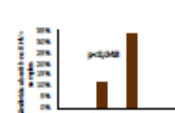
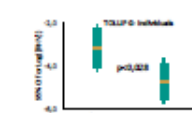
**CONCLUSION:**

- Association between TOLLIP and IL6 alleles and RV infection in healthy subjects
- TOLLIP gene polymorphisms influences RV susceptibility by mediating TLR2 mediated signalling (needed for capsid recognition).
- IL6 gene polymorphisms mediates viral clearance after infection.

### Results

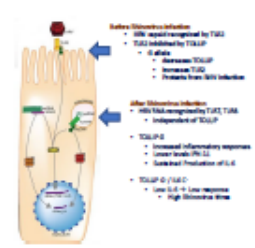
**Polymorphisms influence on year-long RV detection**

- TOLLIP G- individuals showed more frequently a year-long absence of RV (Fig.1)
- Among TOLLIP G- individuals, the IL6 C allele is associated with higher RV concentrations (Fig.2)

### DISCUSSION

- TOLLIP (Fig.1)
  - Is a negative regulator of TLR2
  - TLR2 is needed for RV capsid recognition before cell entry
  - The G allele decreases TOLLIP and increases TLR2
  - Thus the G allele leads to better RV clearance before infection.
- IL6 (Fig.2)
  - Is needed for RV clearance after cell entry.
  - After infection RV reaction is mediated by TLR2, TLR4, not TLR2
  - TOLLIP is less relevant
  - After infection RV reaction is mediated by TLR2, TLR4, not TLR2
  - TOLLIP sustains production of IL6
  - explains why TOLLIP G+ makes the IL6 effect.
- TOLLIP G- / IL6 C-
  - Low IL6 → Low response to RV after infection
  - High RV titres



### CONCLUSION

The present results:


- Show that TOLLIP G allele is associated with better RV clearance before infection, making TOLLIP G+ individuals more often year-long RV free:
  - Indicates that interindividual susceptibility variance is genetically determined;
- IL6 C allele is associated with better response after infection
  - Indicates that interindividual resistance to infection is genetically determined.

### BIBLIOGRAPHY

- Palmenberg, K. C. et al. *Science* 226, 55-9 (2008)
- Alam, D. & Fuchs, R. *Hum. Cell. Pathol.* 3, 25-28 (2016)
- Jacobs, S. E., Larsson, D. M., Kristo, S. & Walsh, T. J. *Cell. Microbiol. Rev.* 26, 515-531 (2014)
- Michelson, R. et al. *PLoS One* 1, (2006)
- Mikropajk, S. *Environmental Sciences* (2004)
- Gentry, J. E. *Am. J. Med.* 195-275 (2001)
- Aravign, S. C. & Dink, S. C. *Exp. L. Hygiene* 3, 327-35 (1967).
- Myatt, T. A., Johnson, S. L., Radzicki, S. & Milton, D. K. *BMJ: Public Health* 3, 5 (2003).
- Myatt, T. A. et al. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 169, 1333-1340 (2004).
- Alvarado de la Rosa, Marta Francisca, Simoes da Silva, M. L. *Am. J. Super. Sanit.* 49, 124-131 (2014)
- Harandi et al. *Genetics and Molecular Research* (2011) 10(4):1676-1680
- Araujo et al. *PLOS Neglected Tropical Diseases* (2018) 12:024141 (2018) Respiratory Medicine 163:93-102
- Sandhya P et al (2013) *Indian J Med Res* 137:769-752

### ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by Portuguese Science Foundation (PCT) grants UIDB/Multi/04546/2016 and UIDP/Multi/04546/2013



Anexo 4- Poster apresentado no XLV Annual Meeting of Portuguese Society for Immunology, Coimbra, 15-17/6/2019




### Year-long Rhinovirus infection is influenced by atmospheric conditions, outdoor-air viral presence and immune-system related genetic polymorphisms

Rodrigues A.F.<sup>1,2</sup>, Santos A.M.<sup>1,2</sup>, Ferreira A.M.<sup>1,2</sup>, R. Marino<sup>1</sup>, M.E. Barreira<sup>1,2</sup>, Cabeda J.M.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> ICBAS, Av. Padre Cruz, 4169-016 Viseu, Portugal (e-mail: a.f.rodrigues@icbas.viseu.pt)

<sup>2</sup> Instituto de Biologia, Universidade Nova de Lisboa, Portugal



---

#### INTRODUCTION

- Rhinovirus (RV) is a common picornavirus with over 150 serotypes and 2 species<sup>1</sup>
- Responsible for 50% of common cold cases<sup>2</sup>
- Can be the threatening in people with chronic respiratory afflictions and elders<sup>3</sup>
- Triggers mainly upper respiratory tract, but can also infect the lower respiratory tract<sup>4</sup>
- Transmission routes are controversial but involve:
  - human-to-human
  - indirect transmission (surface<sup>5</sup> and/or aerosol<sup>6</sup>)
- Large infection frequency was also related to:
  - High serological diversity with low immunological cross reactivity<sup>7</sup>
  - Immunological genetic variability, but there is lack of evidence
  - Environmental factors<sup>8</sup>

#### AIMS:

- Characterize the seasonality of RV in Portugal
- the number of healthy young volunteers
- outdoor and indoor air serotype
- Correlate results to:
  - SNP in TollIP, IL6, IL10 and TH1 genes
  - Atmospheric conditions (meteorological and air quality)

#### SUMMARY

- RV has 1 serotype frequency increasing from Spring to Autumn, shifting for viral strains but with a second minor peak in Spring
- Indoor air serotypes were found positive, but several positive outdoor serotypes closely resembling nasal detection distribution
- Peak in November with all serotype positive
- Shifting quantification showed higher values in November
- Meteorological and air quality parameters correlated with RV nasal presence:
  - Sun Radiation (p<0.0001)
  - atmospheric SO<sub>2</sub> (R=-0.942, p<0.0001)
  - barometric level (R=0.909, p<0.0001)
- Both IL6 and TollIP gene polymorphisms, but not IL10 nor TH1A polymorphisms were found to influence RV detection on the volunteers' nostrils
- TollIP G-Individuals were frequently were found to be year-long RV free
- IL6 G alleles were found to show higher rates of RV in positive nasal serotype

#### CONCLUSION:

- RV circulation is determined by:
  - environmental conditions (viral air presence, weather and air pollution)
  - genetically encoded inter-individual variation in immunity

---

#### RV detection in nostrils

- Frequency of RV among volunteers nostrils peaked in Autumn/Winter (Fig. 1)
- RV viral peaks in Autumn/Winter, but a second minor peak was found in Spring (Fig. 1)

#### RV detection in air

- Shifting findings in terms of RV concentration in nostrils and in outdoor air (Fig. 1)
- Close correlation between RV concentration in nostrils and in outdoor air (Fig. 2)




Fig. 1 - Frequency of healthy individuals seropositive to RV in the nose and in outdoor air samples and in indoor air samples.

#### RESULTS

Polymorphic Influence on year-long RV detection

- TollIP G-Individuals showed more frequently a year-long absence of RV (Fig. 1)
- Average TollIP G-Individuals, the IL6 G allele is associated with higher RV concentration (Fig. 2)

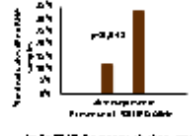


Fig. 2 - TollIP G-0000 individuals show more frequently a year-long absence of RV

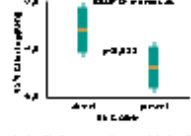


Fig. 3 - IL6 G-0001 individuals present higher RV concentrations in TollIP G-0000

---

#### Atmospheric and Air quality parameters influence RV infection

- Sun radiation is significantly higher (p<0.0001) when negative serotype are found (Fig. 5)
- SO<sub>2</sub> levels negatively correlate (R=-0.942, p<0.0001) with the percentage of RV-free serotypes (Fig. 6)
- SO<sub>2</sub> levels are significantly higher (p<0.0001) when negative serotype are detected (Fig. 6)
- Barometric levels positively correlate (R=0.909, p<0.0001) with the percentage of RV-free serotypes (Fig. 7)
- Barometric levels are significantly lower (p<0.0001) when negative serotype are detected (Fig. 7)

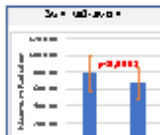


Fig. 5 - Sun radiation is significantly higher when negative serotypes are detected

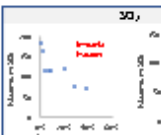


Fig. 6 - SO<sub>2</sub> levels negatively correlate with the percentage of RV-free serotypes

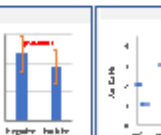



Fig. 7 - Barometric levels positively correlate with the percentage of RV-free serotypes

---

#### DISCUSSION

- Present results show a year-long circulation of RV with major Autumn peak. A Spring peak was detected when RV-free rates were considered, suggesting that RV infection seasonality also show seasonal variations
- The present results support an outdoor air RV transmission route as:
  - Outdoor air RV closely correlated to nasal RV presence and concentration
  - Parameters (sun radiation and SO<sub>2</sub>) parameters decreasing RV-free rates likely negatively influence RV-free nasal detection
  - Air quality parameters (barometric level) parameters conditioning immune system status<sup>8</sup> positively correlate with RV detection in nostrils
- Absence of RV in indoor air suggests that transmission may occur in conditioning filtering, but this requires further testing



#### CONCLUSIONS

The present results indicate that:

- RV circulation all-year but shows one major and one minor peak in autumn and spring respectively
- RV circulation is determined by:
  - environmental conditions (air-borne virus particles, weather and air pollution)
    - Modulating viral availability in aerosols (SO<sub>2</sub> and sun radiation)
    - Modulating immune system status (Barometric)
  - genetically encoded inter-individual variation in immunity
    - TollIP G Allele is associated with higher RV clearance in nasal infection, making TollIP G-Individuals more often year-long RV-free
    - IL6 G allele is associated with higher response after infection

#### MATERIALS AND METHODS

Individuals of volunteers are under medical supervision and follow strict hygienic. All procedures approved by ethics committees, including a single visit to the participants and nasal swabs at specific dates. In all samples collection (nasal and outdoor air) participants were informed how to use the collection tools. Under the supervision of the research team, participants were asked to use the collection tools. The collection tools were used in the morning (8h-10h) and in the afternoon (4h-6h) and were in use for 10 minutes. The collection tools were used in the morning (8h-10h) and in the afternoon (4h-6h) and were in use for 10 minutes. The collection tools were used in the morning (8h-10h) and in the afternoon (4h-6h) and were in use for 10 minutes.


---

#### BIBLIOGRAPHY


1. Smith, G. J. F., & Brown, J. H. (1986). The rhinovirus receptor protein. *Cell*, 44, 1201-1203.
2. Smith, G. J. F., & Brown, J. H. (1986). The rhinovirus receptor protein. *Cell*, 44, 1201-1203.
3. Smith, G. J. F., & Brown, J. H. (1986). The rhinovirus receptor protein. *Cell*, 44, 1201-1203.
4. Smith, G. J. F., & Brown, J. H. (1986). The rhinovirus receptor protein. *Cell*, 44, 1201-1203.
5. Smith, G. J. F., & Brown, J. H. (1986). The rhinovirus receptor protein. *Cell*, 44, 1201-1203.
6. Smith, G. J. F., & Brown, J. H. (1986). The rhinovirus receptor protein. *Cell*, 44, 1201-1203.
7. Smith, G. J. F., & Brown, J. H. (1986). The rhinovirus receptor protein. *Cell*, 44, 1201-1203.
8. Smith, G. J. F., & Brown, J. H. (1986). The rhinovirus receptor protein. *Cell*, 44, 1201-1203.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank the following institutions for their support: FCT (PTDC/BIA-PUB/114629/2015) and GENAS (BIA/1416/2015).




Anexo 5 – Poster apresentado no V Congresso Nacional de Virologia de 2018 (Porto, Portugal) e vencedor do prémio “Dra. Graça Rocha”.



V CONGRESSO NACIONAL DE VIROLOGIA  
PORTO - 2018  
26 - 27 OUT

## Rhinovirus Infection is influenced by outdoor-air virus presence and polymorphisms in TOLLIP and IL6 genes

**Zoldanes A.Z.<sup>1,2</sup>, Santos A.M.<sup>1,2</sup>, Marfisi R.<sup>1,2,3</sup>, Fiamin A.B.<sup>1,2</sup>, Damásio M.E.<sup>1,2</sup>, Cabedo J.B.<sup>1,2</sup>**  
<sup>1</sup>IPP, BIAL Research Centre, CERNITE Unit, Porto, Portugal (zoldanes@ipp.upp.pt)  
<sup>2</sup>Universidade Fernando Pessoa, Health Sciences Faculty, Porto, Portugal  
<sup>3</sup>Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli, Italy



---

### SUMMARY

**INTRODUCTION:**

- Rhinovirus (RV) is a common plasmavirus with over 150 serotypes and 8 species
- Responsible for 50% of common cold cases<sup>1</sup>
- Tropism to the upper respiratory tract, but can also infect the lower respiratory tract<sup>2,3</sup>
- Can be life threatening in people with chronic respiratory afflictions and elderly<sup>4</sup>
- Transmission routes are controversial but may involve:
  - Human-to-human
  - Indirect transmission (surfaces<sup>5</sup> and/or aerosols<sup>6,7</sup>)

**AIM:** Study the seasonality of RV in Portugal and the role of airborne virus and immune-system related genetic variations.

**STUDY DESIGN:**

- Track the year-long presence of RV in:
  - Monthly on nostrils of 86 healthy university students (80 nasal swab samples)
  - weekly on indoor and outdoor air at the university campus
- RNA was detected and semi-quantified by qPCR on a Lightcycler 1.1.
- All individuals were genotyped for immune-system related genetic variations (TOLLIP rs5740889, IL6 rs1800961, IL18 rs180944, TNFA rs1800629).

**RESULTS:**

- Nasal samples showed an increasing frequency of RV from Spring to Autumn
- No indoor air samples were found positive
- Several positive outdoor samples
  - Peak in November with all samples positive
  - Similarly quantification showed highest values in November
- Both IL6 and TOLLIP gene polymorphisms, but not IL18 nor TNFA polymorphisms were found to influence RV detection on the volunteers nostrils
  - TOLLIP G individuals more frequently were found to be year-long RV free
  - IL6 C individuals were found to show higher titers of RV in positive nostril samples


**CONCLUSIONS:**

- Single peak of RV in late autumn, early winter, possibly due to abnormally hot year. This may indicate the possibility of changing RV epidemiology.
- Close relationship between RV in nostrils of volunteers and in outdoor air, supporting the possibility of airborne viral transmission.
- Association between TOLLIP and IL6 alleles and RV infection in healthy subjects
  - TOLLIP allele influences TLR2 mediated signaling (needed for capsid recognition)
  - IL6 mediated responses are important for viral clearing after infection.

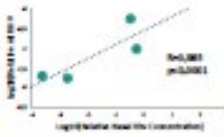
### Results

**RV detection in nostrils and air**

- Single peak of RV in nostrils (Fig.1)
- Similar findings in terms of RV concentration in nostrils and in outdoor air (Fig.1)
- Close correlation between RV concentrations in nostrils and in outdoor air (Fig.2)



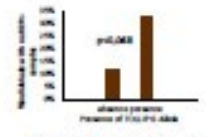
**Fig. 1** - Frequency of Positive Nasal swab samples versus RV titer in positive nasal swab samples and in outdoor air samples.



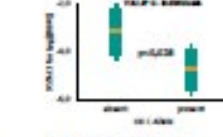
**Fig. 2** - Correlation between RV relative concentration in the nostrils of volunteers and outdoor air samples.

**Polymorphisms influence on year-long RV detection**

- TOLLIP G individuals showed more frequently a year-long absence of RV (Fig. 3)
- Among TOLLIP G individuals, the IL6 C allele is associated with higher RV concentrations (Fig. 4)



**Fig. 3** - TOLLIP G individuals show more frequently a year-long absence of RV.



**Fig. 4** - IL6 C individuals present higher RV concentrations if TOLLIP G+ included.

### DISCUSSION

RV transmission by air has been controversial, with contradictory findings over the years. Nevertheless, although reported to be less frequent, aerosol transmission is surely an active transmission route<sup>8</sup>. The present results indirectly support this view, as the outdoor air RV was found to closely correlate to nasal RV presence and concentration. Absence of RV in all indoor samples tested may result from efficient air conditioning filtering.

TOLLIP is a negative regulator of TLR2 (needed for RV capsid recognition before cell entry). The IL6 allele decreases TOLLIP and increases TLR2 leading to better RV clearance before infection. IL6 is needed for RV clearance after cell entry. TOLLIP sustains production of IL6 (needed for RV clearance) which may explain why TOLLIP G+ made the IL6 effect. After infection RVN reaction is mediated by TLR2, TLR6, not TLR2 making TOLLIP G less relevant but increasing the relevance of IL6 for effective infection clearance.

### CONCLUSION

The present results:

- Show a single peak of RV infection, possibly associated with warmer weather
- Suggests the possibility of a changing RV epidemiology with global warming
- Show a close relationship between the presence of viral RNA in the nostrils of volunteers and the presence of the viral RNA in outdoor air
  - Suggests the possibility of airborne viral transmission
- Show that TOLLIP G allele is associated with better RV clearance before infection, making TOLLIP G+ individuals more often year-long RV free
  - Indicates that interindividual susceptibility variance is genetically determined
- IL6 C allele is associated with better response after infection
  - Indicates that interindividual resistance to infection is genetically determined

### MATERIALS AND METHODS

**Recruitment of volunteers:** 86 students recruited signed informed consent and filled an admission inquiry. All procedures approved by the University Ethics Committee. Database registered in the National Personal Data Protection Organization.

**Nasal Sample collection:** Monthly for nasal swab collection from volunteers. Samples were collected from each nostril using sterile cotton swabs. Swabs from left and right nostrils were stored together in 200µl of RNA lysis buffer (Qiagen) for 24h at 4°C and then in QIAzol lysis reagent RNA extraction procedures.

**Air Sample Collection:** Indoor and outdoor air samples collected as previously described<sup>9</sup>. Briefly, Air filtered for 1 hour at a 4L/min rate using 10mm 2.0µm Millipore Filter(SIC) in closed cavities with the help of an air pump (Gardel legacy single pump). Filters were then cut in small pieces under sterile conditions using fresh sterile disposable scalpels and treated as described for the nasal samples.

**Viral RNA extraction:** Viral RNA extraction was performed using QIAamp Virus RNA Mini Kit (Qiagen) following the manufacturer instructions. Final elution volume was 80µl. RNA samples were stored at -80°C.

**RV RNA detection and quantification:** RV RNA amplification was performed by qPCR on a Lightcycler 1.1 (Roche, Germany) as previously described<sup>10</sup>. Semi-quantification was obtained relative to a dilution series of a positive sample.

**SNP typing:** SNPs were typed by PCR-RFLP essentially as previously described by others<sup>11,12</sup>.

### BIBLIOGRAPHY

- Widdowson MA, et al. *J Virol* 2005; 79: 1100-1105.
- Widdowson MA, et al. *J Virol* 2005; 79: 1100-1105.
- Widdowson MA, et al. *J Virol* 2005; 79: 1100-1105.
- Widdowson MA, et al. *J Virol* 2005; 79: 1100-1105.
- Widdowson MA, et al. *J Virol* 2005; 79: 1100-1105.
- Widdowson MA, et al. *J Virol* 2005; 79: 1100-1105.
- Widdowson MA, et al. *J Virol* 2005; 79: 1100-1105.
- Widdowson MA, et al. *J Virol* 2005; 79: 1100-1105.
- Widdowson MA, et al. *J Virol* 2005; 79: 1100-1105.
- Widdowson MA, et al. *J Virol* 2005; 79: 1100-1105.
- Widdowson MA, et al. *J Virol* 2005; 79: 1100-1105.
- Widdowson MA, et al. *J Virol* 2005; 79: 1100-1105.

### ACKNOWLEDGMENTS

This work was funded by Portuguese Science Foundation (PT) grants UIDB/04646/2016 and UIDP/04646/2016

**Anexo 6-** Artigo publicado na revista Food and Environmental Virology



# Year-Long Rhinovirus Infection is Influenced by Atmospheric Conditions, Outdoor Air Virus Presence, and Immune System-Related Genetic Polymorphisms

Ana Filipa Rodrigues<sup>1,2</sup> · Ana Mafalda Santos<sup>1,2</sup> · Ana Maria Ferreira<sup>1,2</sup> · Roberta Marino<sup>1,2</sup> · Maria Esmeralda Barreira<sup>1,2</sup> · José Manuel Cabeda<sup>1,2,3</sup> 

Received: 23 April 2019 / Accepted: 12 July 2019  
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2019

## Abstract

Rhinovirus is a common picornavirus with over 150 serotypes and three species, which is responsible for half of the human common cold cases. In people with chronic respiratory conditions and elders, it may also cause life-threatening diseases. Transmission routes are not definitively established but may involve direct human-to-human and indirect transmission (surfaces and aerosols based). In the present study, year-long presence of virus was tested by qPCR in the nostrils of young healthy volunteers and indoor and outdoor air samples. Results were correlated to atmospheric conditions (meteorological and air quality parameters) and voluntaries immune system-related genetic polymorphisms (TOLLIP rs5743899, IL6 rs1800795, IL1B rs16944, TNFA rs1800629) typed by PCR–RFLP. Nasal samples showed increased frequency and viral titers of Rhinovirus in spring and autumn. No indoor air samples tested positive for Rhinovirus, whereas outdoor air samples tested positive in late autumn. Sun radiation, atmospheric SO<sub>2</sub>, and benzene levels correlated with nostrils Rhinovirus detection. Both IL6 and TOLLIP polymorphisms but not TNFA or IL1B influenced Rhinovirus detection in the nostrils of voluntaries. Taken together, the results indicate that Rhinovirus circulation is determined by environmental conditions (weather, air-borne virus, and air pollution) and genetically encoded individual variation in immunity.

**Keywords** Rhinovirus · Environment · Polymorphism · Air-borne virus · Viral susceptibility

## Abbreviation

RHV Rhinovirus

## Introduction

Human Rhinovirus (RHV) is a very common human virus with over 150 different serotypes and three species (Basnet et al. 2019; Palmenberg et al. 2009), causing more than half of the common cold cases (Blaas and Fuchs 2016). In addition to its involvement in this mild, naturally resolving

infection, development of molecular-based multiplex detection has allowed the identification of its role among more severe acute respiratory infections (To et al. 2017). Indeed, it is now recognized as a frequent finding in acute respiratory infections (Jeon et al. 2019) leading to a significant risk (OR = 7.1) for this pathology in older adults (Shi et al. 2019). It is also involved in life-threatening disease in elders and individuals with chronic respiratory diseases (asthma, pulmonary obstructive disease, and cystic fibrosis) (Blaas and Fuchs 2016; Linden et al. 2019), and has even been found in association with at least one case of encephalopathy (Hazama et al. 2019). Rhinovirus has also been a frequent finding among hospitalized patients, in particular among young babies (Leotte et al. 2017; Wildenbeest et al. 2016) and patients undergoing chemotherapy (Aydin-Köker et al. 2019) or hematopoietic stem-cell transplantation (Pochon and Voigt 2019). Additionally, even if only common cold cases are taken into account, the abundance of these RHV-induced cases presents a social and economic burden including school and work absenteeism that should not be

✉ José Manuel Cabeda  
jcabeda@ufp.edu.pt

<sup>1</sup> Fernando Pessoa Energy, Environment and Health Research Unit (FP-ENAS), Porto, Portugal

<sup>2</sup> Health Sciences Faculty, Fernando Pessoa University, Porto, Portugal

<sup>3</sup> Universidade Fernando Pessoa, Gabinete B, Rua Carlos da Maia, 296, 4200-150 Porto, Portugal

disregarded (Bertino 2002; Fendrick et al. 2003; Nichol et al. 2005; Roelen et al. 2011).

RHV is among the smallest RNA viruses (picornavirus = Pico RNA virus) and infects the upper and sometimes lower respiratory apparatus (Berrajah et al. 2018; Gern 2002; Jacobs et al. 2013; McErlean et al. 2008) via its cellular receptors (ICAM-1, LDLR, or CDHR3) (Basnet et al. 2019; Blaas and Fuchs 2016; Bochkov and Gern 2016). The large frequency of infection may be related to the large serological diversity and the low immune response cross-reactivity (Blaas and Fuchs 2016). Additionally, interindividual variation in the susceptibility to RHV infection may be related to genetically encoded immunological variation (Drysdale et al. 2016), but this has not been clearly demonstrated.

Rhinovirus inoculation usually occurs via the nose, mouth, or eyes (Blaas and Fuchs 2016). An important susceptibility factor may be environmental temperature as it impacts on the viral activity, which could favor its infection during the cold season and in the upper respiratory tract (Blaas and Fuchs 2016). Rhinovirus transmission has been the subject of some controversy but there is direct evidence of person-to-person and indirect transmission (via surfaces or aerosols). RHV is clearly stable for hours in objects (Ikonen et al. 2018) but aerosol transmission is certainly also a transmission route (La-Rosa et al. 2013; Myatt et al. 2003, 2004). RHV infection seasonality may be even related with viral stability in objects and aerosols which may be affected by meteorological conditions (temperature, humidity, UV index) (Du-Prel et al. 2009) or the chemical stability/reactivity of the transmission route (air pollution) (Myatt et al. 2003). However, a recent study has failed to detect significant association between RHV positivity and temperature, humidity, or dew point (Price et al. 2019) clearly indicating that more studies are needed to clarify this point. Pollutants such as ozone and nitrogen oxides and even air-borne particles may also impact on the respiratory tract immunology (Kaan and Hegele 2003; Miller and Peden 2014; Peden and Bush 2015; Romero et al. 2011; Spannhake et al. 2002; Yang and Marr 2011), making air parameters a double sword affecting not only viral stability and activity but also potentially modulating immune system responses.

In the last decades, polymorphisms in several cytokine genes (soluble modulators of immune system activity) have been described, indicating the genetically encoded immunological variation is not just MHC encoded. Thus, interindividual viral susceptibility may also be affected by these gene variations. Indeed, several studies have indicated polymorphisms in TOLLIP, lambda interferon, IL1B, IL8, IL6, and TNFA among others to influence immunological response to viral infections (Doyle et al. 2010; Huang et al. 2016; Noah et al. 1995; Russell et al. 2014; Wine and Alper 2012). Since the immune response to viral agents is significantly different before and after viral cell entry, different

polymorphisms impacting on different components of the immune system could have a different effect on viral infectivity. In particular, TLR and TOLLIP polymorphisms can be expected to impact on the detection of free viral particles by TLR2 (Huang et al. 2016; Shah et al. 2012). Immune System response after infection may be more dependent on viral RNA recognition by TLR7 and TLR8, which is dependent on stress signals induced via IL6, making polymorphisms in these genes more relevant for viral clearance after infection (Doyle et al. 2007; O'Neill and Bowie 2007).

In the present work, we have searched for environment and genetic factors influencing the presence of RHV in the nostrils of young healthy volunteers. For that purpose, we tested by qPCR the year-long presence of RHV in the nostrils of a group of young volunteers. Concomitantly indoor and outdoor air samples were tested for the presence of RHV by the same method, and meteorological and air quality parameters have been recorded. Also, voluntaries were genotyped by PCR-RFLP for polymorphisms in 4 immune system-related genes (TOLLIP rs5743899, IL6 rs1800795, IL1B rs16944, TNFA rs1800629).

## Materials and Methods

### Population Studied

In this study, a total of 89 healthy young volunteers were enrolled, recruited from among the student population of the Faculty of Health Sciences of the Fernando Pessoa University in Porto, Portugal. The volunteers were aged between 20 and 41 years with females accounting for 2/3 of the volunteers. Each student provided a monthly swab sample collected for the characterization of the year-long presence of rhinovirus in the nostrils, and once during the observation period a blood sample or mouth endothelial cell cotton swab (if unwilling to donate blood) for DNA extraction and purification. At first appointment, voluntaries were asked to fill in a questionnaire characterizing themselves on socio-demographic aspects, health living style, and known disease/allergy preconditions.

### Nasal Sample Collection

Voluntaries came monthly for nasal swab collection. Samples were collected from each nostril using sterile cotton swabs. Swabs from left and right nostrils were stored together in 200 µL of RNALater (Invitrogen, USA) solution for 24 h at 4 °C as recommended by the manufacturer to allow the RNA stabilizer to embed the sample and prevent RNA decay, and then transferred to a deep freezer (−70 °C) until RNA extraction procedures. At each appointment,

volunteers were asked to fill in a questionnaire about symptoms experienced in the last 30 days.

### Viral RNA Extraction

No viral elution from swabs or filters was performed as viral lysis was performed in the collection material. Viral RNA extraction was performed using QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Germany) following the manufacturer's instructions. Final elution volume was 60  $\mu$ L. RNA samples were stored at  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### Rhinovirus RNA Detection and Quantification

Rhinovirus RNA amplification was performed by qPCR on a Lightcycler 1.1 (Roche, Switzerland) as previously described (Myatt et al. 2004). Briefly, the primers RAF (5'-GACAGTGTTCYAGCCTGCG-3'), RBF (5'-RACHGTGTCYYAGCCTGCG-3'), and LR (5'-GAAACACGGACA CCCAAAGTA-3') were used at a final concentration of 800 nM together with the Taqman Probe (6-FAM-5'-TCC TCCGGCCCCTGAATGYGGC-3'-BHQ1) at 160 nM in a Quantitec Probe RT-PCR Master Mix (Qiagen, Germany). The reaction then took place on a Lightcycler 1.1 thermocycler (Roche, Switzerland). First a reverse transcription step was performed at  $50^{\circ}\text{C}$  for 20 min followed by the RT enzyme inactivation and polymerase activation at  $95^{\circ}\text{C}$  for 15 min. Real-time PCR was then performed using 45 cycles consisting of a denaturation step at  $95^{\circ}\text{C}$  for zero seconds, and an annealing/polymerization step at  $60^{\circ}\text{C}$  for 1 min. Fluorescence reading was done at the end of the amplification step. Semi-quantification was obtained relative to a dilution series of a positive sample.

### Air Sample Collection

Indoor and outdoor air samples were collected as previously described (Myatt et al. 2004). Briefly, air was filtered for 1 h at a 4 L/min rate using 37 mm 2.0  $\mu$ m Teflon filters (SKC,

UK) in closed cassettes with the help of an air pump (Leland legacy single pump, SKC, UK). Filters were then cut in small pieces under sterile conditions using fresh sterile disposable scalpels and treated as described for the nasal samples. Air samples were always collected at the same spots. Outdoor air samples were collected outside a third-floor lab window at facilities not used for any other manipulation of the project samples. Indoor air samples were collected at a university cafeteria, a common meeting point for students and staff, on top of a balcony not usually manipulated by the cafeteria staff or clients.

### Meteorological and Air Quality Data

Daily meteorological parameters were collected from the FP-ENAS meteorological station and the public air quality monitoring infrastructure. Data were used from the station closest to the university facilities where volunteers spend most of their time. Meteorological parameters analyzed were wind speed, temperature, radiation, humidity, and air pressure. Air quality parameters analyzed were ozone, nitrogen oxides, carbon monoxide, sulfur dioxide, and benzene levels.

### DNA Preparation

Genomic DNA was extracted from blood or epithelial mouth cells using Qiam mini Blood DNA kit (Qiagen, Germany) according to the manufacturer's instruction. Genomic DNA was eluted with 200  $\mu$ L of nuclease-free water and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Genotyping was performed by PCR-RFLP using previously described primers and enzymes as described in Table 1. Briefly 5  $\mu$ L of DNA were mixed with iProof High-Fidelity Master Mix (BioRad, USA), and 1  $\mu$ M of each primer in a total volume of 20  $\mu$ L and subjected to the thermal cycling conditions in Table 1. After PCR, 10  $\mu$ L of the amplicon was mixed with the manufacturer-provided enzyme buffer and respective restriction endonuclease (New England Biolabs, UK; Table 1) for 2 h at  $37^{\circ}\text{C}$ . PCR

**Table 1** Experimental conditions used for genotyping

Gene/SNP	Primers	PCR thermal cycling	RE enzyme
TOLLIP (de Araujo et al. 2015) rs5743899	5'-GGCAATGGCAGTGGCCACCAGTGA-3' 5'-CCGATGCCCGCACACCTGTGTGAT-3'	3 min— $98^{\circ}\text{C}$ 35 $\times$ [30 s— $98^{\circ}\text{C}$ ; 30 s— $65^{\circ}\text{C}$ ; 30 s— $72^{\circ}\text{C}$ ]	HhaI
IL6 (Honsawek et al. 2011) rs1800795	5'-TGACTTCAGCTTTACTCTTTGT-3' 5'-CTGATTGAAAACCTTATTAAG-3'	3 min— $98^{\circ}\text{C}$ 35 $\times$ [30 s— $98^{\circ}\text{C}$ ; 30 s— $55^{\circ}\text{C}$ ; 30 s— $72^{\circ}\text{C}$ ]	SFaNI
IL1B (Ishii et al. 2000) rs16944	5'-TGGCATTGATCTGGTTCATC-3' 5'-GTTTAGGAATCTTCCCACTT-3'	3 min— $98^{\circ}\text{C}$ 35 $\times$ [30 s— $98^{\circ}\text{C}$ ; 30 s— $60^{\circ}\text{C}$ ; 30 s— $72^{\circ}\text{C}$ ]	AvaI
TNFA (Sandhya et al. 2013) rs1800629	5'AGGCAATAGGTTTTGAGGGCCAT-3' 5'TCCTCCCTGCTCCGATTC-3'	3 min— $98^{\circ}\text{C}$ 35 $\times$ [30 s— $98^{\circ}\text{C}$ ; 15 s— $63^{\circ}\text{C}$ ; 30 s— $72^{\circ}\text{C}$ ]	NcoI

RE restriction endonuclease

restriction fragments were size separated by electrophoresis in 4% NuSieve 3:1 TAE agarose gel (FMC, USA).

## Statistical Analysis

Data were statistically analyzed using Statistical Package for Social Sciences (SPSS) version 22. Comparisons between RHV-positive and RHV-negative samples and between individuals with or without a specific allele were done by the Student's *t* test. Correlation between variables was analyzed using Pearson Correlation. All statistical analyses were performed at a significance level of 95%.

## Ethical and Legal Aspects

The study was approved by the Fernando Pessoa University Ethical Committee. All voluntaries were explained the study, signed an informed consent, and were given the possibility to drop the study at any moment. The database with the study results was authorized and registered by the Portuguese National Committee for Personal Data Protection.

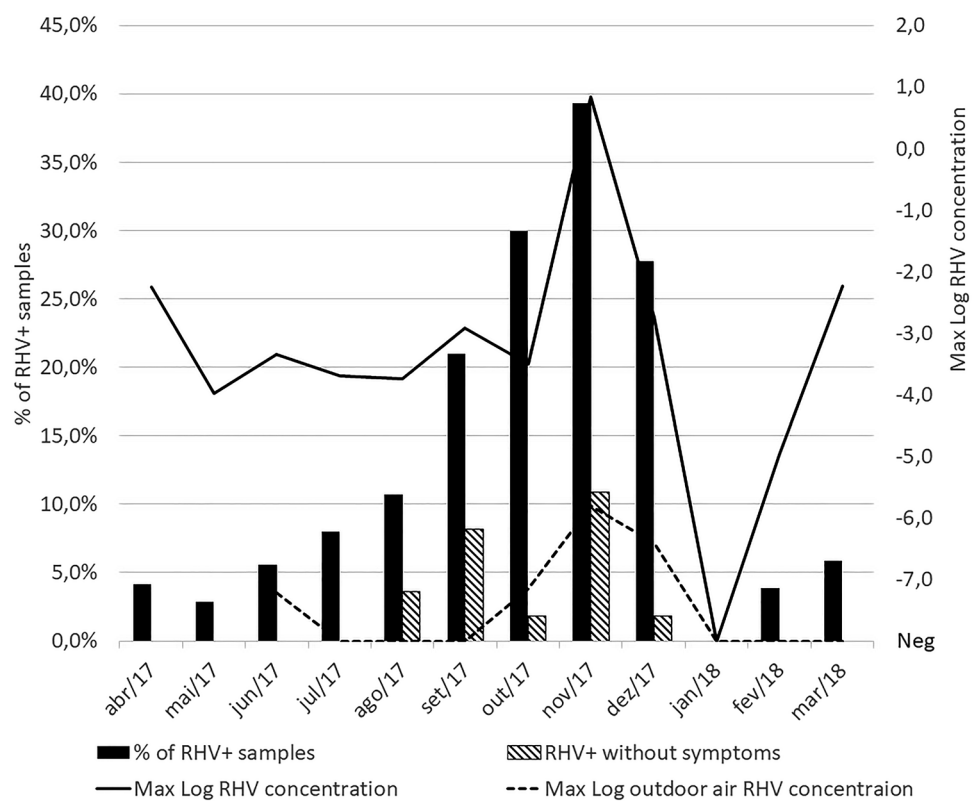
## Results

### RHV Detection in Nostrils of Voluntaries

As can be seen in Fig. 1, RHV was detected in the nostrils of voluntaries during the entire observation period with the exception of January 2018. The monthly frequency of positive samples showed a minimum of 0% in January and peaked to over 40% in November. A similar trend was observed for the RHV titers with a maximum RHV concentration in November but with a smaller peak in March/April.

Next, we tested the relation between detection of RHV in voluntaries and the self-reporting of common cold-associated symptoms. Results showed that RHV was more frequently found among individuals self-reporting the presence of common cold symptom (16%) than among individuals without them (6%). Interestingly, individuals with RHV in the nostrils but not reporting symptoms were very rare and only occurred from August to December, the period of increased RHV incidence, likely reflecting early RHV detection before symptoms arise which one would expect to be more likely in periods of high RHV circulation.

**Fig. 1** Frequency of positive nasal swab samples (filled bars) versus nasal RHV RNA titer (continuous line) and outdoor air RHV RNA titer (dotted line). Concentration was measured as relative to one positive control sample from which a tenfold series dilution was performed and tested. Slashed bars indicate the frequency of RHV-positive nasal samples in individuals not reporting common cold symptoms



## RHV Detection in Air Samples

Contrary to our expectations, no indoor air samples were found positive for RHV. However, during the period of higher nostril RHV incidence, positive outdoor air samples were found from October to December, thus coincident to the months of higher frequency of RHV in the nostrils of voluntaries (Fig. 1). Furthermore, the observed RHV concentrations in nostrils and in Air samples showed a similar pattern, although with clearly different scales (Fig. 1). In fact, a statistically significant correlation was found between nostril RHV concentration and outdoor air RHV concentration ( $R=0.985$ ;  $p<0.0001$ ).

## RHV Nostril Detection and Meteorological and Air Quality Parameters

Next, we investigated whether meteorological and air quality parameters were somehow related to the frequency of RHV-positive samples. As can be seen in Fig. 2, sun radiation was significantly lower when positive RHV samples were found. This is also reflected on a tendency for a negative correlation between radiation and the percentage of RHV-positive samples, but it does not reach statistical significance. Similarly, levels of sulfur dioxide were significantly lower when positive samples were detected ( $p<0.0001$ ) allowing a negative correlation between maximum  $\text{SO}_2$  levels and the percentage of RHV+ nasal swabs (Fig. 3;  $R=-0.843$ ;  $p<0.009$ ). Interestingly, the inverse association was found between

nasal swab RHV positivity and benzene atmospheric levels (Fig. 4). Higher benzene levels were associated with positive RHV samples, and a significant positive correlation was found (Fig. 4;  $R=0.809$ ;  $p<0.001$ ).

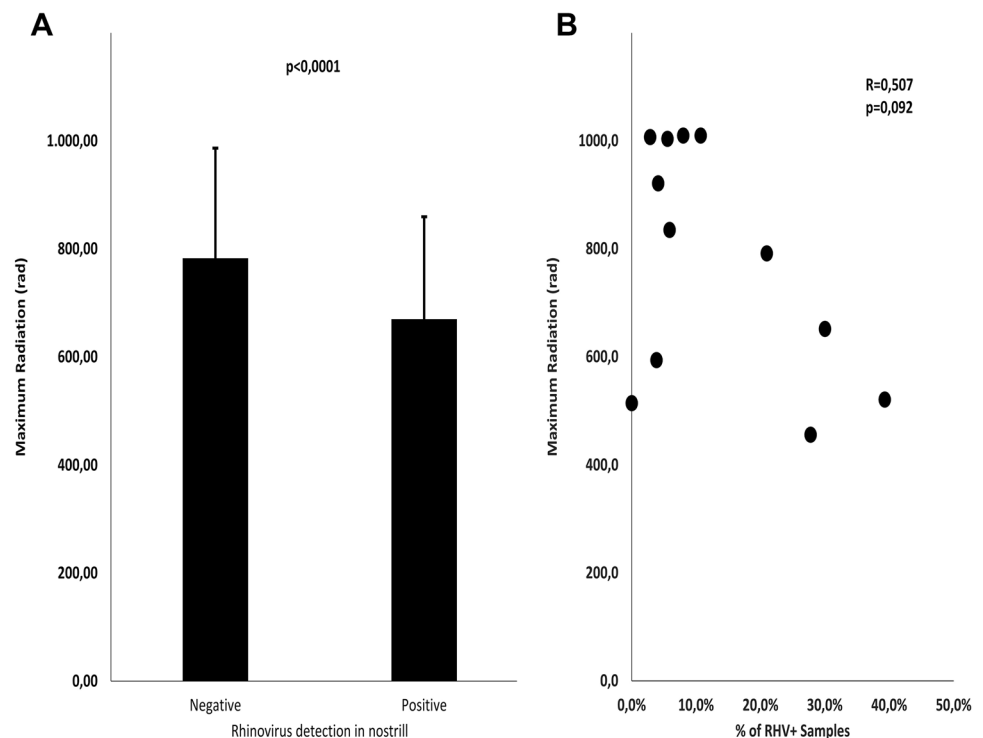
## Influence of Genetic Polymorphisms on RHV Nostril Detection

No difference was found between individuals carrying the various alleles of IL1B (rs16944) and TNFA (rs1800629). However, the presence of the G allele of the TOLLIP rs5743899 SNP significantly increased ( $p<0.048$ ) the likelihood of testing negative for RHV during the entire observation period (Fig. 5). Additionally, if this effect of the TOLLIP SNP is excluded by considering only individuals without the TOLLIC G allele, a statistically significant ( $p<0.028$ ) higher viral titer is found among individuals with the IL6 rs1800795 C allele (Fig. 6).

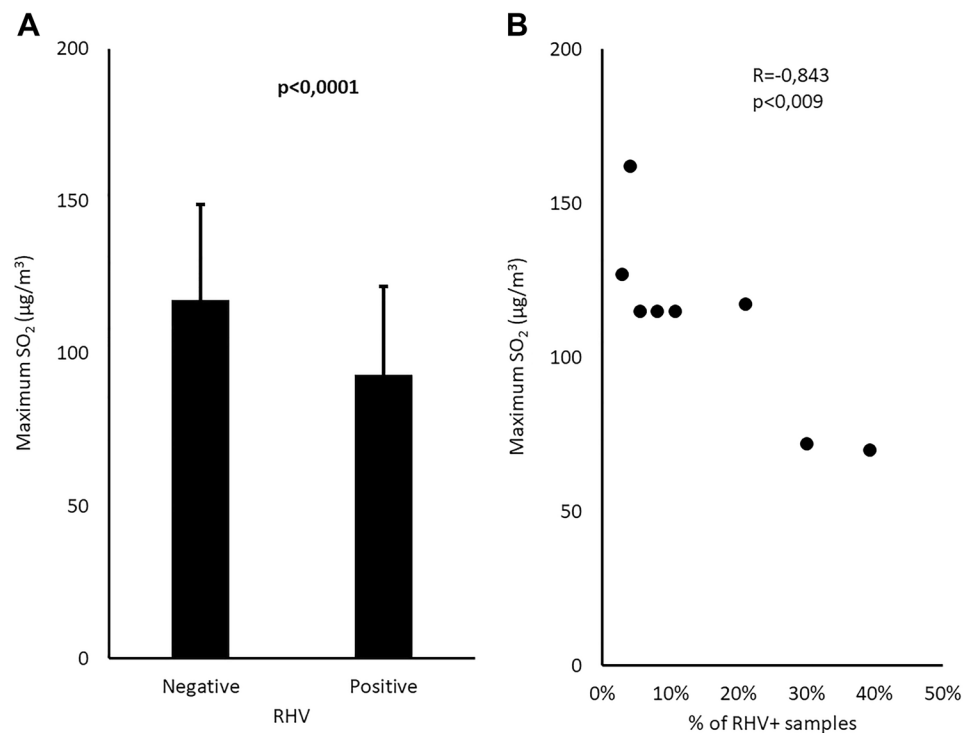
## Discussion

The present results indicate a year-long circulation of RHV, with an increase in incidence during late Autumn–early winter period. Additionally, an extra peak of RHV activity was found in spring when viral concentrations were taken into consideration which suggests a seasonal variation not only in viral infectivity but also in infection severity indicating that

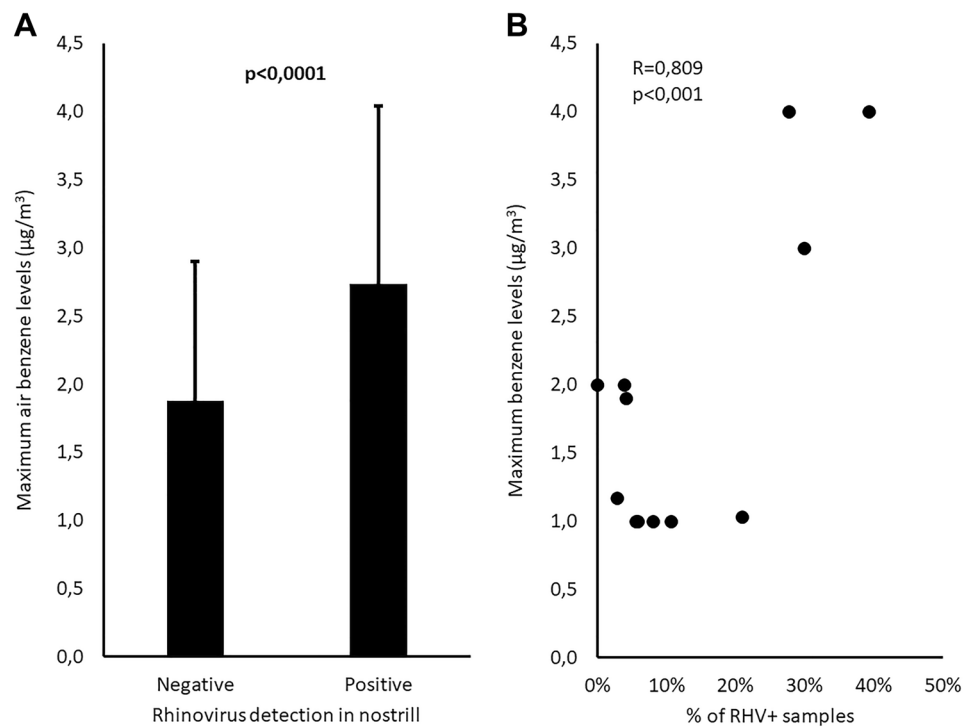
**Fig. 2** Maximum monthly radiation versus RHV detection in the nostril of voluntaries. **a** Negative samples are associated with higher levels of sun maximum radiation, and positive samples with lower levels. **b** This produces a negative correlation between maximum monthly radiation and the percentage of monthly positive samples, but it does not reach statistical significance (lack of significance can be attributed to two outliers with both low percentage of RHV+ samples and low maximum sun radiation corresponding to the observations of January and February 2018)



**Fig. 3** Levels of atmospheric Sulfur dioxide versus nasal swab RHV positivity. **a** Atmospheric  $\text{SO}_2$  levels were found to be lower when nasal swabs test positive for RHV. **b** This produces a negative correlation between maximum levels of  $\text{SO}_2$  in the atmosphere and the percentage of nasal swabs positive for RHV ( $R = -0.843$ ;  $p < 0.009$ )



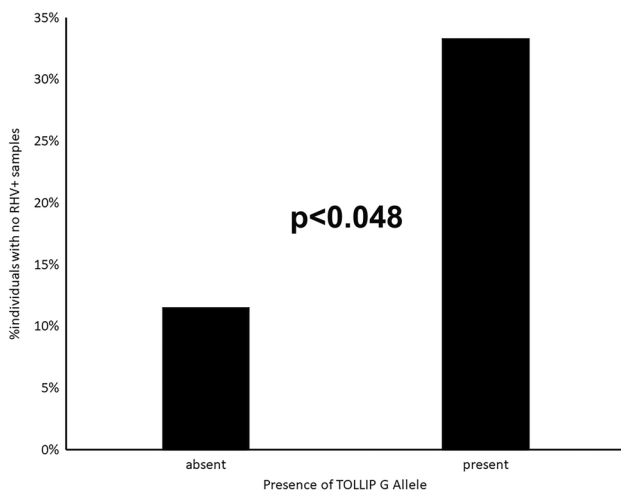
**Fig. 4** Levels of atmospheric benzene versus nasal swab RHV positivity. **a** Atmospheric benzene levels were found to be higher when nasal swabs test positive for RHV. **b** This produces a positive correlation between benzene atmospheric levels and the percentage of nasal swabs positive for RHV ( $R = -0.809$ ;  $p < 0.001$ )



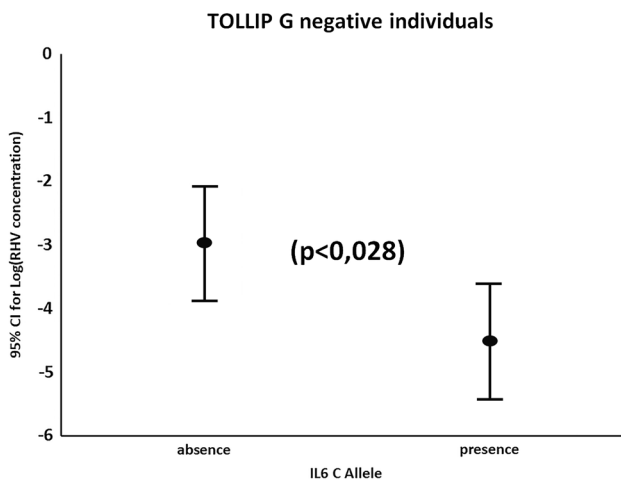
viral concentration should also be assayed when studying the epidemiology of RHV infection.

RHV aerosol transmission is surely an active transmission RHV route (La-Rosa et al. 2013; Myatt et al. 2003, 2004), but is usually interpreted as only impacting on direct

person–person transmissions. The present results support an outdoor air RHV transmission route as outdoor air RHV closely correlated to nasal RHV presence and concentration even if they do not allow to establish a definite causal effect. Confirmation of this would require the genotyping of



**Fig. 5** The percentage of individuals that test negative for nasal RHHV during the entire observation period is significantly higher ( $p < 0.048$ ) among individuals with the TOLLIP rs5743899 G allele



**Fig. 6** When considering only individuals without the TOLLIP rs5743899 G allele, the nasal RHHV concentration was found to be dependent on the presence of the IL6 rs1800795 C allele, with a significant ( $p < 0.028$ ) lower RHHV concentration being found among individuals with the IL6 C allele

the viruses detected, something that should be addressed in follow-up studies. Furthermore, the availability of sequencing data would also help clarify whether volunteers with consecutive positive samples result from persistent infections or from reinfections.

Another interesting evidence supporting the air RHHV transmission was the finding that atmospheric parameters that may affect atmospheric viral stability such as sun radiation (Myatt et al. 2003) and  $\text{SO}_2$  levels were negatively correlated to RHHV nostril detection. Interestingly, these are exactly the parameters long ago described to show virucidal effect in an experimental aerosol exposure of Venezuelan

Equine Encephalomyelitis Virus (Berendt et al. 1972) suggesting a direct environmental exposure effect on the virus particles. However, experimental exposure of animals to viruses also showed a collaborative effect of  $\text{SO}_2$  and influenza on short-term exposure (Lebowitz and Fairchild 1973), suggesting a dual role for  $\text{SO}_2$  (decreased viral stability but increased immune system susceptibility) that could complicate analysis. This is also suggested by Asian results indicating a positive correlation between  $\text{SO}_2$  and lower respiratory infections, but only during the dry season (Le et al. 2012), a period with also high radiation levels, thus making the  $\text{SO}_2$  virucidal effect redundant and potentiating the effect of  $\text{SO}_2$  on the immune system. Interestingly, benzene, an air pollutant previously described to potentially condition immune system status by decreasing immune system cells in blood and spleen and decrease immune system progenitor cells leaving the bone marrow (Wen et al. 2016; Zhang et al. 2010) showed a positive correlation with RHHV detection in nostrils, further suggesting that air quality may affect not only virus stability and infectivity but also modulate immune system responses to virus. A similar effect has also been demonstrated by others for syncytial respiratory virus (Nenna et al. 2017) suggesting this to be an effect that may be relevant for several viral-associated pathologies.

The lack of detection of RHHV in indoor air samples came as a surprising result. Previous work by others has shown the detection of RHHV in closed environments reflecting virus shedding (Myatt et al. 2004). However, our results may reflect the unintended proximity of an air conditioning exhaust to the site of air collection, possibly indicating the efficiency of the air conditioning at clearing the air from viral particles. This result suggests that air conditioning filters should be examined in future experiments as it could indicate an easy to implement purification system during winter, especially in retirement houses where RHHV infection severity and morbidity may be especially important.

TOLLIP is a negative regulator of TLR2 (Shah et al. 2012; Zhang and Ghosh 2002). In turn, TLR2 is an important immune system surveillance receptor needed for RHHV capsid recognition before the virus enters the cells (Huang et al. 2016; Triantafilou et al. 2011). The TOLLIP rs5743899 G allele is known to decrease TOLLIP expression (Huang et al. 2016), therefore increasing TLR2 expression, which in turn contributes to better RHHV detection and clearance by the immune system before viral cell entry (Bentley et al. 2019), effectively preventing infection. Additionally, a recent paper has shown that Tollip inhibits ST2 signaling in RHHV-exposed airway epithelial cells, making the lower expression of TOLLIP a way of counteracting this inhibitory pathway, and achieving better RHHV particle detection and clearance, even if it may lead to increased neutrophilic inflammation (Dakhama et al. 2019). After RHHV enters cells, its recognition shifts from TLR2 to TLR7 and TLR8 which recognize

viral single-stranded RNA (O'Neill and Bowie 2007). These receptors are known to send an emergency signal via the induction of IL6 (Doyle et al. 2007) which is a critical anti-inflammatory regulator of viral-induced immunopathology in the respiratory tract (Pyle et al. 2017). This IL6 pathway is therefore likely only relevant after viral cell entry and is thus independent of the TLR2-related TOLLIP effect we propose above. IL6 rs1800795 has been associated with lower gene expression which may counteract the increased expression stimulated by some viral components (Tanaka et al. 2014). However, since TOLLIP has been shown to sustain production of IL6 in several inflammatory conditions (Humbert-Claude et al. 2016; Kowalski and Li 2017), the effect of the IL6 gene polymorphism may only be seen when TOLLIP-induced sustained IL6 production is not taking place, which may explain why, in our results, the presence of the TOLLIP G allele masks the IL6 C allele effect. In the absence of the TOLLIP G allele, the absence of the IL6 C allele decreases IL6 levels, thus decreasing the emergency response to RHV after infection is established leading to higher viral titers found.

## Conclusions

The present results confirm an autumn/winter increase in the frequency of RHV infections as reported by others (Jeon et al. 2019; Price et al. 2019; Reis and Shaman 2018; To et al. 2017), while also revealing an increase in the viral titers in positive cases in early spring, which is also in agreement with the previous reports (Leotte et al. 2017; Reis and Shaman 2018; To et al. 2017). A close association between the presence of RNA virus in the nostrils of voluntaries and the self-reporting of common cold symptoms was also found revealing that infection is usually associated with symptoms. The finding of air-borne RHV virus with a frequency and concentration closely resembling the nasal viral detection strongly suggests atmospheric air-carrying of virus as a potentially relevant transmission route. A similar conclusion may be drawn from the finding of environmental factors such as sun radiation and air pollution correlating with virus nostril detection. Interestingly, specific pollutants such as SO<sub>2</sub> or benzene showed differential effects, suggesting a dual-sword effect on virus stability in air and on immune system modulation effects. Both of these aspects deserve further clarification in controlled experimental conditions. Finally, two different polymorphisms have been found to differentially modulate the risk for RHV infection by two complementary mechanisms: TOLLIP rs5743899 G allele may increase resistance to infection, whereas IL6 rs1800795 C allele may decrease RHV titers when infection occurs.

Thus, the present results show that RHV infection is influenced by both environmental factors (meteorological factors,

RHV air-borne particles, and air quality determinants) and by genetic-based differential susceptibility to RHV infection.

**Acknowledgements** This work was supported by Portuguese Science Foundation (FCT) Grants UID/Multi/04546/2013, UID/Multi/04546/2016, and UID/Multi/04546/2019. The funding agency took no part in study design, collection, analysis and interpretation of data, writing of the paper or on the decision to publish it.

**Author Contributions** Conceptualization: JMC and MEB; Methodology: JMC, MEB, AFR, AMS, AMF, and RM; Software development, Validation, Formal analysis, Resources, Data curation, Supervision, Project administration, Funding acquisition, and Writing—original draft preparation: JMC; Investigation: JMC, MEB, AFR, AMS, AMF, and RM; Writing—review and editing: JMC, MEB, AFR, AMS, AMF, and RM.

## Compliance with Ethical Standards

**Conflict of interest** The authors declare no conflicts of interest.

**Research Involving Human Participants and/or Animals** The work was approved by the University Fernando Pessoa Ethics committee and done in accordance with the ethical standards as laid down by the 14964 Declaration of Helsinki and later amendments. All data acquisitions were done using a Individual ID code known only to the voluntary subject. Database was authorized and registered with the National Individual Data Protection committee and contains no data capable of identifying the subject under study.

**Informed Consent** Informed consent was obtained from all individual participants included in the study, prior to any sample or data acquisition. Informed consent forms were approved by the University ethics committee. Voluntaries were allowed to drop the study at any time during the observation period.

## References

- Aydin-Köker, S., Demirağ, B., Tahta, N., Bayram, N., Oymak, Y., Karapinar, T. H., et al. (2019). A 3-year retrospective study of the epidemiology of acute respiratory viral infections in pediatric patients with cancer undergoing chemotherapy. *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*. <https://doi.org/10.1097/mpH.0000000000001418>.
- Basnet, S., Palmenberg, A. C., & Gern, J. E. (2019). Rhinoviruses and their receptors. *Chest*. <https://doi.org/10.1016/j.chest.2018.12.012>.
- Bentley, J. K., Han, M., Jaipalli, S., Hinde, J., Lei, J., Ishikawa, T., et al. (2019). Myristoylated rhinovirus VP4 protein activates TLR2-dependent pro-inflammatory gene expression. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00365.2018>.
- Berendt, R. F., Dorsey, E. L., & Hearn, H. J. (1972). Virucidal properties of light and SO<sub>2</sub> I. Effect on aerosolized venezuelan equine encephalomyelitis virus. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 139(1), 1–5. <https://doi.org/10.3181/00379727-139-36063>.
- Berrajah, L., Ben Slama, K. A., Khbou, I., Gargouri, S., Chtourou, A., Znazen, A., et al. (2018). Virus et bactéries atypiques détectés dans les infections respiratoires basses communautaires de l'enfant dans la région de Sfax en Tunisie. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 111(2), 90–98. <https://doi.org/10.3166/bspe-2018-0024>.

- Bertino, J. S. (2002). Cost burden of viral respiratory infections: issues for formulary decision makers. *The American Journal of Medicine*, 112 Suppl 6A, 42S–49S. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11955459>. Accessed 5 April 2019.
- Blaas, D., & Fuchs, R. (2016). Mechanism of human rhinovirus infections. *Molecular and Cellular Pediatrics*, 3, 21–24. <https://doi.org/10.1186/s40348-016-0049-3>.
- Bochkov, Y. A., & Gern, J. E. (2016). Rhinoviruses and their receptors: implications for allergic disease. *Current Allergy and Asthma Reports*, 16(4), 30. <https://doi.org/10.1007/s11882-016-0608-7>.
- Dakhama, A., Al Mubarak, R., Pavelka, N., Voelker, D., Seibold, M., Ledford, J. G., et al. (2019). Tollip inhibits ST2 signaling in airway epithelial cells exposed to type 2 cytokines and rhinovirus. *Journal of Innate Immunity*. <https://doi.org/10.1159/000497072>.
- de Araujo, F. J., da Silva, L. D. O., Mesquita, T. G., Pinheiro, S. K., de Seixas Vital, W., Chrusciak-Talhari, A., et al. (2015). Polymorphisms in the TOLLIP gene influence susceptibility to cutaneous leishmaniasis caused by leishmania guyanensis in the amazonas state of Brazil. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 9(6), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003875>.
- Doyle, W. J., Casselbrant, M. L., Li-Korotky, H., Cullen Doyle, A. P., Lo, C., Turner, R., et al. (2010). The interleukin 6–174 C/C genotype predicts greater rhinovirus illness. *The Journal of Infectious Diseases*, 201(2), 199–206. <https://doi.org/10.1086/649559>.
- Doyle, S. L., Jefferies, C. A., Feighery, C., & O'Neill, L. A. J. (2007). Signaling by Toll-like receptors 8 and 9 requires Bruton's tyrosine kinase. *The Journal of Biological Chemistry*, 282(51), 36953–36960. <https://doi.org/10.1074/jbc.M707682200>.
- Drysdale, S. B., Alcazar, M., Wilson, T., Smith, M., Zuckerman, M., Hodemaekers, H. M., et al. (2016). Functional and genetic predisposition to rhinovirus lower respiratory tract infections in prematurely born infants. *European Journal of Pediatrics*, 175(12), 1943–1949. <https://doi.org/10.1007/s00431-016-2780-0>.
- Du-Prel, J., Puppe, W., Gröndahl, B., Knuf, M., Weigl, J. A. I., Schaaff, F., et al. (2009). Are meteorological parameters associated with acute respiratory tract infections? *Clinical Infectious Diseases*, 49(6), 861–868. <https://doi.org/10.1086/605435>.
- Fendrick, A. M., Monto, A. S., Nightengale, B., & Sarnes, M. (2003). The economic burden of non-influenza-related viral respiratory tract infection in the United States. *Archives of Internal Medicine*, 163(4), 487–494. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12588210>. Accessed 5 April 2019.
- Gern, J. E. (2002). Rhinovirus respiratory infections and asthma. *The American Journal of Medicine*, 19S–27S. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11955456>.
- Hazama, K., Shihara, T., Tsukagoshi, H., Matsushige, T., Dowa, Y., & Watanabe, M. (2019). Rhinovirus-associated acute encephalitis/encephalopathy and cerebellitis. *Brain and Development*. <https://doi.org/10.1016/j.braindev.2019.02.014>.
- Honsawek, S., Deepaisarnsakul, B., Tanavalee, A., Yuktanandana, P., Bumrungrpanichthaworn, P., Malila, S., et al. (2011). Association of the IL-6 -174G/C gene polymorphism with knee osteoarthritis in a Thai population. *Genetics and Molecular Research*, 10(3), 1674–1680. <https://doi.org/10.4238/vol10-3gmr1161>.
- Huang, C., Jiang, D., Francisco, D., Berman, R., Wu, Q., Ledford, J. G., et al. (2016). Tollip SNP rs5743899 modulates human airway epithelial responses to rhinovirus infection. *Clinical & Experimental Allergy*. <https://doi.org/10.1111/cea.12793>.
- Humbert-Claude, M., Duc, D., Dwir, D., Thieren, L., Sandström von Tobel, J., Begka, C., et al. (2016). Tollip, an early regulator of the acute inflammatory response in the substantia nigra. *Journal of Neuroinflammation*, 13(1), 303. <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0766-5>.
- Ikonen, N., Savolainen-Kopra, C., Enstone, J. E., Kulmala, I., Pasanen, P., Salmela, A., et al. (2018). Deposition of respiratory virus pathogens on frequently touched surfaces at airports. *BMC Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1186/s12879-018-3150-5>.
- Ishii, T., Matsuse, T., Teramoto, S., Matsui, H., Miyao, M., Hosoi, T., et al. (2000). Neither IL-1 $\beta$ , IL-1 receptor antagonist, nor TNF- $\alpha$  polymorphisms are associated with susceptibility to COPD. *Respiratory Medicine*, 94(9), 847–851. <https://doi.org/10.1053/rmed.2000.0808>.
- Jacobs, S. E., Lamson, D. M., Kirsten, S., & Walsh, T. J. (2013). Human rhinoviruses. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(1), 135–162. <https://doi.org/10.1128/CMR.00077-12>.
- Jeon, J., Han, M., Chang, H., Park, S., Lee, J., Ahn, Y., et al. (2019). Incidence and seasonality of respiratory viruses causing acute respiratory infections in the Northern United Arab Emirates. *Journal of Medical Virology*. <https://doi.org/10.1002/jmv.25464>.
- Kaan, P. M., & Hegele, R. G. (2003). Interaction between respiratory syncytial virus and particulate matter in guinea pig alveolar macrophages. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 28(6), 697–704. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2002-0115OC>.
- Kowalski, E. J. A., & Li, L. (2017). Toll-interacting protein in resolving and non-resolving inflammation. *Frontiers in Immunology*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00511>.
- La-Rosa, G., Fratini, M., Della Libera, S., Iaconelli, M., & Muscillo, M. (2013). Viral infections acquired indoors through airborne, droplet or contact transmission. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanita*, 49(2), 124–132. [https://doi.org/10.4415/ANN\\_13\\_02\\_03](https://doi.org/10.4415/ANN_13_02_03).
- Le, T. G., Ngo, L., Mehta, S., Do, V. D., Thach, T. Q., Vu, X. D., et al. (2012). Effects of short-term exposure to air pollution on hospital admissions of young children for acute lower respiratory infections in Ho Chi Minh City. *Vietnam. Research report (Health Effects Institute)*, 169, 5–83.
- Lebowitz, M. D., & Fairchild, G. A. (1973). The effects of sulfur dioxide and A2 influenza virus on pneumonia and weight reduction in mice: an analysis of stimulus-response relationships. *Chemico-Biological Interactions*, 7(5), 317–326.
- Leotte, J., Trombetta, H., Faggion, H. Z., Almeida, B. M., Nogueira, M. B., Vidal, L. R., et al. (2017). Impact and seasonality of human rhinovirus infection in hospitalized patients for two consecutive years. *Jornal de Pediatria*, 93(3), 294–300. <https://doi.org/10.1016/j.jped.2016.07.004>.
- Linden, D., Guo-Parke, H., Coyle, P. V., Fairley, D., McAuley, D. F., Taggart, C. C., et al. (2019). Respiratory viral infection: a potential “missing link” in the pathogenesis of COPD. *European Respiratory Review*, 28(151), 180063. <https://doi.org/10.1183/1600617.0063-2018>.
- McErlean, P., Shackelton, L. A., Andrews, E., Webster, D. R., Lambert, S. B., Nissen, M. D., et al. (2008). Distinguishing molecular features and clinical characteristics of a putative new rhinovirus species, Human rhinovirus C (HRV C). *PLoS ONE*, 3(4), 15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001847>.
- Miller, R. L., & Peden, D. B. (2014). Environmental effects on immune responses in patients with atopy and asthma. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 134(5), 1001–1008. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2014.07.064>.
- Myatt, T. A., Johnston, S. L., Rudnick, S., & Milton, D. K. (2003). Airborne rhinovirus detection and effect of ultraviolet irradiation on detection by a semi-nested RT-PCR assay. *BMC Public Health*, 3, 5. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-3-5>.
- Myatt, T. A., Johnston, S. L., Zuo, Z., Wand, M., Keadze, T., Rudnick, S., et al. (2004). Detection of airborne rhinovirus and its relation to outdoor air supply in office environments. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 169(11), 1187–1190. <https://doi.org/10.1164/rccm.200306-760oc>.
- Nenna, R., Evangelisti, M., Frassanito, A., Scagnolari, C., Pierangeli, A., Antonelli, G., et al. (2017). Respiratory syncytial virus bronchiolitis, weather conditions and air pollution in an Italian urban

- area: an observational study. *Environmental Research*, 158, 188–193. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.06.014>.
- Nichol, K. L., Heilly, S. D., & Ehlinger, E. (2005). Colds and influenza-like illnesses in university students: impact on health, academic and work performance, and health care use. *Clinical Infectious Diseases*, 40(9), 1263–1270. <https://doi.org/10.1086/429237>.
- Noah, T. L., Henderson, F. W., Wortman, I. A., Devlin, R. B., Handy, J., Koren, H. S., et al. (1995). Nasal cytokine production in viral acute upper respiratory infection of childhood. *Journal of Infectious Diseases*, 171(3), 584–592. <https://doi.org/10.1093/infdis/171.3.584>.
- O'Neill, L. A. J., & Bowie, A. G. (2007). The family of five: TIR-domain-containing adaptors in Toll-like receptor signaling. *Nature Reviews Immunology*, 7(5), 353–364. <https://doi.org/10.1038/nri2079>.
- Palmenberg, A. C., Spiro, D., Kuzmickas, R., Wang, S., Djikeng, A., Rathe, J. A., et al. (2009). Sequencing and analyses of all known human rhinovirus genomes reveal structure and evolution. *Science*, 324(5923), 55–59. <https://doi.org/10.1126/science.1165557>.
- Peden, D. B., & Bush, R. K. (2015). Advances in environmental and occupational disorders in 2014. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 136(4), 866–871. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2015.08.008>.
- Pochon, C., & Voigt, S. (2019). Respiratory virus infections in hematopoietic cell transplant recipients. *Frontiers in Microbiology*, 9, 3294. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03294>.
- Price, R. H. M., Graham, C., & Ramalingam, S. (2019). Association between viral seasonality and meteorological factors. *Scientific Reports*, 9(1), 929. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37481-y>.
- Pyle, C. J., Uwadiae, F. I., Swieboda, D. P., & Harker, J. A. (2017). Early IL-6 signalling promotes IL-27 dependent maturation of regulatory T cells in the lungs and resolution of viral immunopathology. *PLoS Pathogens*, 13(9), e1006640. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006640>.
- Reis, J., & Shaman, J. (2018). Simulation of four respiratory viruses and inference of epidemiological parameters. *Infectious Disease Modelling*, 3, 23–34. <https://doi.org/10.1016/j.idm.2018.03.006>.
- Roelen, C. A. M., Koopmans, P. C., Notenbomer, A., & Groothoff, J. W. (2011). Job satisfaction and short sickness absence due to the common cold. *Work (Reading, Mass)*, 39(3), 305–313. <https://doi.org/10.3233/wor-2011-1178>.
- Romero, O. C., Straub, A. P., Kohn, T., & Nguyen, T. H. (2011). Role of temperature and suwannee river natural organic matter on inactivation kinetics of rotavirus and bacteriophage MS2 by solar irradiation. *Environmental Science and Technology*, 45(24), 10385–10393. <https://doi.org/10.1021/es202067f>.
- Russell, C. D., Griffiths, S. J., & Haas, J. (2014). Interferon lambda genetic polymorphisms and viral infection: the tip of the iceberg? *DNA and Cell Biology*, 33(2), 60–63. <https://doi.org/10.1089/dna.2013.2261>.
- Sandhya, P., Danda, S., Danda, D., Lonarkar, S., Luke, S. S., Sinha, S., et al. (2013). Tumour necrosis factor (TNF)- $\alpha$ -308 gene polymorphism in Indian patients with Takayasu's arteritis—a pilot study. *The Indian journal of Medical Research*, 137(4), 749–752.
- Shah, J. A., Vary, J. C., Chau, T. T. H., Bang, N. D., Yen, N. T. B., Farrar, J. J., et al. (2012). Human TOLLIP regulates TLR2 and TLR4 signaling and its polymorphisms are associated with susceptibility to tuberculosis. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 189(4), 1737–1746. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1103541>.
- Shi, T., Arnott, A., Semogas, I., Falsey, A. R., Openshaw, P., Wedzicha, J. A., et al. (2019). The etiological role of common respiratory viruses in acute respiratory infections in older adults: a systematic review and meta-analysis. *The Journal of Infectious Diseases*. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy662>.
- Spannhake, E. W., Reddy, S. P. M., Jacoby, D. B., Yu, X.-Y., Saatian, B., & Tian, J. (2002). Synergism between rhinovirus infection and oxidant pollutant exposure enhances airway epithelial cell cytokine production. *Environmental Health Perspectives*, 110(7), 665–670. <https://doi.org/10.1289/ehp.02110665>.
- Tanaka, T., Narazaki, M., & Kishimoto, T. (2014). IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(10), 1–16. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016295>.
- To, K. K. W., Yip, C. C. Y., & Yuen, K.-Y. (2017). Rhinovirus—from bench to bedside. *Journal of the Formosan Medical Association*, 116(7), 496–504. <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2017.04.009>.
- Triantafilou, K., Vakakis, E., Richer, E. A. J., Evans, G. L., Villiers, J. P., & Triantafilou, M. (2011). Human rhinovirus recognition in non-immune cells is mediated by toll-like receptors and MDA-5, which trigger a synergetic pro-inflammatory immune response. *Virulence*, 2(1), 22–29. <https://doi.org/10.4161/viru.2.1.13807>.
- Wen, H., Yuan, L., Wei, C., Zhao, Y., Qian, Y., Ma, P., et al. (2016). Effects of combined exposure to formaldehyde and benzene on immune cells in the blood and spleen in Balb/c mice. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 45, 265–273. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.05.007>.
- Wildenbeest, J. G., van der Schee, M. P., Hashimoto, S., Benschop, K. S. M., Minnaar, R. P., Sprikkelman, A. B., et al. (2016). Prevalence of rhinoviruses in young children of an unselected birth cohort from the Netherlands. *Clinical Microbiology & Infection*, 22(8), 736.e9–736.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.05.022>.
- Wine, T. M., & Alper, C. M. (2012). Cytokine responses in the common cold and otitis media. *Current Allergy and Asthma Reports*, 12(6), 574–581. <https://doi.org/10.1007/s11882-012-0306-z>.
- Yang, W., & Marr, L. C. (2011). Dynamics of airborne influenza A viruses indoors and dependence on humidity. *PLoS ONE*, 6(6), e21481. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021481>.
- Zhang, G., & Ghosh, S. (2002). Negative regulation of toll-like receptor-mediated signaling by Tollip. *Journal of Biological Chemistry*, 277(9), 7059–7065. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109537200>.
- Zhang, L., McHale, C. M., Rothman, N., Li, G., Ji, Z., Vermeulen, R., et al. (2010). Systems biology of human benzene exposure. *Chemico-Biological Interactions*, 184(1–2), 86–93. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2009.12.011>.

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

**Anexo 7- Parecer da Comissão de Ética**



Universidade Fernando Pessoa  
www.ufp.pt

Exmo. Senhor  
Prof. Doutor Luis Martins  
Director da FCS

Porto, 06 de Março de 2017

Exmo. Senhor Prof. Doutor,

A Comissão de Ética, depois de apreciado o projeto de investigação dos Professores José Manuel Cabeda, Maria Gil Ribeiro, Conceição Manso, Esmeralda Barreira e Nelson Barros, intitulado "Rhinair: Epidemiologia e estudo de fatores de risco da infeção viral respiratória associada ao rinovirus", considera nada haver a opor ao mesmo, desde que os autores esclareçam quem irá financiar os gastos com o mesmo.

Com os melhores cumprimentos.

A Presidente da  
Comissão de Ética da UFP

  
Teresa Martinho Toldy

  
10. 3 2017

**Anexo 8-** Declaração de consentimento informado

**DECLARAÇÃO DE CONSENTIMENTO INFORMADO**

**Para participação voluntária no projeto “RhinAir: Epidemiologia e estudo de fatores de risco da infecção viral respiratória associada ao Rinovírus”**

O Projeto acima designado, visa estudar mensalmente e pontualmente amostras nasais (colhida com uma cotonete introduzida no nariz). Nestas amostras nasais será pesquisada a presença de vírus causadores de infecções respiratórias ligeiras (constipações). Durante o estudo serão também recolhidos dados relevantes da poluição do ar a partir da rede nacional da qualidade do ar. Para tal será solicitado aos voluntários informação sobre os locais de residência. Cada voluntário doará ainda uma amostra de sangue no início e outra no fim do estudo, para estudo de variações genéticas.

**Eu, abaixo-assinado, (nome completo do participante no estudo)**

\_\_\_\_\_, compreendi a explicação que me foi fornecida acerca da participação na investigação que se tenciona realizar, bem como do estudo em que serei incluído. Foi-me dada oportunidade de fazer as perguntas que julguei necessárias, e de todas obtive resposta satisfatória.

Tomei conhecimento de que a informação ou explicação que me foi prestada versou os objetivos e os métodos. Além disso, foi-me afirmado que tenho o direito de recusar a todo o tempo a minha participação no estudo, sem que isso possa ter como efeito qualquer prejuízo pessoal. Entendo também, e aceito, que os responsáveis pelo projeto poderão em qualquer momento desistir da minha participação no projeto, por razões de ordem científica, logística, financeira ou outra, sem que tal constitua razão para me sentir lesado.

Foi-me ainda assegurado que os registos em suporte papel e/ou digital (sonoro e de imagem) serão confidenciais e utilizados única e exclusivamente para o estudo em causa, sendo guardados em local seguro durante a pesquisa e destruídos após a sua conclusão.

Por isso, consinto em participar no estudo em causa.

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/2017

**Assinatura do participante no projecto:** \_\_\_\_\_

**O Investigador responsável:**

**Nome:** José Manuel Baptista Cabeda

**Assinatura:** \_\_\_\_\_

Anexo 9- Questionário de Recenseamento



## Questionário/Inquérito Recenseamento de Voluntários

O presente questionário destina-se à inscrição de voluntários no âmbito do Projeto de Investigação "RhinAir: Epidemiologia e estudo de fatores de risco da infeção viral respiratória associada ao Rinovirus". Desde já agradecemos o tempo que dedicou a este estudo.

### Dados de Identificação Anónima:

1. Código do Voluntário \_\_\_\_\_ Código da Amostra: \_\_\_\_\_
2. Data da colheita: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Hora da colheita: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_
3. Telemóvel para contacto: \_\_\_\_\_

### Caracterização Geral:

4. Ano de Nascimento: \_\_\_\_\_
5. Profissão: \_\_\_\_\_
6. Sexo: Masculino  Feminino....
7. Tem antecedentes não Portugueses? Sim....  Não....   
Se sim de que nacionalidade? \_\_\_\_\_
7. Tem manifestações de alergia/hipersensibilidade:  
Asma brônquica Sim.....  Não ....   
Alergia medicamentosa Sim.....  Não ....   
Alergia de contacto/pele Sim.....  Não ....   
Alergia Alimentar Sim.....  Não ....   
Alergia picada insetos Sim.....  Não ....   
Outra  Qual? \_\_\_\_\_
8. É fumador?: Sim ...  Não ....   
Se sim, quantos cigarros fuma habitualmente por dia? \_\_\_\_\_
9. Se é portador de doenças crónicas indique-as: \_\_\_\_\_
10. Se Toma regularmente bebidas alcoólicas, chá ou suplementos alimentares indique quais e que quantidades: \_\_\_\_\_
11. Se Pratica habitualmente exercício físico indique qual e com que frequência: \_\_\_\_\_
12. Identifique no Computador os locais onde viveu nos últimos 10 anos, indicando quantos anos ali residiu e qual a percentagem diária aproximada de tempo que passava em cada local:

GPS: \_\_\_\_\_ Tempo Total (anos): \_\_\_\_\_ % tempo diário: \_\_\_\_\_

GPS: \_\_\_\_\_ Tempo Total (anos): \_\_\_\_\_ % tempo diário: \_\_\_\_\_

GPS: \_\_\_\_\_ Tempo Total (anos): \_\_\_\_\_ % tempo diário: \_\_\_\_\_

GPS: \_\_\_\_\_ Tempo Total (anos): \_\_\_\_\_ % tempo diário: \_\_\_\_\_

GPS: \_\_\_\_\_ Tempo Total (anos): \_\_\_\_\_ % tempo diário: \_\_\_\_\_

**Anexo 10- Questionário mensal**



## Questionário/Inquérito

O presente questionário destina-se a recolha dos dados sintomatológicos no âmbito do Projeto de Investigação "RhinAir: Epidemiologia e estudo de fatores de risco da infeção viral respiratória associada ao Rinovirus".  
Antecipadamente agradecemos o tempo que dedicou a este estudo.

### Identificação da Amostra:

4. Código do Voluntário \_\_\_\_\_ Código da Amostra: \_\_\_\_\_  
5. Data da colheita: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_ Hora da colheita: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

### Sintomas nos últimos 30 dias:

7. Durante os últimos 30 dias alguma vez teve:

- |                              |                              |                              |
|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| Espirros em série/frequentes | Sim <input type="checkbox"/> | Não <input type="checkbox"/> |
| Nariz a pingar               | Sim <input type="checkbox"/> | Não <input type="checkbox"/> |
| Nariz entupido               | Sim <input type="checkbox"/> | Não <input type="checkbox"/> |
| Dores de cabeça              | Sim <input type="checkbox"/> | Não <input type="checkbox"/> |
| Lacrimação e prurido         | Sim <input type="checkbox"/> | Não <input type="checkbox"/> |
| Perda do olfacto e sabor     | Sim <input type="checkbox"/> | Não <input type="checkbox"/> |
| Comichão intensa no nariz    | Sim <input type="checkbox"/> | Não <input type="checkbox"/> |

8. Durante os últimos 30 dias, os problemas de nariz foram acompanhados de estados lacrimais ou de "comichão" nos olhos?      Sim       Não

19. Durante os últimos 30 dias que fatores pensa que lhe provocaram os problemas nasais?

- |                                 |                          |
|---------------------------------|--------------------------|
| Pó da casa                      | <input type="checkbox"/> |
| Pólen de árvores e/ou plantas   | <input type="checkbox"/> |
| Animais Domésticos              | <input type="checkbox"/> |
| Produtos Irritativos (Químicos) | <input type="checkbox"/> |
| Constipação                     | <input type="checkbox"/> |
| Fatores não identificados       | <input type="checkbox"/> |