

---

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PEDIATRIA  
E SAÚDE DA CRIANÇA

**Efeito de lactoferrina bovina na replicação viral e doença  
clínica em modelo murino de vírus sincicial respiratório**

**Lucien Peroni Gualdi**

PORTO ALEGRE  
2013

---

---

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PEDIATRIA E SAÚDE DA CRIANÇA

**Efeito de lactoferrina bovina na replicação viral e  
doença clínica em modelo murino de vírus sincicial  
respiratório**

Lucien Peroni Gualdi

Orientador: Prof. Dr. Paulo Márcio Condessa Pitrez

Co-orientadora: Dra. M. Asunción Mejias

Tese de Doutorado apresentada à  
Faculdade de Medicina da PUCRS  
para obtenção do título de Doutor em  
Medicina Pediatria e Saúde da  
Criança.

Porto Alegre  
2013

---

---

**DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)**

G911e Gualdi, Lucien Peroni

**Efeito de lactoferrina bovina na replicação viral e doença clínica em modelo murino de vírus sincicial respiratório / Lucien Peroni Gualdi. – Porto Alegre, 2013.**

**82f.: il. tab.**

Tese (Doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Pediatria e Saúde da Criança.

Orientadora: Prof. Dr. Paulo Márcio Condessa Pitrez

Co-orientadora: Dra. Maria Asunción Mejias

1. Bronquiolite Viral/ terapia. 2. Vírus Sinciciais Respiratórios. 3. Lactoferrina/ administração & dosagem. 4. Criança. 5. Modelos Animais. I. Pitrez, Paulo Márcio Condessa. II. Mejias, Maria Asunción. III. Título.

**CDD 618.9223**

**Bibliotecária Responsável:  
Elisete Sales de Souza - CRB 10/1441**

---

---

DOUTORANDA: Lucien Peroni Gualdi

ENDEREÇO: Instituto de Pesquisas Biomédicas. Avenida Ipiranga, 6690, 2º andar  
CEP 90.610-000 – Porto Alegre – RS

EMAIL: [luqualdi@hotmail.com](mailto:luqualdi@hotmail.com)

TELEFONE: (54) 8129-1503

ORGÃO FINANCIADOR: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

CONFLITO DE INTERESSE: NENHUM

---

---

---

*“There is only one thing even more vital to science than intelligent methods; and that is, the sincere desire to find out the truth, whatever it may be.”*

**Charles Sanders Pierce**

---

---

---

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Professor **Paulo Márcio Condessa Pitrez**, por seu entusiasmo, paciência, dedicação e confiança em meu trabalho.

Ao Professor **Renato Tetelbom Stein** por ter acreditado e confiado em meu trabalho.

A secretaria da Pós-Graduação em Pediatria e Saúde da Criança, **Carla Rothmann**, pela incansável dedicação ao curso e seus alunos.

A minha co-orientadora Dra. **Asunción Mejias** e ao Dr. **Octavio Ramilo**, por me proporcionar uma experiência única em um dos melhores Institutos de Pesquisa dos EUA.

A todos os colegas do Instituto de Pesquisas Biomédicas da **PUCRS** e do **Center for Vaccines and Immunity at the Research Institute at Nationwide Children's Hospital – The Ohio State University** pela colaboração e amizade.

A **Mead Johnson Nutrition**, em especial a **Anja Wittke**, pelo suporte financeiro e expertise no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (**CNPq**) pelo suporte nesses anos de doutorado.

A todos os **amigos** que direta ou indiretamente fizeram parte desta longa jornada.

E por fim, a minha **família** que sempre me apoiou. Meus pais, que muitas vezes deixaram os próprios sonhos para trás para que realizássemos os nossos.

---

---

## RESUMO

**Introdução:** Lactoferrina (LF) é uma glicoproteína presente no leite humano que possui efeitos antimicrobianos bem estabelecidos. Estudos *in vitro*, demonstram que a LF é capaz de desestabilizar o crescimento do vírus sincicial respiratório (VSR). Neste estudo procuramos avaliar o efeito da LF bovina (bLF) na replicação do VSR, além de avaliar diferentes aspectos da doença causada por VSR *in vivo* em um modelo murino.

**Métodos:** camundongos BALB/c foram inoculados com  $10^7$  UFP de VSR A2 ou EMEM 10%. bLF ou placebo foram administrados uma ou duas vezes ao dia por gavagem ou injeção intraperitoneal (IP) em doses entre 2 e 10 mg/animal/dia, dois dias antes a 4 dias após a inoculação com VSR. Amostras de lavado broncoalveolar, pulmões e sangue foram coletadas no dia 5 após a inoculação com o objetivo de avaliar a carga viral, inflamação pulmonar e concentração de citocinas. Peso, obstrução de via aérea e gravidade da doença foram avaliados diariamente em todos os grupos do estudo.

**Resultados:** No dia 5 após a inoculação do vírus, a carga viral, inflamação pulmonar e concentração de citocinas relacionadas a imunidade inata, respostas Th1, Th2 e Th17 no soro não demonstraram diferença, quando comparamos os animais infectados com RSV tratados com bLF e os animais infectados com RSV tratados com placebo, independente da dose ou via de administração ( $p>0.05$ ). Além disso, a perda de peso, obstrução de via aérea e gravidade da doença foi similar entre os grupos tratados com bLF nos dias 1 a 5 após a inoculação do vírus. Estes valores são comparáveis com os valores obtidos no grupo placebo, porém significativamente aumentados quando comparados aos animais não-infectados.

**Conclusão:** a administração de bLF por via oral ou injeção IP, em diferentes doses, não demonstrou atividade antiviral ou efeitos significativos na severidade da doença em um modelo murino de VSR. Se essas observações podem ser extrapoladas para crianças em risco de desenvolver infecções por VSR, essas questões necessitam ser melhor exploradas.

**Palavras-chave:** VSR, lactoferrina bovina, gravidade.

---

---

## ABSTRACT

**Background:** Lactoferrin (LF) is a glycoprotein present in human milk with known antimicrobial effects. *In vitro*, LF has shown to impair the growth of respiratory syncytial virus (RSV). We sought to assess the effect of bovine (b)LF in RSV replication and different aspects of RSV disease in an *in vivo* murine model.

**Methods:** BALB/C mice were inoculated with  $10^7$  PFU RSV A2 or 10% EMEM. bLF or placebo (DPBS) were administered once or twice daily by oral gavage or intraperitoneal (IP) injection at doses ranging from 2 to 10mg/animal/day, from 48h before until day 4 post-RSV inoculation. Bronchoalveolar lavage, whole lung specimens and serum samples were harvested on day 5 post inoculation to assess RSV loads, lung inflammation and cytokine concentrations. Weight loss, airway obstruction and disease severity were assessed daily in all groups.

**Results:** On day 5 post-inoculation RSV loads, lung inflammation and serum innate, Th1, Th2 and Th17 cytokine concentrations showed no differences between RSV infected mice treated with bLF and RSV untreated mice independent of bLF dosing and administration route ( $p>0.05$ ). In addition, all bLF groups showed similar weight loss, degree of airway obstruction, and disease severity scores on days 1 to 5 post-inoculation which was comparable to infected untreated mice ( $p>0.05$ ), but higher than uninfected controls.

**Conclusions:** Administration of oral or IP bLF at different doses did not demonstrate antiviral activity or significant effects on disease severity in the RSV mouse model. Whether these observations could be extrapolated to infants at risk of RSV infection needs to be further explored.

**Key-words:** RSV, bovine lactoferrin, disease severity.

---



---

---

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1 – bLF AND RSV INOCULATION PROTOCOL.....</b>	<b>65</b>
<b>FIGURA 2 – COMPARATIVE EFFECTS OF bLF ON BAL RSV LOADS.....</b>	<b>66</b>
<b>FIGURA 3 – COMPARISON OF DISEASE SEVERITY USING A CDSS IN RSV- INFECTED MICE TREATED WITH bLF AT DIFFERENT DOSES AND RSV- INFECTED UNTREATED MICE.....</b>	<b>67</b>
<b>FIGURA 4 – SERUM CYTOKINES CONCENTRATIONS ON DAY 5 POST RSV INFECTION.....</b>	<b>68</b>
<b>FIGURA 5 – SERUM IFN-<math>\gamma</math>:IL-4 RATIO.....</b>	<b>70</b>
<b>FIGURA 6 – EFFECT OF bLF TREATMENT ON LUNG INFLAMMATION.....</b>	<b>71</b>
<b>FIGURA 7 – COMPARISON OF HISTOPATHOLOGIC DAMAGE IN RSV- INFECTED MICE TREATED WITH bLF AT DIFFERENT DOSES AND RSV- INFECTED UNTREATED MICE.....</b>	<b>72</b>
<b>FIGURA 8 – EFFECT OF bLF ON AIRWAY OBSTRUCTION.....</b>	<b>73</b>

---

---

---

---

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1 – bLF DOSING ACCORDING TO STUDY GROUPS.....</b>	<b>74</b>
<b>TABELA 2 – CLINICAL DISEASE SEVERITY SCORE.....</b>	<b>75</b>
<b>TABELA 3 – COMPARATIVE WEIGHT LOSS OF RSV-INFECTED bLF TREATED MICE, RSV-INFECTED UNTREATED MICE AND UNINFECTED CONTROLS DURING ACUTE RSV INFECTION.....</b>	<b>76</b>

---

---

---

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>AO</b>	Airway obstruction
<b>APC</b>	Célula apresentadora de antígeno
<b>BAL</b>	Bronchoalveolar lavage
<b>BVA</b>	Bronquiolite viral aguda
<b>CCL</b>	Quimiocina de motivo C-C ligante
<b>CD</b>	Célula dendrítica
<b>CDSS</b>	Clinical disease severity score
<b>CX3CR1</b>	Receptor de quimiocina 1 CX3C
<b>CXC</b>	Quimiocina de motivo C-X-C
<b>DPBS</b>	Dulbecco's Phosphate Buffered saline
<b>EMEM</b>	Eagle's minimal essential medium
<b>FGF</b>	Fibroblast growth factor
<b>FI</b>	Formalin inactivated
<b>FoxP3</b>	Forkhead box P3
<b>GAG</b>	Glicoaminoglicano
<b>GM-GSF</b>	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
<b>HPS</b>	Histopathologic score
<b>HSP-72</b>	Proteína de choque térmico-72
<b>ICAM-1</b>	Molécula de adesão intracelular-1
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IFN</b>	Interferon
<b>IFNAR</b>	Receptor de interferon $\alpha/\beta$
<b>IP</b>	Intraperitoneal
<b>IP-10</b>	Interferon gamma-induced protein 10

---

---

<b>LBA</b>	Lavado broncoalveolar
<b>LF</b>	Lactoferrina
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo
<b>MCP-1</b>	Monocyte chemotactic protein-1
<b>MIG</b>	Monokine induced interferon gamma
<b>MIP-1</b>	Macrophage inflammatory protein-1
<b>NF-<math>\kappa</math><math>\beta</math></b>	Fator nuclear $\kappa$
<b>NK</b>	Célula " <i>natural killer</i> "
<b>Penh</b>	Enhanced pause
<b>PFU</b>	Plaques forming per unit
<b>PMN</b>	Polimorphonuclear
<b>RANTES</b>	Regulated and normal T cell expressed and secreted
<b>RIG-1</b>	Receptor tipo gene induzível de ácido retinóico
<b>RSV</b>	Respiratory syncytial virus
<b>RT PCR</b>	PCR em tempo real
<b>Th</b>	Linfócito T helper
<b>TLR</b>	Receptor semelhante ao Toll
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral- $\alpha$
<b>Treg</b>	Linfócito T regulador
<b>VEGF</b>	Vascular endothelial growth factor
<b>VSR</b>	Vírus sincicial respiratório

---

---

---

## SUMÁRIO

### CAPÍTULO I

1. APRESENTAÇÃO.....	14
1.1 INTRODUÇÃO.....	16
1.2 JUSTIFICATIVA.....	19
1.3 OBJETIVOS.....	22
1.4 REFERÊNCIAS.....	23

### CAPÍTULO II

2. ARTIGO DE REVISÃO.....	27
---------------------------	----

### CAPÍTULO III

3. ARTIGO ORIGINAL.....	51
-------------------------	----

### ÍTULO IV

4. CONCLUSÕES.....	81
--------------------	----

---

---

---

# CAPÍTULO I

---

---

## 1 APRESENTAÇÃO

Para a apresentação dessa tese, avalei o efeito antiviral de uma glicoproteína chamada lactoferrina em um modelo murino de vírus sincicial respiratório (VSR). Sua capacidade de diminuir os títulos virais bem como prevenir os sinais clínicos e a desregulação do sistema imune causados pela doença neste modelo também foram avaliados.

No ano de 2008 dei início ao meu mestrado no grupo de Pneumologia Pediátrica da PUCRS, quando dois anos após estava defendendo meu título e iniciando o processo para obtenção do título de doutorado. Desde meu início no grupo, trabalhei com doença pulmonar alérgica em modelo murino. Foram diversos projetos testando as mais diversas substâncias com o objetivo de prevenir o desenvolvimento de asma.

Para o doutorado inicialmente eu trabalharia, junto com os demais colegas, no projeto intitulado “Efeito protetor de helmintos no desenvolvimento de asma alérgica: estudo mecanístico e translacional da resposta imune em um modelo murino.” Durante o ano de 2010, trabalhamos na elaboração e aprovação deste projeto e iniciamos os primeiros experimentos.

Em abril de 2011, fui convidada a trabalhar com o grupo de Doenças Infecciosas no Centro de Imunologia e Vacinas do *Nationwide Children’s Hospital* da *Ohio State University* em Ohio, Estados Unidos. Sob a supervisão dos doutores Asunción Mejias e Octavio Ramilo, iniciei uma nova etapa do meu doutorado. O foco em estudo do grupo era bronquiolite e VSR, campo não muito explorado por mim até minha chegada em Ohio. Inicialmente desenvolvi o projeto intitulado “*Antiviral activity*”

---

---

*and effects on disease severity of bovine lactoferrin towards respiratory syncytial virus (RSV) infections*”, sobre o qual irei apresentar minha tese. Este projeto foi contemplado com uma apresentação em forma de pôster na “Infectious Disease (ID) Week 2012” em San Diego, CA.

Durante meu período em Columbus, também trabalhei com a análise de amostras humanas no campo da expressão gênica, utilizando técnicas de microarranjo na busca por um melhor entendimento dos mecanismos imunes envolvidos no desenvolvimento de sibilância e asma após bronquiolite por VSR. Este trabalho foi contemplado com uma apresentação oral no congresso da “Pediatric Academic Society (PAS)/Society for Pediatric Research (SPR) 2012” em Boston, MA.

A tese então é composta por esta breve apresentação, seguida de uma introdução (justificativa e objetivos), desenvolvimento (apresentação do artigo de revisão e artigo original) e conclusões. Para o artigo da revisão, estabeleci meu foco na resposta imune gerada pela infecção por VSR, e como esta resposta pode ser útil no desenvolvimento de novos alvos terapêuticos ou vacinas contra o vírus. O artigo original apresentado nesta tese será submetido para publicação no *Antiviral Research Journal*. Esta revista possui fator de impacto de 4,3. O artigo está em fase final de avaliação na *Mead Johnson Nutrition*, empresa financiadora do projeto.

---



## 1.1 INTRODUÇÃO

O vírus sincicial respiratório (VSR) é um pneumovírus de cadeia simples que foi primeiramente descrito em 1956 como um agente da coriza em chimpanzés (1). Em 1957, o vírus foi associado à bronquiolite em crianças (2). Os subtipos A e B são as formas mais comuns de VSR. Estes subtipos co-circulam e a predominância de um sobre o outro varia de ano para ano e de acordo com a localização demográfica (3). O VSR é um vírus associado ao inverno em climas temperados e aos períodos de chuva, quando a temperatura diminui, em regiões mais quentes.

A bronquiolite causada por VSR é a causa mais comum de infecções agudas de trato respiratório inferior e a causa mais comum de hospitalização de lactentes e crianças no mundo (4-6). Calcula-se que a maioria das crianças estarão infectadas por VSR aos 2 anos de idade e as reinfecções são comuns (7). A maioria das crianças infectadas por VSR tem entre 6 semanas e 6 meses de vida com o pico ocorrendo entre 2 e 3 meses de idade.

Fatores de risco como prematuridade, doença pulmonar crônica e doença cardíaca crônica têm sido associados à forma mais grave da doença em pacientes com bronquiolite por VSR (8-10). Em um estudo realizado por Garcia et al. no qual foram revisados prontuários médicos de 4.800 crianças hospitalizadas com bronquiolite, os autores encontraram que trissomia do 21, baixo peso no momento da admissão, doenças neuromusculares e infecção por VSR, por si só, são preditores para bronquiolite grave (11).

Além das manifestações agudas causadas pela doença, diversos estudos prospectivos tem associado bronquiolite por VSR no início da vida, ao

---

---

desenvolvimento de sibilo e asma em uma fase mais tardia da vida (12-14). Entre as crianças hospitalizadas com bronquiolite por VSR, estudos indicam que aproximadamente 30% delas irão desenvolver sibilo persistente até 13 anos de idade após a bronquiolite por VSR, e isto pode se estender até o início da vida adulta. O “*Tucson’s Children’s Respiratory Study*” mostrou que doenças do trato respiratório inferior causadas por VSR antes dos 3 anos de idade estão associadas a um aumento significativo do risco de sibilância durante os 10 primeiros anos de vida (15). Em outro estudo prospectivo no qual as crianças foram acompanhadas até os 18 anos de idade, os autores encontraram que história de hospitalização por bronquiolite por VSR foi o único fator de risco significativo identificado aos 18 anos para asma e sibilância persistente (13).

Apesar da alta prevalência e das complicações em longo prazo causadas pela bronquiolite por VSR, a busca por uma vacina capaz de prevenir o desenvolvimento da doença tem falhado ao longo dos anos. Logo após a descoberta do vírus, uma série de estudos foi iniciada para avaliar uma vacina onde o vírus foi inativado por formalina formulada com alum (FI-RSV). Os autores encontraram que 80% das crianças imunizadas com a vacina FI-RSV requereram hospitalização no inverno seguinte e duas crianças foram a óbito (16). Desde então, a única estratégia profilática contra bronquiolite por VSR é feita através do uso de um anticorpo monoclonal chamado palivizumabe. Este anticorpo deve ser administrado mensalmente durante os meses do inverno e sua eficácia só é observada antes do estabelecimento da doença. Nos Estados Unidos, apenas crianças que fazem parte de grupos de risco (prematturos e cardiopatas) recebem este tratamento.

---

---

Diversos grupos de pesquisa têm trabalhado na busca de novas substâncias capazes de prevenir o desenvolvimento da doença a um custo mais baixo. Neste estudo, testei o efeito antiviral da lactoferrina em um modelo murino de VSR.

A lactoferrina (LF) é uma glicoproteína da família das transferrinas. Esta proteína está presente em diferentes fluídos como saliva, lágrimas, secreção nasal e leite, além de células polimorfonucleares. O leite materno é a principal fonte de lactoferrina, sendo excretada numa concentração de 7g/L no colostro (17-19). LF é uma proteína multifuncional envolvida na regulação da absorção de ferro no intestino delgado e promoção do crescimento celular intestinal, na atividade antimicrobiana no trato gastrointestinal, bexiga e mucosa oral, além de desempenhar um papel na resposta imune da mucosa (19-22). A LF é produzida por diversos mamíferos e no leite humano ela é a segunda proteína mais abundante o que ocorre também no leite bovino. A LF bovina é composta por 689 aminoácidos enquanto a humana é composta por 691 aminoácidos. Uma outra diferença está na forma já que a LF humana é essencialmente apolactoferrina enquanto a LF bovina é parcialmente saturada com ferro (15-20%). Embora existam diferenças na estrutura e propriedades bioquímicas estudos *in vitro* e em modelo animal têm demonstrado que estas são comparáveis (23).

Diversos estudos têm demonstrado que a LF possui propriedades anti-inflamatórias, antibacterianas e antivirais contra uma grande variedade de vírus como hepatite, citomegalovírus, poliovírus e VSR, prevenindo a entrada do vírus na célula ou coibindo a replicação viral (24-30). Contudo, a maioria destes estudos foi realizada *in vitro*.

---

---

## 1.2 JUSTIFICATIVA

Com base nos dados apresentados na Introdução, a busca por uma nova substância capaz de prevenir o desenvolvimento de bronquiolite por VSR é de grande importância. Como já mencionado, esta é a principal causa de hospitalização de lactentes e crianças no mundo. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, o VSR atinge 34 milhões de crianças menores que cinco anos anualmente. O elevado número de crianças infectadas com o vírus leva a admissão hospitalar de 3,4 milhões, o que gera gastos exorbitantes para os sistemas de saúde (31). Além das complicações agudas causadas pelo vírus, diversos estudos têm demonstrado uma associação positiva entre bronquiolite por VSR e o desenvolvimento de sibilância e asma em uma fase mais tardia da vida, que continua resultando em mais morbidade e gastos (12, 15).

Como já mencionado, existe apenas uma terapia (palivizumabe) capaz de prevenir o desenvolvimento da doença. Estratégias profiláticas nos Estados Unidos preveem que apenas crianças que apresentem algum fator de risco sejam tratadas com este anticorpo monoclonal. A restrição do tratamento a estes grupos pode ser justificada pelo alto custo do anticorpo, porém estudos recentes têm demonstrado que a grande maioria das crianças hospitalizadas com bronquiolite por VSR eram previamente saudáveis (11).

O desenvolvimento de uma nova substância capaz de prevenir o desenvolvimento da doença com custos mais baixos é o alvo de diversos grupos de pesquisa ao redor do mundo. Neste estudo da minha tese, testamos o efeito da lactoferrina no desenvolvimento de VSR em um modelo murino.

---

---

Os efeitos protetores do aleitamento materno contra diversas patologias já estão bem estabelecidos e cada vez mais estudos têm demonstrado que lactentes alimentados por leite materno mostram menor número de infecções por rotavírus e VSR, quando comparados a lactentes alimentados com fórmulas (32). Como já mencionado, LF é uma glicoproteína presente no leite materno. Estudos têm demonstrado que esta proteína possui propriedades anti-inflamatórias, antibacterianas e antivirais contra diversos vírus, como o VSR (24, 25). Além desses efeitos, estudos especulam que a LF é capaz de corrigir o desequilíbrio imune causado por diversas patologias através da diminuição da expressão de citocinas pro-inflamatórias e aumento da expressão de citocinas anti-inflamatórias (33-35).

Apesar de alguns estudos terem demonstrado o efeito antiviral da LF contra VSR, este é o primeiro estudo no qual estes efeitos foram testados em um modelo *in vivo*. O primeiro estudo avaliando os efeitos da LF contra o VSR foi realizado em 1997 em um modelo *in vitro* de células Hep-2. Neste estudo, os autores encontraram que a LF bovina é igualmente efetiva quando comparada a LF humana na inibição do VSR. Um segundo estudo utilizando o mesmo modelo *in vitro*, no qual o vírus foi pré-incubado com LF por uma hora antes da inoculação das células, mostrou que a pré-incubação do vírus com LF diminuiu a titulação viral nos grupos tratados, além de diminuir a concentração de interleucina (IL)-8 nos mesmos grupos (29, 30).

Em nosso estudo, escolhemos testar os efeitos da LF, primeiro por ela ser uma substância natural presente no leite materno e que poderia ser incorporada a uma fórmula infantil e, segundo, porque diversos estudos têm demonstrado que a LF possui propriedades antivirais inclusive contra VSR, porém este efeito antiviral jamais foi testado em um modelo *in vivo*.

---

Modelos murinos oferecem inúmeras vantagens, quando comparados a outros modelos experimentais. Dentre as vantagens, podemos citar o porte pequeno do animal, os custos mais baixos e a ampla variedade de reagentes oferecidos para este modelo. Além destes fatores, o modelo de infecção respiratória de trato inferior por VSR já está bem estabelecido e nos permite medir a replicação viral, a gravidade da doença, além de caracterizar a resposta imune durante as fases aguda e crônica da doença. O grupo de pesquisa liderado pelos doutores Asunción Mejias e Octavio Ramilo tem ampla experiência na utilização deste modelo, tendo publicado diversos estudos na área nos últimos anos.

---

### **1.3 OBJETIVOS**

#### **GERAL**

- Avaliar o efeito antiviral de lactoferrina bovina em um modelo murino de VSR através da titulação viral por cultura e PCR em tempo real.

#### **ESPECÍFICOS**

- Mensurar a concentração sistêmica de citocinas pró e anti-inflamatórias num modelo murino de VSR após o tratamento com lactoferrina bovina.
  - Avaliar o efeito de lactoferrina bovina na inflamação pulmonar causada pelo VSR em camundongos através de um escore histopatológico.
  - Avaliar o efeito de lactoferrina bovina na obstrução de vias aéreas utilizando um pletismógrafo não-invasivo em um modelo murino.
  - Avaliar o efeito de lactoferrina bovina na doença clínica causada por VSR em camundongos utilizando um escore de gravidade da doença.
-

---

## 1.4 REFERÊNCIAS

1. Blount RE, Jr., Morris JA, Savage RE. Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1956 Jul;92(3):544-9.
  2. Chanock R, Finberg L. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). II. Epidemiologic aspects of infection in infants and young children. *Am J Hyg*. 1957 Nov;66(3):291-300.
  3. Hendry RM, Talis AL, Godfrey E, Anderson LJ, Fernie BF, McIntosh K. Concurrent circulation of antigenically distinct strains of respiratory syncytial virus during community outbreaks. *J Infect Dis*. 1986 Feb;153(2):291-7.
  4. Shay DK, Holman RC, Newman RD, Liu LL, Stout JW, Anderson LJ. Bronchiolitis-associated hospitalizations among US children, 1980-1996. *JAMA*. 1999 Oct 20;282(15):1440-6.
  5. Hall CB. Respiratory syncytial virus and parainfluenza virus. *N Engl J Med*. 2001 Jun 21;344(25):1917-28.
  6. Paramore LC, Ciuryla V, Ciesla G, Liu L. Economic impact of respiratory syncytial virus-related illness in the US: an analysis of national databases. *Pharmacoeconomics*. 2004;22(5):275-84.
  7. Glezen WP, Taber LH, Frank AL, Kasel JA. Risk of primary infection and reinfection with respiratory syncytial virus. *Am J Dis Child*. 1986 Jun;140(6):543-6.
  8. Wang EE, Law BJ, Boucher FD, Stephens D, Robinson JL, Dobson S, et al. Pediatric Investigators Collaborative Network on Infections in Canada (PICNIC) study of admission and management variation in patients hospitalized with respiratory syncytial viral lower respiratory tract infection. *J Pediatr*. 1996 Sep;129(3):390-5.
  9. Prais D, Schonfeld T, Amir J. Admission to the intensive care unit for respiratory syncytial virus bronchiolitis: a national survey before palivizumab use. *Pediatrics*. 2003 Sep;112(3 Pt 1):548-52.
  10. Bloemers BL, van Furth AM, Weijerman ME, Gemke RJ, Broers CJ, van den Ende K, et al. Down syndrome: a novel risk factor for respiratory syncytial virus bronchiolitis--a prospective birth-cohort study. *Pediatrics*. 2007 Oct;120(4):e1076-81.
  11. Garcia CG, Bhore R, Soriano-Fallas A, Trost M, Chason R, Ramilo O, et al. Risk factors in children hospitalized with RSV bronchiolitis versus non-RSV bronchiolitis. *Pediatrics*. 2010 Dec;126(6):e1453-60.
  12. Sigurs N, Gustafsson PM, Bjarnason R, Lundberg F, Schmidt S, Sigurbergsson F, et al. Severe respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy and asthma and allergy at age 13. *Am J Respir Crit Care Med*. 2005 Jan 15;171(2):137-41.
  13. Sigurs N, Aljassim F, Kjellman B, Robinson PD, Sigurbergsson F, Bjarnason R, et al. Asthma and allergy patterns over 18 years after severe RSV bronchiolitis in the first year of life. *Thorax*. 2010 Dec;65(12):1045-52.
  14. Sigurs N, Bjarnason R, Sigurbergsson F, Kjellman B. Respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy is an important risk factor for asthma and allergy at age 7. *Am J Respir Crit Care Med*. 2000 May;161(5):1501-7.
  15. Stein RT, Sherrill D, Morgan WJ, Holberg CJ, Halonen M, Taussig LM, et al. Respiratory syncytial virus in early life and risk of wheeze and allergy by age 13 years. *Lancet*. 1999 Aug 14;354(9178):541-5.
  16. Graham BS. Biological challenges and technological opportunities for respiratory syncytial virus vaccine development. *Immunol Rev*. 2011 Jan;239(1):149-66.
  17. Metz-Boutigue MH, Jolles J, Mazurier J, Schoentgen F, Legrand D, Spik G, et al. Human lactotransferrin: amino acid sequence and structural comparisons with other transferrins. *Eur J Biochem*. 1984 Dec 17;145(3):659-76.
  18. Bennett RM, Kokocinski T. Lactoferrin content of peripheral blood cells. *Br J Haematol*. 1978 Aug;39(4):509-21.
-



19. Conneely OM. Antiinflammatory activities of lactoferrin. *J Am Coll Nutr.* 2001 Oct;20(5 Suppl):389S-95S; discussion 96S-97S.
20. Lonnerdal B, Iyer S. Lactoferrin: molecular structure and biological function. *Annu Rev Nutr.* 1995;15:93-110.
21. van der Strate BW, Beljaars L, Molema G, Harmsen MC, Meijer DK. Antiviral activities of lactoferrin. *Antiviral Res.* 2001 Dec;52(3):225-39.
22. Legrand D. Lactoferrin, a key molecule in immune and inflammatory processes. *Biochem Cell Biol.* 2012 Jun;90(3):252-68.
23. Steijns JM, van Hooijdonk AC. Occurrence, structure, biochemical properties and technological characteristics of lactoferrin. *Br J Nutr.* 2000 Nov;84 Suppl 1:S11-7.
24. Levy O. Antibiotic proteins of polymorphonuclear leukocytes. *Eur J Haematol.* 1996 May;56(5):263-77.
25. Manzoni P, Rinaldi M, Cattani S, Pugini L, Romeo MG, Messner H, et al. Bovine lactoferrin supplementation for prevention of late-onset sepsis in very low-birth-weight neonates: a randomized trial. *JAMA.* 2009 Oct 7;302(13):1421-8.
26. Puddu P, Borghi P, Gessani S, Valenti P, Belardelli F, Seganti L. Antiviral effect of bovine lactoferrin saturated with metal ions on early steps of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Int J Biochem Cell Biol.* 1998 Sep;30(9):1055-62.
27. Hasegawa K, Motsuchi W, Tanaka S, Dosako S. Inhibition with lactoferrin of in vitro infection with human herpes virus. *Jpn J Med Sci Biol.* 1994 Apr;47(2):73-85.
28. Andersen JH, Osbakk SA, Vorland LH, Traavik T, Gutteberg TJ. Lactoferrin and cyclic lactoferricin inhibit the entry of human cytomegalovirus into human fibroblasts. *Antiviral Res.* 2001 Aug;51(2):141-9.
29. Grover M, Giouzeppos O, Schnagl RD, May JT. Effect of human milk prostaglandins and lactoferrin on respiratory syncytial virus and rotavirus. *Acta Paediatr.* 1997 Mar;86(3):315-6.
30. Sano H, Nagai K, Tsutsumi H, Kuroki Y. Lactoferrin and surfactant protein A exhibit distinct binding specificity to F protein and differently modulate respiratory syncytial virus infection. *Eur J Immunol.* 2003 Oct;33(10):2894-902.
31. Habibi MS, Openshaw PJ. Benefit and harm from immunity to respiratory syncytial virus: implications for treatment. *Curr Opin Infect Dis.* 2012 Oct 18.
32. Beaudry M, Dufour R, Marcoux S. Relation between infant feeding and infections during the first six months of life. *J Pediatr.* 1995 Feb;126(2):191-7.
33. Li XJ, Liu DP, Chen HL, Pan XH, Kong QY, Pang QF. Lactoferrin protects against lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *Int Immunopharmacol.* 2012 Feb;12(2):460-4.
34. Kuhara T, Yamauchi K, Iwatsuki K. Bovine lactoferrin induces interleukin-11 production in a hepatitis mouse model and human intestinal myofibroblasts. *Eur J Nutr.* 2012 Apr;51(3):343-51.
35. Togawa J, Nagase H, Tanaka K, Inamori M, Nakajima A, Ueno N, et al. Oral administration of lactoferrin reduces colitis in rats via modulation of the immune system and correction of cytokine imbalance. *J Gastroenterol Hepatol.* 2002 Dec;17(12):1291-8.

---

## **CAPÍTULO II**

### **Artigo de Revisão**

---

## CAPÍTULO II

*Vírus sincicial respiratório: uma análise epidemiológica e mecânica do sistema imune para o desenvolvimento de novas estratégias profiláticas*

---

## 2 ARTIGO DE REVISÃO

### PÁGINA DE ROSTO

***Vírus sincicial respiratório: uma análise epidemiológica e mecanística do sistema imune para o desenvolvimento de novas estratégias profiláticas***

Lucien Gualdi MS<sup>1</sup>, Paulo Márcio Condessa Pitrez MD, PhD<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS – Laboratório de Respirologia Pediátrica.

Currículo dos autores está disponível em [www.cnpq.br/plataformalattes](http://www.cnpq.br/plataformalattes)

Fonte financiadora: CNPq

Total de palavras: 3,318

Autor para correspondência:  
Lucien Peroni Gualdi  
Instituto de Pesquisas Biomédicas da PUCRS  
Avenida Ipiranga, 6690 2º andar  
Cep: 90610-000 - Porto Alegre - RS  
Brazil

---

## **INTRODUÇÃO**

O vírus sincicial respiratório (VSR) é um pneumovírus de cadeia simples que pertence a família Paramyxoviridae. Este vírus foi primeiramente descrito em 1956 como um agente de coriza em chimpanzés e, no ano de 1957, foi associado a bronquiolite aguda em crianças (1, 2). O VSR é a principal causa da bronquiolite viral aguda (BVA), sendo responsável por 70% das hospitalizações. Estudos relatam que o vírus por si só é a causa mais comum de hospitalização na infância (3-5). O papel do sistema imune na infecção por VSR tem sido bastante discutido ao longo dos anos. A busca por um entendimento de como o sistema imune interage com o VSR e o por que alguns indivíduos desenvolvem a forma mais grave da doença, enquanto outros não, são os objetivos de diversos grupos de pesquisa no mundo. Neste artigo, buscamos apresentar os principais mecanismos imunológicos envolvidos na bronquiolite aguda por VSR.

## **VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO**

O VSR é um vírus envelopado de cadeia simples, pertencente a ordem Mononegvirales, família Paramyxoviridae, da espécie pneumovírus (6). Apesar de ser um vírus de genoma relativamente pequeno, que codifica apenas onze proteínas, o VSR é bastante sofisticado, gerando proporções adequadas de proteína viral para a replicação. Em seu envelope, o VSR possui três proteínas de superfície principais: G (proteína de ligação principal), F (proteína de fusão) e SH (proteína

---

---

hidrofóbica). A proteína F é indispensável e medeia tanto a fusão do vírus com a célula hospedeira, quanto a fusão célula-célula na formação de sincícios. Anticorpos para a proteína F podem prevenir a infecção, se administrados antes do estabelecimento da doença (7). Recentemente, estudos têm demonstrado a importância de proteínas não estruturais do VSR (NS1 e NS2) no estabelecimento da doença (8). Além disso, existem dois subtipos genéticos principais de VSR: A e B, que podem ser identificados através do uso de anticorpos monoclonais ou por análise de sequenciamento genético. Estes subtipos co-circulam nas populações e a predominância de um sobre o outro varia de acordo com o ano e localização demográfica (9).

## **LIGAÇÃO DO VSR À CÉLULA HOSPEDEIRA**

A invasão das células hospedeiras por VSR envolve a ligação do vírus à glicoaminoglicanos (GAGs). Contudo, infecções *in vitro* não dependem totalmente dos GAGs. Desta forma, um segundo mecanismo, ainda não identificado, deve estar envolvido no processo (10). Molécula de adesão intracelular (ICAM)-1, receptor de quimiocina CX3CR1 e anexina são alguns dos receptores que podem estar envolvidos nesta ligação do vírus à célula hospedeira (11).

---

---

## **EPIDEMIOLOGIA E FATORES DE RISCO DO VSR**

De acordo com a Organização Mundial de Saúde estima-se que 34 milhões de crianças menores de cinco anos de idade sejam infectadas por RSV no mundo anualmente. Além disso, acredita-se que até os dois anos de idade todas as crianças terão sido infectadas por VSR pelo menos uma vez na vida. Nos EUA este vírus é a principal causa de hospitalização de crianças com menos de um ano de idade (3, 4, 12, 13). Em países com clima temperado, as infecções por RSV ocorrem principalmente durante os meses de inverno. Já em regiões de clima tropical e subtropical, a distribuição é diferente ao longo do ano, porém mais comum durante os períodos de chuva. Além disso, no Brasil, em cidades como Porto Alegre e Rio de Janeiro, estudos observaram uma alternância entre os subtipos A e B de ano para ano (14, 15).

Os fatores de risco para o desenvolvimento da doença na sua forma mais grave, com necessidade de hospitalização, incluem neonatos prematuros, crianças com diagnóstico de displasia broncopulmonar, crianças com doença cardíaca congênita, crianças com algum tipo de dano neuromuscular, fibrose cística, síndrome de Down e imunodeficiências. Contudo, nos últimos anos, diversos estudos têm demonstrado que a maioria das crianças hospitalizadas com diagnóstico de BVA por VSR eram previamente saudáveis (16, 17).

---

---

## **BRONQUIOLITE VIRAL AGUDA E VSR**

A BVA é a causa mais comum de hospitalização em lactentes, sendo que 70% dessas hospitalizações são causadas por VSR (3-5). A BVA caracteriza-se por inflamação intensa das vias aéreas associada a edema, produção de muco por células caliciformes e extravazamento de células epiteliais, além de infiltração de células inflamatórias. Estes fatores levam ao estreitamento da via aérea e redução de trocas gasosas, que resulta no quadro clínico de atelectasia, hiperinsuflação, sibilos, hipóxia e, em casos mais extremos, falência respiratória com necessidade de ventilação mecânica ou óbito (18, 19).

## **DETECÇÃO DO VÍRUS POR RECEPTORES DE RECONHECIMENTO PADRÃO**

O primeiro contato do VSR com o hospedeiro ocorre através do epitélio respiratório. A partir desta interação do vírus com a célula hospedeira, uma resposta imune inata é iniciada no local. A junção do VSR com as células epiteliais leva a detecção dos componentes virais através dos receptores semelhantes ao "Toll" (TLR) e receptor tipo gene induzível de ácido retinóico (RIG)-1 (20, 21). A expressão de TLR3 pelas células epiteliais contribui para o reconhecimento do VSR pela sua ligação ao RNA viral (20-22). A sinalização derivada de TLR3 e RIG-1 promove a ativação de NF- $\kappa$ B e secreção de citocinas locais em resposta a infecção por VSR (23, 24). Estudos recentes mostraram que os TLR2 e TLR6 estão envolvidos no controle da replicação viral do VSR. Além disto, os TLR2 e TLR6 contribuem para a

---



---

produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- $\alpha$ , IL-6, MCP-1 e RANTES pelos leucócitos, além da migração de neutrófilos e ativação de células dendríticas nos pulmões (25). Contudo, após a infecção por VSR, algumas mudanças podem ser observadas na expressão dos TLRs, e esta mudança parece ter um papel importante no desfecho clínico do indivíduo infectado (26). Estudos têm demonstrado que a expressão de TLR4 está significativamente aumentada durante a infecção por VSR. Além disto, um estudo recente demonstrou que células epiteliais de brônquios humanos infectados com VSR secretam proteína de choque térmico (HSP) 72, que se liga ao TLR4 nos neutrófilos e leva a um aumento na produção de IL8 e TNF- $\alpha$ . (27, 28). O TLR4, que tem por característica a ligação ao LPS, pode se ligar a proteína F do VSR por um mecanismo que ainda não está claramente explicado (7). As células epiteliais pulmonares normalmente são pouco responsivas ao LPS, mas esta resposta está aumentada na infecção por VSR (27). Estudos indicam que TLR4 está ativado no início da infecção por VSR em camundongos e as células polimorfonucleares de sangue periférico de lactentes com bronquiolite hiper-regulam a expressão de TLR4 (29, 30). Polimorfismos na sinalização de TLR4 têm sido associados à forma mais grave de bronquiolite por VSR, porém esta associação ainda é controversa (31-33).

Logo na primeira hora após a infecção, existe ainda uma hiper-regulação de TLR7, porém a participação deste receptor na secreção de citocinas não está bem entendida (34). Recentemente, estudos demonstraram que o VSR é capaz de bloquear a secreção de interferon (IFN) I através da sinalização de TLR7 e TLR9 (35). Para comprovar esta observação, um estudo demonstrou que a deleção de TLR7 é capaz de piorar a doença por VSR, com aumento na expressão de IL-4, IL-13 e IL-17 nos pulmões (36). Contudo, alguns agonistas de TLR7 são capazes de

---

---

aumentar a gravidade da doença em camundongos infectados com VSR (37). Assim, sugere-se que em resposta a uma variedade de estímulos por TLRs, a expressão de IFN tipo I pode ser inibida pela infecção da célula hospedeira por VSR (8, 38).

Devido às diferentes respostas de citocinas no pulmão em resposta a infecção por VSR, é de extrema importância que futuros estudos avaliem a contribuição dos TLRs na resposta antiviral, inflamação pulmonar, recrutamento de células imunes e eliminação do vírus (39). Um melhor entendimento destes mecanismos poderia ser muito valioso no desenvolvimento de novas vacinas contra o VSR.

## RESPOSTA IMUNE INATA

Após a ativação dos receptores de reconhecimento de padrão, o NF- $\kappa$ B é translocado para o núcleo, promovendo a transcrição de diversos genes pró-inflamatórios (22, 40-43). Esta transcrição juntamente com a infecção epitelial por VSR resulta na produção e secreção de citocinas e quimiocinas, tais como IFN tipo I, IP-10 e RANTES, que promovem o recrutamento de neutrófilos, eosinófilos, células *natural killers* (NK), monócitos, células T reguladoras (Treg) e de memória do sangue periférico ao tecido pulmonar infectado (44). O aumento da expressão de tais moléculas induz inflamação local, processamento de antígenos e quimioatração de células inflamatórias ao epitélio pulmonar (45).

Como dito, o VSR interage com diversas proteínas da célula do hospedeiro, e algumas delas contribuem no desenvolvimento da inflamação precoce. A proteína G

---

---

possui uma semelhança estrutural com a quimiocina CX3CL1 e com o receptor de TNF- $\alpha$  (46, 47). As interações da proteína G com CX3CL1 são importantes na invasão da célula do hospedeiro, independente de GAG, e polimorfismos deste receptor têm sido associados à forma mais grave da doença(48). Estudos experimentais têm demonstrado que a vacinação com polipeptídeos derivados de regiões centrais da proteína G reduzem a replicação viral e a inflamação pulmonar em camundongos (49).

Além disso, altos níveis de citocinas pró-inflamatórias como TNF-  $\alpha$  e interleucina (IL)-6, produzidos por macrófagos alveolares e células epiteliais das vias aéreas, têm sido encontrados no trato respiratório de lactentes com bronquiolite (50). Estudos relevam ainda que crianças com a forma mais grave da doença apresentam um aumento nos níveis de MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , RANTES e IP-10 no lavado broncolaveolar (LBA) (51). TNF- $\alpha$  é a principal citocina pró-inflamatória que pode causar uma doença inflamatória crônica, quando secretada em grandes quantidades, e tem sido associada a eosinofilia após a infecção por VSR (52, 53). Um estudo recente demonstrou uma associação entre asma induzida por VSR e polimorfismos de TNF- $\alpha$ , sugerindo que a hiper-regulação, geneticamente mediada desta citocina, poderia contribuir para maior inflamação da via aérea e doença mais grave por VSR ligada ao quadro de asma (53). Quimiocinas como CXCL8 (IL-8) são responsáveis pelo recrutamento de neutrófilos em resposta a infecção por VSR (54).

Os neutrófilos são os leucócitos mais encontrados no LBA e estes se infiltram nas pequenas vias aéreas de indivíduos com BVA grave. Contudo, não há como amostrar este tipo de via aérea em casos menos graves (55). Esta neutrofilia é observada ainda em casos moderados em um modelo experimental de ovelhas recém-nascidas (56). Os níveis de CXCL8 se correlacionam com a gravidade da

---

---

doença (54). Porém, esta associação pode não ser observada em crianças prematuras, nas quais os níveis de IL-8 estão levemente atenuados (57). Por este motivo, acredita-se que mudanças na imunidade, como resultado da maturação, resultam em diferentes desfechos para a infecção (7).

IFN tipo I é outra citocina muito importante no curso da doença por VSR, e sua supressão está diretamente ligada a duas outras proteínas não estruturais do vírus, NS1 e NS2, que são rápida e abundantemente sintetizadas, seguindo a invasão da célula hospedeira (8). Estudos demonstram que estas proteínas são necessárias para a supressão da secreção de IFN tipo I pelas células epiteliais (58). Ambas as proteínas induzem uma resistência da célula hospedeira ao IFN tipo I (8). O IFN gama é importante, por ser um efetor chave da imunidade mediada por células, mais especificamente um mediador Th1, um tipo celular chave para a defesa antiviral (7). Estas citocinas são produzidas por células infectadas para contra-atacar a replicação viral. Estas moléculas se ligam a receptores de superfície pertencentes ao complexo IFNAR tipo I que ativa diversas vias de sinalização intracelular para promoção de respostas antivirais (59-61). Estudos realizados em camundongos demonstram, ainda, que estes animais recém-nascidos apresentam uma deficiência nas respostas Th1 com produção de IFN- $\gamma$  reduzida. Porém, estes animais são capazes de produzir uma resposta Th2/IL-4 similar a encontrada em camundongos adultos. Estudos mostram que lactentes com BVA possuem respostas linfocíticas de sangue periférico similares às encontradas em estudos experimentais, o que sugere que uma desregulação Th1/Th2 pode estar envolvida na doença (7, 62).

Por serem a principal fonte de produção de IFN- $\gamma$ , as células NK são muito importantes no desenvolvimento de BVA por VSR (63). As células NK respondem

---

---

rapidamente a patógenos e enviam sinais precoces que influenciam no desenvolvimento e recrutamento de outras células imunes (7). Estudos em camundongos BALB/c demonstram que a maior expressão deste tipo celular ocorre um dia após a infecção por VSR, enquanto o pico da doença neste modelo ocorre nos dias 4 e 5 pós-inoculação do vírus. Esta produção de IFN- $\gamma$  é vital no recrutamento de células T CD8 para o pulmão e pode inibir a eosinofilia pulmonar (63, 64). Estudos demonstram que a depleção das células NK durante infecção por VSR promove uma doença Th-2 (65).

As células dendríticas (CDs) também estão ligadas ao desenvolvimento da doença, já que são células apresentadoras de antígenos (APC) “profissionais”, e as primeiras células a induzir respostas imunes adaptativas. Além da produção de citocinas, estas células promovem a coestimulação à células T *naive* que são necessárias na diferenciação de respostas Th1, Th2 ou outros fenótipos. As CDs podem ser recuperadas no LBA, e têm sido bastante estudadas em modelo murino de VSR (7). O número de CDs recuperadas no LBA está aumentado durante a infecção, e este aumento persiste por diversas semanas (66). Além disto, as CDs plasmacitóides são importantes produtoras de IFN tipo I e contribuem para a resposta antiviral (67).

## **CÉLULAS T**

O efeito antiviral das células T, direta ou indiretamente, ainda são controversos, mas estudos em modelos murinos demonstram que este tipo celular possui um papel central na patologia da doença por VSR (7). A infecção inicial

---

---

causada pelo vírus em camundongos BALB/c produz uma forte resposta de IFN- $\gamma$  mediada por linfócitos CD8, além de infiltração de linfócitos nos pulmões. Embora as células T CD4 sejam menos frequentes, células Th1 são mais frequentes que células Th2 mesmo no modelo murino (68). Os linfócitos T citotóxicos estão presente nos pulmões no dia 4 pós-infecção e atingem o pico entre os dias 6 e 14. Estes possuem um papel crítico na eliminação do vírus, porém, podem ainda contribuir para a doença (69). Em contraste, a infecção por VSR em camundongos imunizados com injeção intramuscular da vacina inativada por formalina demonstraram aumento da doença durante a infecção pulmonar com eosinofilia local e expressão de citocinas de resposta Th2 (IL-4, IL-5 e IL-13). Neste caso, a doença parece estar diretamente dependente das células T CD4 (70, 71). Além disto, a imunização com vacinas de vírus recombinante se mostrou o método mais valioso na elucidação das contribuições de diversas proteínas do VSR para a proteção e patologia (7).

Existem ainda evidências de que respostas Th-2 são imunogênicas em respostas primárias de BVA em lactentes, mas estas não são conclusivas, e em camundongos, tais respostas são confinadas apenas a doença secundária em animais sensibilizados. Estudos ainda sugerem que a expressão de IFN- $\gamma$  está associada a gravidade da doença, existindo ainda dúvidas de que a doença pulmonar mediada por células T tenha algum papel na fisiopatogenia da BVA em lactentes com infecção primária (72-77).

Recentemente, estudos identificaram um novo subgrupo de células T CD4 que secreta as citocinas pró-inflamatórias IL-17A e IL-17F, responsáveis por doenças autoimunes e pela defesa contra bactérias extracelulares e fungos (78, 79). Níveis elevados de IL-17 foram encontrados no lavado traqueal de lactentes com BVA por VSR grave (80). O tratamento com anticorpos anti-IL-17, antes e durante a

---

---

infecção por VSR, reduz a inflamação pulmonar neutrofílica e os títulos virais (7). Além disso, estudos com camundongos *knockout* para IL-17 demonstraram diminuição na produção de muco e aumento de células T CD8 pulmonares específicas para VSR, IFN- $\gamma$  e granzima B (81). Contudo, recentemente, foi sugerido que IL-17 na via aérea tenha um papel na convalescência da BVA em lactentes, pela facilitação da resposta antiviral (82). Desta forma, o papel de células Th17 e IL-17 na infecção por VSR em humanos necessita ainda ser melhor estudado (7).

Pesquisadores ao redor do mundo sugerem que novas vacinas deveriam induzir células T de memória para sustentar a produção de anticorpos protetores e evitar a indução de exacerbação da doença por células T mediadoras em uma próxima exposição a doença. A indução da doença pode ser modulada por células T reguladoras (Treg). Este fenótipo regulatório depende da expressão do fator de transcrição FoxP3 (7). Estudos em camundongos BALB/c demonstram que a depleção de Tregs resulta em recrutamento de células T CD8 tardio, exacerbação da doença e atraso na eliminação do vírus (42, 83). Além disto, a depleção de células que expressam FoxP3 revela que as células Treg pulmonares de camundongos infectados por RSV resolvem a inflamação pela inibição de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (84). Desta forma, as células Treg parecem ter um papel chave na inflamação pulmonar induzida por VSR em um modelo murino, mas o papel destas células na doença em humanos necessita ser melhor estudado (7).

Estudos demonstram que um subgrupo de células T que infiltra o tecido infectado secreta, ainda, citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 (52, 85, 86). Acredita-se que a secreção destas citocinas pelas células T tem a intenção de reduzir a inflamação da via aérea causada pelas células imunes inatas. Em um modelo murino de VSR, o aumento da expressão de IL-10 correlaciona-se com

---

---

redução de eosinofilia (87-89). Contudo, a combinação de IL-10 com ICAM-1 solúveis em secreções nasofaríngeas correlaciona-se com a forma mais grave da doença em crianças (89). Assim, diferentes níveis e combinações de moléculas pró e anti-inflamatórias podem influenciar de maneira significativa na fisiopatogenia da doença por VSR (39).

### **DIFERENÇAS NA RESPOSTA IMUNE DE ACORDO COM A CEPA DO VÍRUS**

Como já descrito, o VSR possui diversas cepas diferentes. Cada uma delas possui diferente variabilidade genética, o que altera a virulência e leva a mudanças na fisiopatogenia da doença. Este achado é de extrema importância no desenvolvimento de novas vacinas. Obviamente, os sistemas básicos devem ser levados em consideração no ponto de vista mecânico, porém, a plasticidade inerente nestes mecanismos e suas manifestações fenotípicas podem levar a diferentes respostas imunes inata e adaptativa causadas pela infecção por VSR (58).

Recentemente, diversos estudos têm sido publicados com o objetivo de avaliar os efeitos de diferenças intrínsecas na fisiopatogenia do VSR e resposta imune. Em um estudo onde pesquisadores utilizaram diferentes cepas clínicas e de laboratório de VSR, os resultados sugerem que existe uma variação nos níveis de IL-13 e proteína gob-5, na variação da replicação viral *in vitro* e nos títulos virais *in vivo*, mesmo nas cepas com características similares (90).

---



---

## **TRATAMENTO ATUAL E NOVAS ESTRATÉGIAS PARA A PROFILAXIA DO VSR**

O tratamento para BVA causada pelo VSR é limitado e consiste apenas no suporte à doença causado pela infecção. Existe apenas uma terapia específica disponível hoje em dia capaz de prevenir o desenvolvimento da doença. A eficácia do anticorpo monoclonal palavizumabe mostra que altos níveis de anticorpos circulantes são suficientes à proteção contra a doença de trato respiratório inferior em neonatos (7).

O uso de proteínas específicas do vírus pode ser de grande importância no desenvolvimento de novas estratégias profiláticas contra o VSR. No momento, diversos grupos de pesquisa têm trabalhado com a proteína G do VSR, e os resultados iniciais são bastante animadores, já que alguns estudos experimentais têm demonstrado que a vacinação com polipeptídeos derivados de regiões centrais da proteína G reduzem a replicação viral e a inflamação pulmonar em camundongos (49).

## **CONCLUSÃO**

Embora nas últimas décadas tenham ocorrido avanços no entendimento dos mecanismos de ação do VSR, diversas limitações ainda estão presentes. Pode-se observar que existe uma diferença na resposta causada pelo vírus, quando comparados estudos experimentais e clínicos, e estas diferenças devem ser levadas

---

---

em consideração na tentativa de desenvolver uma nova terapia ou vacina contra o vírus.

Dois potenciais alvos terapêuticos são citocinas e proteínas isoladas do vírus. O bloqueio de certas citocinas ou quimiocinas poderia ser usado para reduzir a doença pulmonar causada pelo VSR. A administração de anticorpos que bloqueiam a atividade de certas citocinas, *in vivo*, como RANTES e CCL20, tem demonstrado redução significativa na hiperresposividade das vias aéreas em camundongos e previne a produção excessiva de muco pelas células epiteliais. Proteínas isoladas do vírus, como a proteína G, vem sendo cada vez mais estudadas no desenvolvimento de uma vacina eficaz contra o VSR.

## REFERÊNCIAS

1. Blount RE, Jr., Morris JA, Savage RE. Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1956 Jul;92(3):544-9.
  2. Chanock R, Finberg L. Recovery from infants with respiratory illness of a virus related to chimpanzee coryza agent (CCA). II. Epidemiologic aspects of infection in infants and young children. *Am J Hyg.* 1957 Nov;66(3):291-300.
  3. Shay DK, Holman RC, Newman RD, Liu LL, Stout JW, Anderson LJ. Bronchiolitis-associated hospitalizations among US children, 1980-1996. *JAMA.* 1999 Oct 20;282(15):1440-6.
  4. Hall CB, Long CE, Schnabel KC. Respiratory syncytial virus infections in previously healthy working adults. *Clin Infect Dis.* 2001 Sep 15;33(6):792-6.
  5. Paramore LC, Ciuryla V, Ciesla G, Liu L. Economic impact of respiratory syncytial virus-related illness in the US: an analysis of national databases. *Pharmacoeconomics.* 2004;22(5):275-84.
  6. Collins PL, Graham BS. Viral and host factors in human respiratory syncytial virus pathogenesis. *J Virol.* 2008 Mar;82(5):2040-55.
  7. Habibi MS, Openshaw PJ. Benefit and harm from immunity to respiratory syncytial virus: implications for treatment. *Curr Opin Infect Dis.* 2012 Dec;25(6):687-94.
-

8. Spann KM, Tran KC, Chi B, Rabin RL, Collins PL. Suppression of the induction of alpha, beta, and lambda interferons by the NS1 and NS2 proteins of human respiratory syncytial virus in human epithelial cells and macrophages [corrected]. *J Virol.* 2004 Apr;78(8):4363-9.
9. Hendry RM, Talis AL, Godfrey E, Anderson LJ, Fernie BF, McIntosh K. Concurrent circulation of antigenically distinct strains of respiratory syncytial virus during community outbreaks. *J Infect Dis.* 1986 Feb;153(2):291-7.
10. Kwilas S, Liesman RM, Zhang L, Walsh E, Pickles RJ, Peeples ME. Respiratory syncytial virus grown in Vero cells contains a truncated attachment protein that alters its infectivity and dependence on glycosaminoglycans. *J Virol.* 2009 Oct;83(20):10710-8.
11. Tayyari F, Marchant D, Moraes TJ, Duan W, Mastrangelo P, Hegele RG. Identification of nucleolin as a cellular receptor for human respiratory syncytial virus. *Nat Med.* 2011 Sep;17(9):1132-5.
12. Glezen WP, Taber LH, Frank AL, Kasel JA. Risk of primary infection and reinfection with respiratory syncytial virus. *Am J Dis Child.* 1986 Jun;140(6):543-6.
13. Nair H, Nokes DJ, Gessner BD, Dherani M, Madhi SA, Singleton RJ, et al. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet.* 2010 May 1;375(9725):1545-55.
14. Straliozzo SM, Nestor SM, Siqueira MM. Respiratory syncytial virus groups A and B in Porto Alegre, Brazil, from 1990 to 1995 and 1998. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001 Feb;96(2):155-8.
15. D'Elia C, Siqueira MM, Portes SA, Sant'Anna CC. [Respiratory syncytial virus -- associated lower respiratory tract infections in hospitalized infants]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2005 Jan-Feb;38(1):7-10.
16. Bloemers BL, van Furth AM, Weijerman ME, Gemke RJ, Broers CJ, van den Ende K, et al. Down syndrome: a novel risk factor for respiratory syncytial virus bronchiolitis--a prospective birth-cohort study. *Pediatrics.* 2007 Oct;120(4):e1076-81.
17. Garcia CG, Bhore R, Soriano-Fallas A, Trost M, Chason R, Ramilo O, et al. Risk factors in children hospitalized with RSV bronchiolitis versus non-RSV bronchiolitis. *Pediatrics.* 2010 Dec;126(6):e1453-60.
18. Simoes EA. Respiratory syncytial virus infection. *Lancet.* 1999 Sep 4;354(9181):847-52.
19. Smyth RL, Openshaw PJ. Bronchiolitis. *Lancet.* 2006 Jul 22;368(9532):312-22.
20. Liu P, Jamaluddin M, Li K, Garofalo RP, Casola A, Brasier AR. Retinoic acid-inducible gene 1 mediates early antiviral response and Toll-like receptor 3 expression in respiratory syncytial virus-infected airway epithelial cells. *J Virol.* 2007 Feb;81(3):1401-11.
21. Xie XH, Law HK, Wang LJ, Li X, Yang XQ, Liu EM. Lipopolysaccharide induces IL-6 production in respiratory syncytial virus-infected airway epithelial cells through the toll-like receptor 4 signaling pathway. *Pediatr Res.* 2009 Feb;65(2):156-62.

22. Groskreutz DJ, Monick MM, Powers LS, Yarovinsky TO, Look DC, Hunninghake GW. Respiratory syncytial virus induces TLR3 protein and protein kinase R, leading to increased double-stranded RNA responsiveness in airway epithelial cells. *J Immunol*. 2006 Feb 1;176(3):1733-40.
  23. Pichlmair A, Schulz O, Tan CP, Naslund TI, Liljestrom P, Weber F, et al. RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. *Science*. 2006 Nov 10;314(5801):997-1001.
  24. Jewell NA, Vaghefi N, Mertz SE, Akter P, Peebles RS, Jr., Bakaletz LO, et al. Differential type I interferon induction by respiratory syncytial virus and influenza A virus in vivo. *J Virol*. 2007 Sep;81(18):9790-800.
  25. Murawski MR, Bowen GN, Cerny AM, Anderson LJ, Haynes LM, Tripp RA, et al. Respiratory syncytial virus activates innate immunity through Toll-like receptor 2. *J Virol*. 2009 Feb;83(3):1492-500.
  26. Scagnolari C, Midulla F, Pierangeli A, Moretti C, Bonci E, Berardi R, et al. Gene expression of nucleic acid-sensing pattern recognition receptors in children hospitalized for respiratory syncytial virus-associated acute bronchiolitis. *Clin Vaccine Immunol*. 2009 Jun;16(6):816-23.
  27. Monick MM, Yarovinsky TO, Powers LS, Butler NS, Carter AB, Gudmundsson G, et al. Respiratory syncytial virus up-regulates TLR4 and sensitizes airway epithelial cells to endotoxin. *J Biol Chem*. 2003 Dec 26;278(52):53035-44.
  28. Wheeler DS, Chase MA, Senft AP, Poynter SE, Wong HR, Page K. Extracellular Hsp72, an endogenous DAMP, is released by virally infected airway epithelial cells and activates neutrophils via Toll-like receptor (TLR)-4. *Respir Res*. 2009;10:31.
  29. Kurt-Jones EA, Popova L, Kwinn L, Haynes LM, Jones LP, Tripp RA, et al. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol*. 2000 Nov;1(5):398-401.
  30. Gagro A, Tominac M, Krsulovic-Hresic V, Bace A, Matic M, Drazenovic V, et al. Increased Toll-like receptor 4 expression in infants with respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Clin Exp Immunol*. 2004 Feb;135(2):267-72.
  31. Haynes LM, Moore DD, Kurt-Jones EA, Finberg RW, Anderson LJ, Tripp RA. Involvement of toll-like receptor 4 in innate immunity to respiratory syncytial virus. *J Virol*. 2001 Nov;75(22):10730-7.
  32. Douville RN, Lissitsyn Y, Hirschfeld AF, Becker AB, Kozyrskyj AL, Liem J, et al. TLR4 Asp299Gly and Thr399Ile polymorphisms: no impact on human immune responsiveness to LPS or respiratory syncytial virus. *PLoS One*. 2010;5(8):e12087.
  33. Kresfelder TL, Janssen R, Bont L, Pretorius M, Venter M. Confirmation of an association between single nucleotide polymorphisms in the VDR gene with respiratory syncytial virus related disease in South African children. *J Med Virol*. 2011 Oct;83(10):1834-40.
  34. Huang S, Wei W, Yun Y. Upregulation of TLR7 and TLR3 gene expression in the lung of respiratory syncytial virus infected mice. *Wei Sheng Wu Xue Bao*. 2009 Feb;49(2):239-45.
-

35. Schlender J, Hornung V, Finke S, Gunthner-Biller M, Marozin S, Brzozka K, et al. Inhibition of toll-like receptor 7- and 9-mediated alpha/beta interferon production in human plasmacytoid dendritic cells by respiratory syncytial virus and measles virus. *J Virol*. 2005 May;79(9):5507-15.
  36. Lukacs NW, Smit JJ, Mukherjee S, Morris SB, Nunez G, Lindell DM. Respiratory virus-induced TLR7 activation controls IL-17-associated increased mucus via IL-23 regulation. *J Immunol*. 2010 Aug 15;185(4):2231-9.
  37. Johnson TR, Rao S, Seder RA, Chen M, Graham BS. TLR9 agonist, but not TLR7/8, functions as an adjuvant to diminish FI-RSV vaccine-enhanced disease, while either agonist used as therapy during primary RSV infection increases disease severity. *Vaccine*. 2009 May 18;27(23):3045-52.
  38. Senft AP, Taylor RH, Lei W, Campbell SA, Tipper JL, Martinez MJ, et al. Respiratory syncytial virus impairs macrophage IFN-alpha/beta- and IFN-gamma-stimulated transcription by distinct mechanisms. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2010 Apr;42(4):404-14.
  39. Bueno SM, Gonzalez PA, Riedel CA, Carreno LJ, Vasquez AE, Kalergis AM. Local cytokine response upon respiratory syncytial virus infection. *Immunol Lett*. 2011 May;136(2):122-9.
  40. Haeberle HA, Takizawa R, Casola A, Brasier AR, Dieterich HJ, Van Rooijen N, et al. Respiratory syncytial virus-induced activation of nuclear factor-kappaB in the lung involves alveolar macrophages and toll-like receptor 4-dependent pathways. *J Infect Dis*. 2002 Nov 1;186(9):1199-206.
  41. Rudd BD, Schaller MA, Smit JJ, Kunkel SL, Neupane R, Kelley L, et al. MyD88-mediated instructive signals in dendritic cells regulate pulmonary immune responses during respiratory virus infection. *J Immunol*. 2007 May 1;178(9):5820-7.
  42. Lee DC, Harker JA, Tregoning JS, Atabani SF, Johansson C, Schwarze J, et al. CD25+ natural regulatory T cells are critical in limiting innate and adaptive immunity and resolving disease following respiratory syncytial virus infection. *J Virol*. 2010 Sep;84(17):8790-8.
  43. Yoboua F, Martel A, Duval A, Mukawera E, Grandvaux N. Respiratory syncytial virus-mediated NF-kappa B p65 phosphorylation at serine 536 is dependent on RIG-I, TRAF6, and IKK beta. *J Virol*. 2010 Jul;84(14):7267-77.
  44. Cautivo KM, Bueno SM, Cortes CM, Wozniak A, Riedel CA, Kalergis AM. Efficient lung recruitment of respiratory syncytial virus-specific Th1 cells induced by recombinant bacillus Calmette-Guerin promotes virus clearance and protects from infection. *J Immunol*. 2010 Dec 15;185(12):7633-45.
  45. Janssen R, Bont L, Siezen CL, Hodemaekers HM, Ermers MJ, Doornbos G, et al. Genetic susceptibility to respiratory syncytial virus bronchiolitis is predominantly associated with innate immune genes. *J Infect Dis*. 2007 Sep 15;196(6):826-34.
  46. Langedijk JP, de Groot BL, Berendsen HJ, van Oirschot JT. Structural homology of the central conserved region of the attachment protein G of respiratory syncytial virus with the fourth subdomain of 55-kDa tumor necrosis factor receptor. *Virology*. 1998 Apr 10;243(2):293-302.
-

- 
47. Tripp RA, Jones LP, Haynes LM, Zheng H, Murphy PM, Anderson LJ. CX3C chemokine mimicry by respiratory syncytial virus G glycoprotein. *Nat Immunol.* 2001 Aug;2(8):732-8.
  48. Amanatidou V, Sourvinos G, Apostolakis S, Tsilimigaki A, Spandidos DA. T280M variation of the CX3C receptor gene is associated with increased risk for severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Pediatr Infect Dis J.* 2006 May;25(5):410-4.
  49. Zhang W, Choi Y, Haynes LM, Harcourt JL, Anderson LJ, Jones LP, et al. Vaccination to induce antibodies blocking the CX3C-CX3CR1 interaction of respiratory syncytial virus G protein reduces pulmonary inflammation and virus replication in mice. *J Virol.* 2010 Jan;84(2):1148-57.
  50. McNamara PS, Flanagan BF, Hart CA, Smyth RL. Production of chemokines in the lungs of infants with severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. *J Infect Dis.* 2005 Apr 15;191(8):1225-32.
  51. Noah TL, Becker S. Chemokines in nasal secretions of normal adults experimentally infected with respiratory syncytial virus. *Clin Immunol.* 2000 Oct;97(1):43-9.
  52. van Benten IJ, van Drunen CM, Koevoet JL, Koopman LP, Hop WC, Osterhaus AD, et al. Reduced nasal IL-10 and enhanced TNFalpha responses during rhinovirus and RSV-induced upper respiratory tract infection in atopic and non-atopic infants. *J Med Virol.* 2005 Feb;75(2):348-57.
  53. Puthothu B, Bierbaum S, Kopp MV, Forster J, Heinze J, Weckmann M, et al. Association of TNF-alpha with severe respiratory syncytial virus infection and bronchial asthma. *Pediatr Allergy Immunol.* 2009 Mar;20(2):157-63.
  54. Smyth RL, Mobbs KJ, O'Hea U, Ashby D, Hart CA. Respiratory syncytial virus bronchiolitis: disease severity, interleukin-8, and virus genotype. *Pediatr Pulmonol.* 2002 May;33(5):339-46.
  55. Johnson JE, Gonzales RA, Olson SJ, Wright PF, Graham BS. The histopathology of fatal untreated human respiratory syncytial virus infection. *Mod Pathol.* 2007 Jan;20(1):108-19.
  56. Sow FB, Gallup JM, Krishnan S, Patera AC, Suzich J, Ackermann MR. Respiratory syncytial virus infection is associated with an altered innate immunity and a heightened pro-inflammatory response in the lungs of preterm lambs. *Respir Res.* 2011;12:106.
  57. Assefa D, Amin N, Dozor AJ, Parton LA. Attenuated interleukin-8/leukocyte immunoresponse in preterm infants compared with term infants hospitalized with respiratory syncytial virus bronchiolitis: a pilot study. *Hum Immunol.* 2011 Sep;72(9):708-11.
  58. Lotz MT, Peebles RS, Jr. Mechanisms of respiratory syncytial virus modulation of airway immune responses. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2012 Oct;12(5):380-7.
  59. Garcia-Sastre A, Biron CA. Type 1 interferons and the virus-host relationship: a lesson in detente. *Science.* 2006 May 12;312(5775):879-82.
  60. Li Z, Strunk JJ, Lamken P, Piehler J, Walz T. The EM structure of a type I interferon-receptor complex reveals a novel mechanism for cytokine signaling. *J Mol Biol.* 2008 Mar 28;377(3):715-24.
-

- 
61. Claudinon J, Gonnord P, Beslard E, Marchetti M, Mitchell K, Boularan C, et al. Palmitoylation of interferon-alpha (IFN-alpha) receptor subunit IFNAR1 is required for the activation of Stat1 and Stat2 by IFN-alpha. *J Biol Chem*. 2009 Sep 4;284(36):24328-40.
  62. Pala P, Bjarnason R, Sigurbergsson F, Metcalfe C, Sigurs N, Openshaw PJ. Enhanced IL-4 responses in children with a history of respiratory syncytial virus bronchiolitis in infancy. *Eur Respir J*. 2002 Aug;20(2):376-82.
  63. Hussell T, Openshaw PJ. Intracellular IFN-gamma expression in natural killer cells precedes lung CD8+ T cell recruitment during respiratory syncytial virus infection. *J Gen Virol*. 1998 Nov;79 ( Pt 11):2593-601.
  64. Hussell T, Openshaw PJ. IL-12-activated NK cells reduce lung eosinophilia to the attachment protein of respiratory syncytial virus but do not enhance the severity of illness in CD8 T cell-immunodeficient conditions. *J Immunol*. 2000 Dec 15;165(12):7109-15.
  65. Kaiko GE, Phipps S, Angkasekwinai P, Dong C, Foster PS. NK cell deficiency predisposes to viral-induced Th2-type allergic inflammation via epithelial-derived IL-25. *J Immunol*. 2010 Oct 15;185(8):4681-90.
  66. Beyer M, Bartz H, Horner K, Doths S, Koerner-Rettberg C, Schwarze J. Sustained increases in numbers of pulmonary dendritic cells after respiratory syncytial virus infection. *J Allergy Clin Immunol*. 2004 Jan;113(1):127-33.
  67. Smit JJ, Rudd BD, Lukacs NW. Plasmacytoid dendritic cells inhibit pulmonary immunopathology and promote clearance of respiratory syncytial virus. *J Exp Med*. 2006 May 15;203(5):1153-9.
  68. Openshaw PJ. Flow cytometric analysis of pulmonary lymphocytes from mice infected with respiratory syncytial virus. *Clin Exp Immunol*. 1989 Feb;75(2):324-8.
  69. Cannon MJ, Openshaw PJ, Askonas BA. Cytotoxic T cells clear virus but augment lung pathology in mice infected with respiratory syncytial virus. *J Exp Med*. 1988 Sep 1;168(3):1163-8.
  70. Connors M, Kulkarni AB, Firestone CY, Holmes KL, Morse HC, 3rd, Sotnikov AV, et al. Pulmonary histopathology induced by respiratory syncytial virus (RSV) challenge of formalin-inactivated RSV-immunized BALB/c mice is abrogated by depletion of CD4+ T cells. *J Virol*. 1992 Dec;66(12):7444-51.
  71. Connors M, Giese NA, Kulkarni AB, Firestone CY, Morse HC, 3rd, Murphy BR. Enhanced pulmonary histopathology induced by respiratory syncytial virus (RSV) challenge of formalin-inactivated RSV-immunized BALB/c mice is abrogated by depletion of interleukin-4 (IL-4) and IL-10. *J Virol*. 1994 Aug;68(8):5321-5.
  72. Roman M, Calhoun WJ, Hinton KL, Avendano LF, Simon V, Escobar AM, et al. Respiratory syncytial virus infection in infants is associated with predominant Th-2-like response. *Am J Respir Crit Care Med*. 1997 Jul;156(1):190-5.
  73. Bont L, Heijnen CJ, Kavelaars A, van Aalderen WM, Brus F, Draaisma JT, et al. Peripheral blood cytokine responses and disease severity in respiratory syncytial virus bronchiolitis. *Eur Respir J*. 1999 Jul;14(1):144-9.
-

- 
74. Bont L, Heijnen CJ, Kavelaars A, van Aalderen WM, Brus F, Draaisma JM, et al. Local interferon-gamma levels during respiratory syncytial virus lower respiratory tract infection are associated with disease severity. *J Infect Dis.* 2001 Aug 1;184(3):355-8.
  75. Chen ZM, Mao JH, Du LZ, Tang YM. Association of cytokine responses with disease severity in infants with respiratory syncytial virus infection. *Acta Paediatr.* 2002;91(9):914-22.
  76. Heidema J, Lukens MV, van Maren WW, van Dijk ME, Otten HG, van Vught AJ, et al. CD8+ T cell responses in bronchoalveolar lavage fluid and peripheral blood mononuclear cells of infants with severe primary respiratory syncytial virus infections. *J Immunol.* 2007 Dec 15;179(12):8410-7.
  77. Lukens MV, van de Pol AC, Coenjaerts FE, Jansen NJ, Kamp VM, Kimpen JL, et al. A systemic neutrophil response precedes robust CD8(+) T-cell activation during natural respiratory syncytial virus infection in infants. *J Virol.* 2010 Mar;84(5):2374-83.
  78. Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol.* 2005 Nov;6(11):1133-41.
  79. Annunziato F, Cosmi L, Santarlasci V, Maggi L, Liotta F, Mazzinghi B, et al. Phenotypic and functional features of human Th17 cells. *J Exp Med.* 2007 Aug 6;204(8):1849-61.
  80. Mukherjee S, Lindell DM, Berlin AA, Morris SB, Shanley TP, Hershenon MB, et al. IL-17-induced pulmonary pathogenesis during respiratory viral infection and exacerbation of allergic disease. *Am J Pathol.* 2011 Jul;179(1):248-58.
  81. Bera MM, Lu B, Martin TR, Cui S, Rhein LM, Gerard C, et al. Th17 cytokines are critical for respiratory syncytial virus-associated airway hyperresponsiveness through regulation by complement C3a and tachykinins. *J Immunol.* 2011 Oct 15;187(8):4245-55.
  82. Faber TE, Groen H, Welfing M, Jansen KJ, Bont LJ. Specific increase in local IL-17 production during recovery from primary RSV bronchiolitis. *J Med Virol.* 2012 Jul;84(7):1084-8.
  83. Ruckwardt TJ, Bonaparte KL, Nason MC, Graham BS. Regulatory T cells promote early influx of CD8+ T cells in the lungs of respiratory syncytial virus-infected mice and diminish immunodominance disparities. *J Virol.* 2009 Apr;83(7):3019-28.
  84. Loebbermann J, Thornton H, Durant L, Sparwasser T, Webster KE, Sprent J, et al. Regulatory T cells expressing granzyme B play a critical role in controlling lung inflammation during acute viral infection. *Mucosal Immunol.* 2012 Mar;5(2):161-72.
  85. Bartz H, Buning-Pfaue F, Turkel O, Schauer U. Respiratory syncytial virus induces prostaglandin E2, IL-10 and IL-11 generation in antigen presenting cells. *Clin Exp Immunol.* 2002 Sep;129(3):438-45.
  86. Grissell TV, Powell H, Shafren DR, Boyle MJ, Hensley MJ, Jones PD, et al. Interleukin-10 gene expression in acute virus-induced asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2005 Aug 15;172(4):433-9.
  87. Jartti T, Paul-Anttila M, Lehtinen P, Parikka V, Vuorinen T, Simell O, et al. Systemic T-helper and T-regulatory cell type cytokine responses in rhinovirus vs. respiratory
-



- 
- syncytial virus induced early wheezing: an observational study. *Respir Res.* 2009;10:85.
88. Stevens WW, Sun J, Castillo JP, Braciale TJ. Pulmonary eosinophilia is attenuated by early responding CD8(+) memory T cells in a murine model of RSV vaccine-enhanced disease. *Viral Immunol.* 2009 Jul;22(4):243-51.
89. Vieira RA, Diniz EM, Ceccon ME. Correlation between inflammatory mediators in the nasopharyngeal secretion and in the serum of children with lower respiratory tract infection caused by respiratory syncytial virus and disease severity. *J Bras Pneumol.* 2010 Jan-Feb;36(1):59-66.
90. Stokes KL, Chi MH, Sakamoto K, Newcomb DC, Currier MG, Huckabee MM, et al. Differential pathogenesis of respiratory syncytial virus clinical isolates in BALB/c mice. *J Virol.* 2011 Jun;85(12):5782-93.
-

---

## **CAPÍTULO III**

**Artigo Original**

---

## CAPÍTULO III

*Lack of Effect of Bovine Lactoferrin in Respiratory Syncytial Virus Replication  
and Clinical Disease in the Mouse Model*

---

---

**3 ARTIGO ORIGINAL**

PÁGINA DE ROSTO

***Lack of Effect of Bovine Lactoferrin in Respiratory Syncytial Virus Replication  
and Clinical Disease in the Mouse Model***

Lucien Gualdi, MS<sup>1</sup>, Sara Mertz, BS<sup>1</sup>, Ana M. Gomez, MD, PhD<sup>2</sup>, A. Wittke, PhD<sup>3</sup> O  
Ramilo, MD<sup>1</sup>, A. Mejias, MD, PhD<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Center for Vaccines and Immunity, The Research Institute at Nationwide Children's Hospital, The Ohio State University, Columbus, OH; <sup>2</sup>Department of Pathology, Cooks Children's Hospital, Fort Worth, TX, <sup>3</sup> Department of Medical Affairs, Mead Johnson Nutrition.

Currículo dos autores está disponível em [www.cnpq.br/plataformalattes](http://www.cnpq.br/plataformalattes) e [www.nationwidechildrens.org](http://www.nationwidechildrens.org)

Fonte financiadora: Mead Johnson Nutrition

Total de palavras: 2.813

Número de palavras do resumo: 260

Autor para correspondência:  
Asuncion Mejias, MD, PhD, MS  
Division of Pediatric infectious Diseases  
Center for Vaccine and Immunity  
The Research Institute at Nationwide Children's Hospital  
700 Children's Drive, W4022  
The Ohio State University College of Medicine  
Columbus, OH 43205  
Phone Number: 614-355-2949  
Fax Number: 614-722-3680  
E-mail: [Asuncion.Mejias@nationwidechildrens.org](mailto:Asuncion.Mejias@nationwidechildrens.org)

---

---

**ABSTRACT**

**Background:** Lactoferrin (LF) is a glycoprotein present in human milk with known antimicrobial effects. In vitro, LF has shown to impair the growth of respiratory syncytial virus (RSV). We sought to assess the effect of bovine (b)LF in RSV replication and different aspects of RSV disease in an in vivo murine model.

**Methods:** BALB/C mice were inoculated with  $10^7$  PFU RSV A2 or 10% EMEM. bLF or placebo (DPBS) were administered once or twice daily by oral gavage or intraperitoneal (IP) injection at doses ranging from 2 to 10mg/animal/day, from 48h before until day 4 post-RSV inoculation. Bronchoalveolar lavage, whole lung specimens and serum samples were harvested on day 5 post inoculation to assess RSV loads, lung inflammation and cytokine concentrations. Weight loss, airway obstruction and disease severity were assessed daily in all groups.

**Results:** On day 5 post-inoculation RSV loads, lung inflammation and serum innate, Th1, Th2 and Th17 cytokine concentrations showed no differences between RSV infected mice treated with bLF and RSV untreated mice independent of bLF dosing and administration route ( $p>0.05$ ). In addition, all bLF groups showed similar weight loss, degree of airway obstruction, and disease severity scores on days 1 to 5 post-inoculation which was comparable to infected untreated mice ( $p>0.05$ ) but higher than uninfected controls.

**Conclusions:** Administration of oral or IP bLF at different doses did not demonstrate antiviral activity or significant effects on disease severity in the RSV mouse model. Whether these observations could be extrapolated to infants at risk of RSV infection needs to be further explored.

**Key-words:** RSV, bovine lactoferrin, disease severity.

---

## INTRODUCTION

Respiratory Syncytial Virus (RSV) is the leading cause of acute lower respiratory tract infection (LRTI) and the leading cause of hospitalization in infants and young children worldwide <sup>1-3</sup>. There are well-characterized risk factors for severe disease <sup>4-6</sup>, however the vast majority of infants hospitalized with RSV are previously healthy with no known risk factors. In addition, despite the burden of the disease there is no vaccine available and treatment remains mostly supportive and non-specific.

Breastfeeding has shown to have a protective effect against respiratory and gastrointestinal infections in infants, including bronchiolitis <sup>7-9</sup>. Lactoferrin (LF) is an iron-binding glycoprotein, member of the transferrin family, which is produced in epithelial cells at the mucosa of many mammals and it is expressed at high concentrations in breast milk <sup>10, 11</sup>. LF has shown to have antibacterial, antifungal activity <sup>12, 13</sup> and has also been shown to have anti-viral activity against a wide range of viruses such as hepatitis C virus (HCV), rotavirus, human immunodeficiency virus (HIV), herpes simplex viruses (HSV), cytomegalovirus (CMV), and in vitro against RSV possibly by preventing viral entry into the target cell or inhibiting virus replication <sup>14-21</sup>. However, whether LF can modulate RSV disease in vivo and the immune mechanisms involved have not been characterized.

The objectives of our study were to evaluate the effect of bovine (b)LF in RSV loads, clinical disease, lung function, lung inflammation and systemic cytokine concentrations in the RSV murine model.

---

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Animals and Inoculation**

Seven-week old female Balb/C mice were intranasally inoculated with  $10^8$  PFU/mL of RSV A2 or sham inoculated with 100  $\mu$ L of sterile 10% EMEM. Animals were allowed to aspirate the inoculum for 30 seconds while held upright until fully recovered from the anesthesia. The Institutional Animal Care and Use Committee at The Research Institute at Nationwide Children's Hospital approved this study and animals were maintained throughout the protocol under specific pathogen-free conditions.

### **Virus, growth conditions and RSV quantification**

Human RSV A2 (courtesy of Dr. Pedro Piedra from Baylor College of Medicine, Houston-TX) was grown in Hep-2 cells and stored as previously described<sup>22, 23</sup>. Viral titers were determined by plaque assay with a lower limit of detection of  $1.7 \log_{10}$  PFU/ml<sup>24, 25</sup>. The same viral batch (A21102-1) was used for all the experiments. Ninety percent confluent Hep-2 cells were used to assess viral loads in fresh bronchoalveolar lavage (BAL) as previously described<sup>22, 23</sup>. The remaining supernatant was stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for viral load quantification using a single step real time PCR targeting the N gene, with lower limits of detection of 10 copies/mL as described<sup>24, 26</sup>.

---

---

## Experimental design and sample collection

Bovine Lactoferrin (Mead Johnson Nutrition, Indiana USA) was daily weighted and diluted in DPBS and administered by oral gavage in a total volume of 200µl/animal from 48h before to 4 days after RSV or 10% EMEM inoculation once or twice a day for 7 consecutive days (**Figure 1**). We used 4 different regimens of bLF per animal per day: 2mg, 3mg, 6mg and 10mg. Five independent experiments were performed; each group included 7 to 15 mice per time point per experimental group: a) RSV infected and treated with bLF, b) RSV infected and sham treated with DPBS and c) non-infected sham treated mice also with DPBS; for a total of 58 mice (**Table 1**). Mice were evaluated daily from day -2 to day 5 of the protocol before bLF administration to assess weight loss, airway obstruction and disease severity using a clinical disease severity score (CDSS) developed by our group that included four parameters: (1) activity, (2) fur appearance, (3) weight loss, and (4) Penh values. Each item of the score ranged from 0 (normal) to 3 (severe) with a higher score of 12 (**Table 2**). All mice were evaluated by the same operator prior any other procedure.

We performed 4 additional experiments in which we used bLF at doses of 40, 50 and 100mg/animal/day via oral gavage from 96/72/48 hours before to 4/6/9 days after RSV inoculation or by intraperitoneal (IP) injection at 3 different doses (1mg, 5mg and 10mg/animal/day) starting at 48h before to 4 days post RSV inoculation with similar results (data not shown).

On day 5 post-RSV inoculation animals were anesthetized with carbon dioxide before cardiac puncture. Blood was collected and serum specimens were stored at -80°C for further cytokines analysis. Bronchoalveolar lavage (BAL) was obtained as previously described for viral load quantification<sup>22, 23</sup> and whole-lung specimens were

---



---

harvested and fixed in 10% buffered formalin for histologic evaluation. Formalin fixed lung sections were stained with H&E and further evaluated by a pathologist blinded to the study protocol to assess pulmonary inflammation using a standardized histopathologic score (HPS) that has been previously validated in the RSV mouse model<sup>22-25</sup>. The HPS system assigns values from 0 (no inflammation) to 17 (severe inflammation) based on 5 parameters: (1) peribronchiolar and bronchial infiltrates, (2) bronchiolar and bronchial luminal exudates, (3) perivascular infiltrate, (4) parenchymal monocytic infiltrate, and (5) parenchymal pneumonia (granulocytic infiltrates in the alveolar spaces).

### **Pulmonary function test**

Unrestrained whole-body plethysmography (Buxco Research Systems, Troy, NY) was used to assess airway obstruction by measuring the baseline enhanced pause (Penh) daily from day -2 to day 5 post RSV inoculation in all groups. Previous studies showed that Penh values correlate with pulmonary airflow resistance or obstruction<sup>22-25, 27</sup>.

### **Cytokine Concentrations in Serum Samples**

Concentrations of the following cytokines were measured in duplicates in serum samples using a 20-plex Bead Immunoassay (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) on day 5 post-RSV inoculation: interferon (IFN)- $\gamma$ , interleukins (IL)-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, IL-17, interferon gamma-induced protein 10 (IP-10), kC (homologous of IL-8), monocyte chemotactic protein (MCP)-1,

---

---

monokine induced interferon gamma (MIG), macrophage inflammatory protein (MIP)-1 $\alpha$ , tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , fibroblast growth factor (FGF)-basic, granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and vascular endothelial growth factor (VEGF). For uninfected controls we evaluated cytokine concentrations in 4 mice while for RSV-infected groups treated with bLF or DPBS the number of mice ranged from 6 to 8 animals per group. The lowest limit of detection ranged from 4 to 76 pg/mL. For statistical analysis, samples with optical fluorescence intensity readings below the limit of the standard curve of the assay were assigned a value half of that of the detection level. Plates were read using Luminex<sup>100</sup> plate reader (Luminex Corporation, Austin, TX).

### **Statistical analysis**

Differences between groups were tested using one-way analysis of variance (ANOVA) or non-parametric Kruskal-Wallis test. If the test demonstrated a significant difference between groups ( $p < 0.05$ ) Tukey or Dunn's test to correct for multiple comparisons was used. For all statistical analyses GraphPad Prism 5 and Sigma Plot (version 11.0) were used.

---

---

## RESULTS

### Comparative effect of bLF on RSV loads determined by tissue culture and RT-PCR

On day 5, the peak of RSV disease in this model, BAL samples were obtained and viral loads determined by plaque assay and real-time PCR. By quantitative culture, viral loads in RSV-infected mice treated with bLF at 2mg, 3mg, 6 mg and 10 mg/animal/day were not significantly different than those measured in RSV-infected untreated mice 3.31 [3.12-3.52] PFU/mL log<sub>10</sub> but significantly higher compared with uninfected controls ( $p < 0.0001$ ) (**Fig. 2A**). BAL RSV loads by RT PCR ranged from 4.82 [3.70-5.57] to 5.51 [5.24-5.83] on day 5 post-infection, and were not significantly different either between RSV-infected bLF treated and untreated mice ( $p > 0.05$ ). RSV RNA was not detected in any uninfected control (**Figure 2B**).

### Lack of Effect of bovine Lactoferrin on RSV-induced clinical disease

To determine whether administration of bLf had any impact on clinical disease severity, mice were weighted daily and disease severity assessed using a clinical disease severity score. Except for uninfected controls whose weight remained unchanged throughout the study (<5% of variation); all RSV infected animals lost from 9.25% (-48h) to 16.40% (day 5) of total body weight independent of the administration of bLF (**Table 3**).

In addition to better assess disease severity we used a clinical disease severity (CDSS) score that included subjective [(1) level of activity and (2) fur

---

---

appearance] and objective parameters [(3) weight loss, and (4) Penh values] for 8 consecutive days. CDSS before RSV inoculation were 0 [0-1] in all groups and remain unchanged in uninfected controls. However, CDSS in RSV-infected mice significantly increased after RSV inoculation (**Fig 3A**). We did not find significant differences between RSV-infected mice treated with bLF and RSV-infected untreated mice regarding the CDSS from days 1 to 5 post RSV inoculation ( $p>0.05$ ). On day 5 post RSV inoculation, the mean CDSS ranged from  $7.4 \pm 1.2$  to  $9.2 \pm 1.3$  on RSV-infected bLF treated mice while the mean value for RSV-infected untreated mice was  $9.2 \pm 0.8$  (**Fig 3B**).

#### **Effect of bovine Lactoferrin on systemic cytokine concentrations**

Twenty cytokines were measured in the serum using 20-plex bead immunoassay. Of those IL-1 $\alpha$ , IL-5, IL-10, IL-13, IL-17, GM-CSF and VEGF were below the limit of detection in all experimental groups. Of the Th1-related cytokines (IL-2, IL-12 and IFN- $\gamma$ ) only IFN- $\gamma$  concentrations were significantly increased in RSV-infected mice compared with non-infected controls independent of the administration of bLF ( $p=0.005$ ). Similarly, concentrations of IL-4 (Th-2), the chemokines CXCL9/MIG, CXCL10/IP-10, CCL2/MCP-1 and the pro-inflammatory cytokines IL-1 $\beta$  and IL-6 were significantly increased in RSV infected mice compared with non-infected controls with no differences observed in mice treated or not with bLF or between the different treatment groups. Other cytokines and chemokines such as, KC (IL-8), TNF- $\alpha$ , or CCL3/MIP-1 $\alpha$  were slightly elevated in RSV infected treated or untreated mice compared with non-infected controls (**Fig. 4**). The Th1:Th2 (IFN- $\gamma$ :IL-

---

4) ratios were comparable between bLF treated RSV-infected and RSV-infected untreated mice at day 5 post RSV inoculation in serum specimens (**Fig. 5**).

### **Lung inflammation in RSV infected mice treated with bovine Lactoferrin**

RSV-infected mice treated with bLF at different doses showed similar HPS scores compared with RSV-infected untreated mice ( $8.33 \pm 0.78$ ) independent of bLF administration ( $p > 0.05$ ) on day 5 post-inoculation (**Fig. 6A**). In addition, there were no significant differences when assessing each component of the score. Non-infected controls did not show signs of inflammations with HPS scores consistently ranging between 0 and 1 (**Fig. 6B**). RSV-infected mice treated with bLF as well as RSV-infected untreated mice showed marked perivascular and peribronchial lymphocyte infiltrates, activation of the vascular endothelium with binding of intravascular leukocytes to the endothelial cells and perivascular edema and acute pneumonia with neutrophils and moderate numbers of macrophages in the alveolar spaces (**Fig 7**).

### **Bovin lactoferrin does not modify Airway obstruction on RSV-infected mice**

To assess airway obstruction (AO), Penh values were measured daily in all study groups. Penh values increased transiently on day 1 after RSV inoculation, decreased by day 2 and increased again on day 3 reaching the peak on day 5 post-RSV inoculation. Daily administration of bLF did not modify AO, which was comparable in all treated mice and in RSV-infected untreated mice ( $p > 0.05$ ) (**Figure 8**).

---

---

## DISCUSSION

In this study we showed that administration of bovine lactoferrin via oral gavage at different doses did not have an effect on RSV replication, the systemic cytokine response, clinical disease assessed using a clinical disease severity score, lung inflammation and lung function. To our knowledge this is the first study that has analyzed in depth the effect of bLF in a RSV model of infection.

LF is an iron binding glycoprotein that is present in different fluids (saliva, milk, tears, and nasal secretions) and secondary granules of PMN<sup>28</sup>. Breast milk is the major source of LF and it is excreted in colostrum in high concentrations up to 7g/l but its plasma levels are low (0.2µg/ml)<sup>29, 30</sup>. LF is also a multifunctional protein involved in a) regulation of iron absorption in the small bowel and promotion of intestinal cell growth; b) antimicrobial activity in the gastrointestinal (GI) tract, bladder and oral mucosa, and c) innate immune responses at the mucosal level<sup>28, 29, 31, 32</sup>.

Several studies have shown that LF has bacteriostatic and bactericidal activity against both Gram-positive and Gram-negative bacteria as well as fungicidal activity, in particular against *Candida* species<sup>12, 13</sup>. Studies, mostly performed in *in vitro* systems, suggest that LF has anti-viral effect against a wide range of viruses possibly by preventing the entry of the virus into the target cell.<sup>17-19, 21, 33</sup> In regards to RSV Sano et al. showed *in vitro* that RSV loads were significantly decreased in Hep-2 cells pre-incubated for 2 h with LF and then infected with RSV compared with cells infected with RSV alone. In addition, IL-8 concentrations were significantly decreased in cells containing LF<sup>33</sup>. In another study, also *in vitro* in which LF was absorbed onto cells 30 minutes prior the incubation of Rotavirus, Semliki Forest Virus (SFV), bovine

---

---

Herpes Virus 2 (BHV-2) or RSV, was found that the maximum anti-viral effect of LF was achieved by absorbing onto the cells 20-30 minutes prior to the virus, otherwise the inhibitory effect was decreased by two-thirds if added at the same time of the virus <sup>21</sup>.

There are few studies showing a protective effect of LF on *in vivo* models. In a rat model of dextran sulfate sodium-induced colitis administration of LF at a dose of 200mg/kg/day by oral gavage starting 3 days before colitis induction until death increased the concentration of anti-inflammatory cytokines (IL-4 and IL-10) as well as decreased the concentration of pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-6) <sup>34</sup>. Another study in mice showed that administration of 5mg/body weight of LF by IP injection 1h before or 1h after LPS administration was associated with significant reductions of total number of cells in BAL samples, increase IL-10 and decrease TNF- $\alpha$  concentrations in a LPS-induced lung injury model <sup>35</sup>. In a zymosan-induced hepatitis mouse model oral administration of bLF from day 1 to day 7 by a oral gavage at a dose of 300 $\mu$ g/g/body weight increased the expression of IL-11 and bone morphogenetic protein 2 (BMP2) in intestinal mucosa on day 6 after oral administration. IL-11 has shown anti-inflammatory effects in patients with Crohn's disease and in a mouse model of collagen-induced arthritis <sup>36, 37</sup>. It has also been suggested that IL-11 can be used to treat patients with hepatic inflammation and liver disease related with hepatitis C virus infection <sup>38</sup>. BMP2 acts as a tumor suppressor that promotes apoptosis and it is also involved in the wound-healing response in the intestines and liver <sup>39</sup>.

Unlike the previous studies, in an influenza mouse model administration of LF at a dose of 62.5mg per mouse by daily gavage from -24h before infection to +24h before sacrifice was associated with reduction of infiltrated leukocytes and reduction

---

---

of lung consolidation suggesting that the administration of LF attenuates pneumonia but no anti-viral effect was demonstrated. Besides the lack of anti-viral effect concentrations of IL-6, IL-12 and IFN- $\gamma$  on BAL samples remained unchangeable after the administration of LF. Similar results were found in a mouse model of HSV-2 infection in which viral titers were not reduced with the administration of LF at doses of 200 $\mu$ g/body before or after viral inoculation<sup>40, 41</sup>.

Our findings differ from most of the studies performed in *in vivo* systems that show a benefic effect of LF in the disease improvement. In our study administration of PO or IP bLF did not demonstrate anti-viral effect on day 5, the peak of RSV replication in this model. In addition we did not observed differences in the concentrations of pro and anti-inflammatory cytokines which has been described in previous animal studies using LF<sup>34, 35</sup>. One possible explanation can be related to timing and dosing of drug administration. We have performed different experiments with lowest doses of 0.75mg/animal/day to 100mg/animal/day (data not shown) in which we found similar results. We also used a different protocol with bLF administration starting 96 hours prior RSV inoculation however; we did not find any differences when compared to the study groups (data not shown). We also tested an alternative route of administration. Mice were treated with bLF before and after RSV inoculation by IP injection. The results of those experiments were also comparable to the ones derived from this study (data not shown). The pharmacokinetics/pharmacodynamics properties of bLF in mice are not completely understood. It is possible that even using higher doses the tissue penetration of bLF in the lungs was low. We could not measure serum bLF concentrations, as ELISAS are not currently available.

---



The search for new substances capable to prevent RSV infections in infants is a promising field. Currently the only means for prophylaxis against RSV is palivizumab, a humanized monoclonal antibody that requires monthly administration during the winter season and is directed only to high-risk children. The fact that bLF treatment was not able to reduce viral infectivity or to ameliorate clinical disease in the mouse model does not preclude that it may have beneficial effects in humans. Further studies addressing the role of bLF in formula fed infants, the target population for RSV disease, need to be further explored.

---

FIGURES

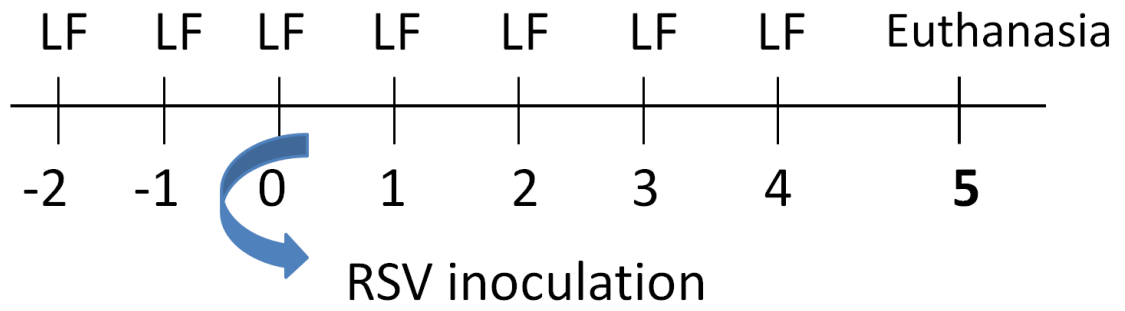
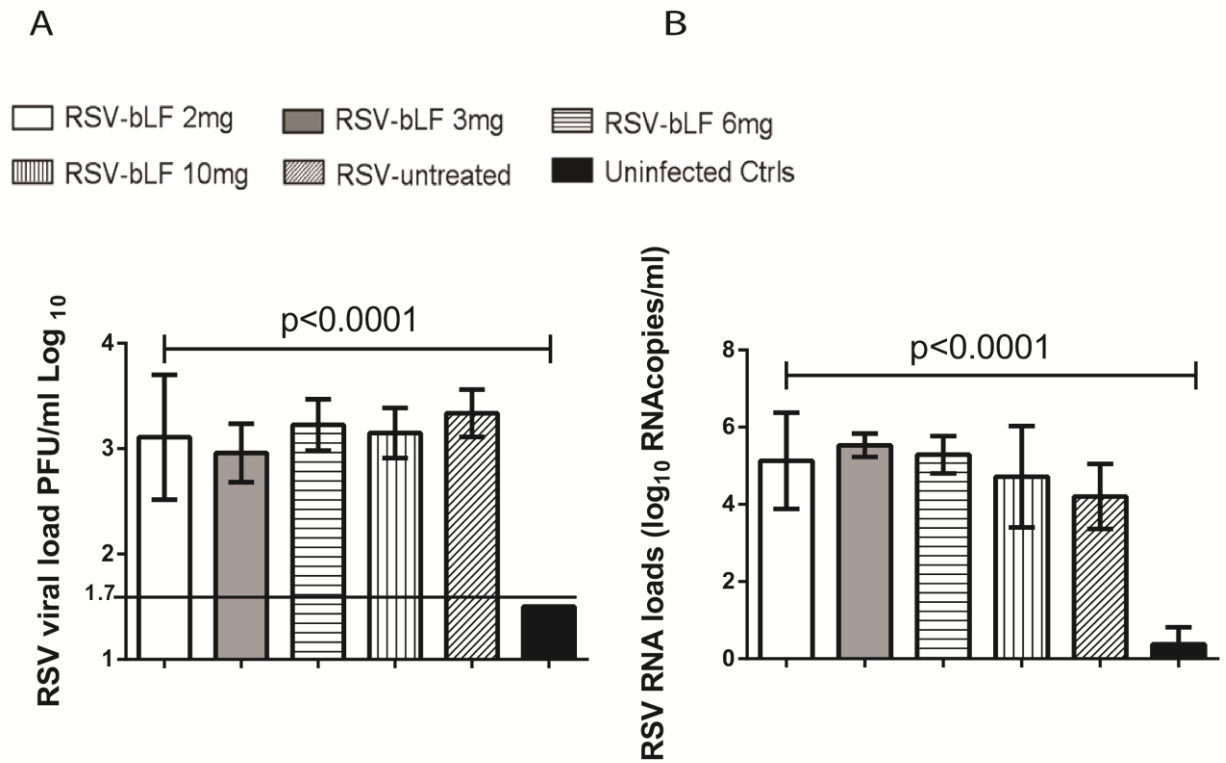
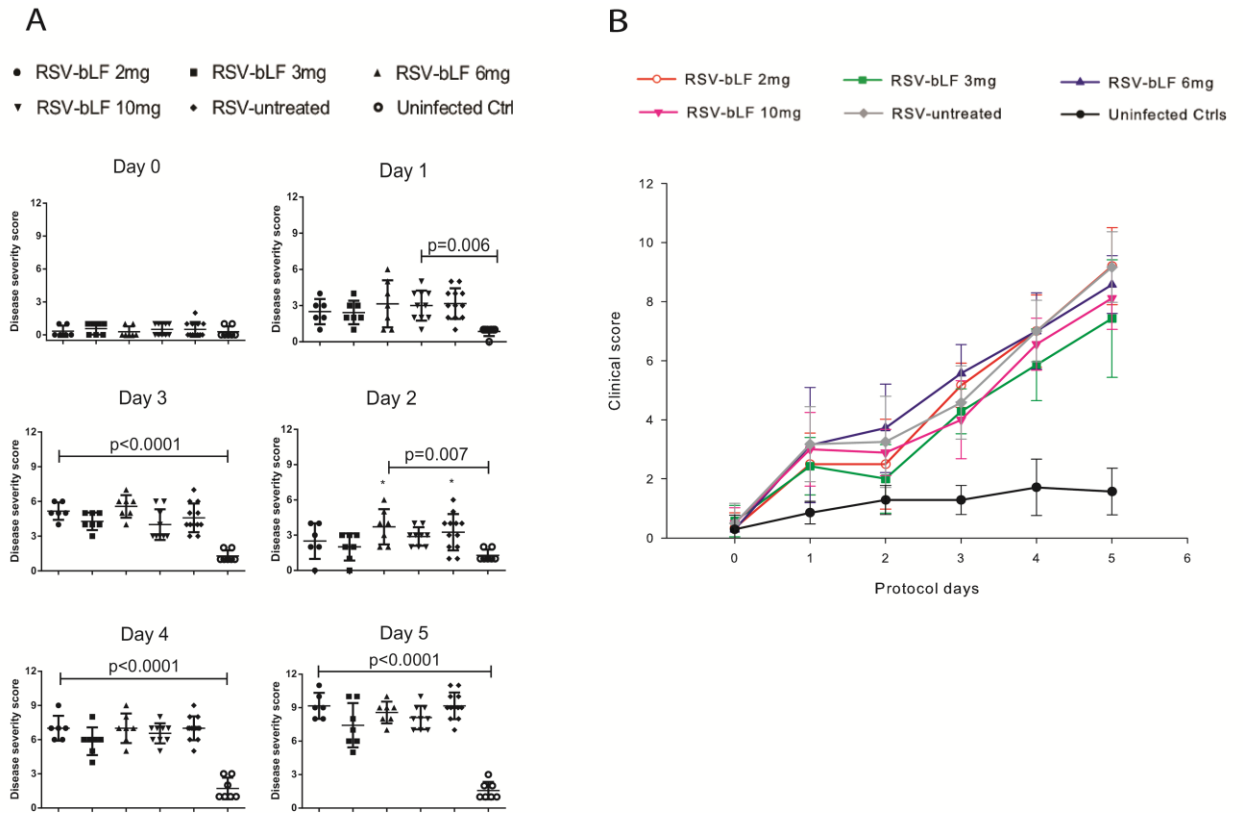


Figure 1 - bLF and RSV inoculation protocol

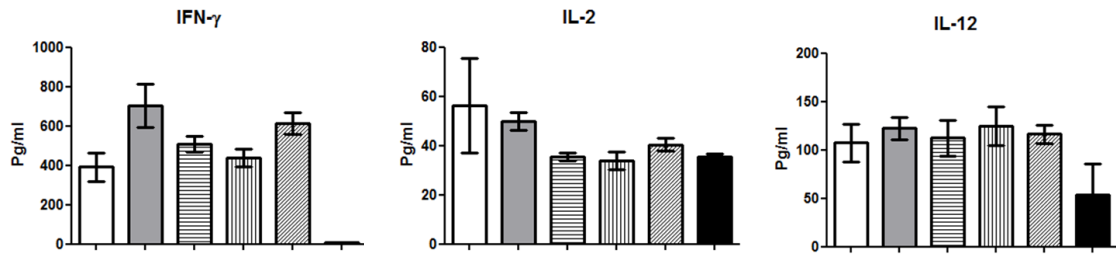


**Figure 2** - Comparative effects of bLF on BAL RSV loads: (A) On day 5 post RSV inoculation, mice (7-15 per group) were euthanized and BAL RSV loads measured by plaque assay. Viral loads were significantly higher in RSV-infected mice compared to uninfected controls independent of the administration of bLF ( $p < 0.0001$ ); (B) BAL RSV RNA loads were significantly higher in RSV-infected treated or untreated mice compared with uninfected ( $p < 0.0001$ ). Comparisons made by one-way ANOVA with Tukey's test for multiple comparisons ( $p < 0.05$ ).



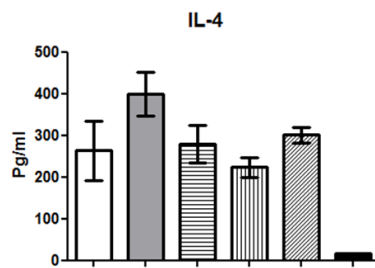
**Figure 3** - Comparison of disease severity using a clinical disease severity score (CDSS) in RSV-infected mice treated with bLf at different doses and RSV-infected untreated mice. (A) Disease severity score was recorded daily before any intervention and comprised four parameters: level of activity, fur appearance, weight loss and airway obstruction (Penh). (B) Comparison between RSV-infected treated with bLf and untreated mice. Comparisons made using One-way ANOVA with Tukey's multiple test comparison each protocol day (n=7 to 15).

**Th-1 Response**



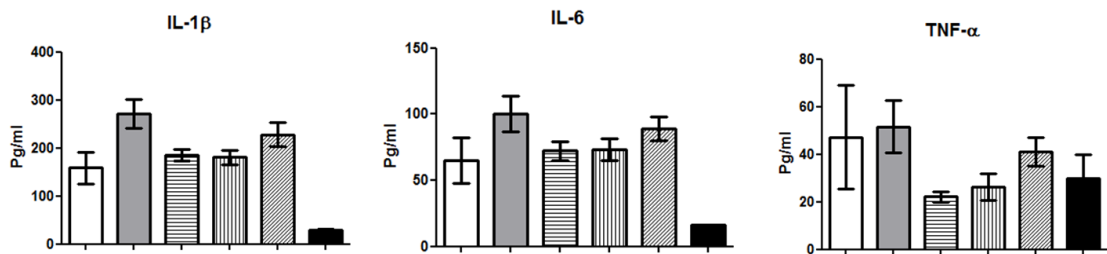
IFN- $\gamma$  ( $p=0.005$ )

**Th-2 Response**



IL-4 ( $p=0.005$ )

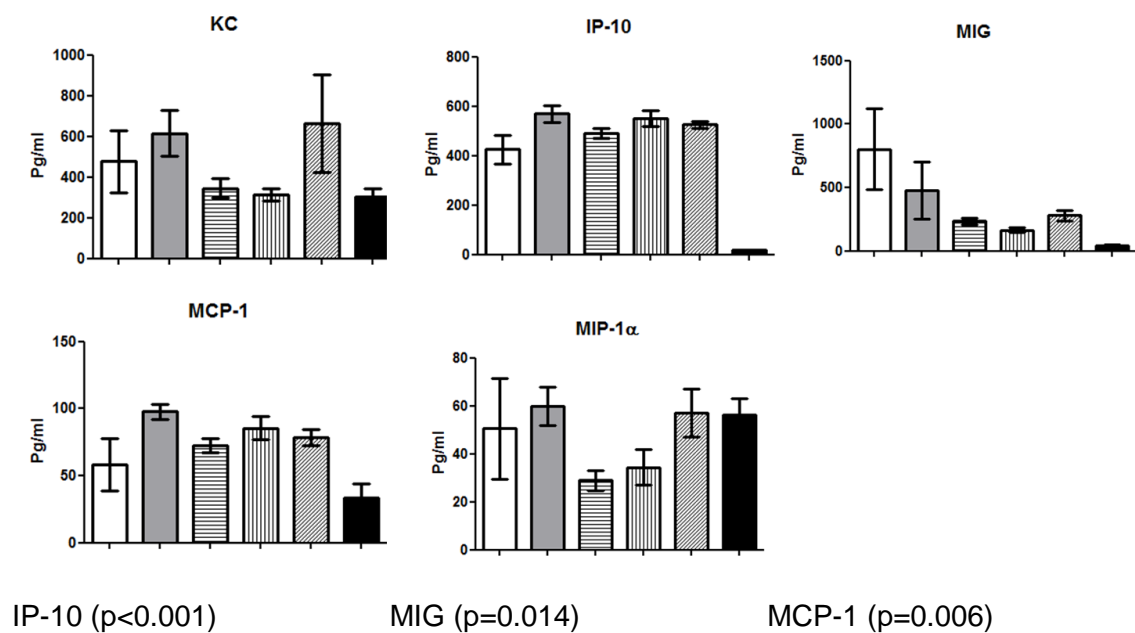
**Proinflammatory Response**



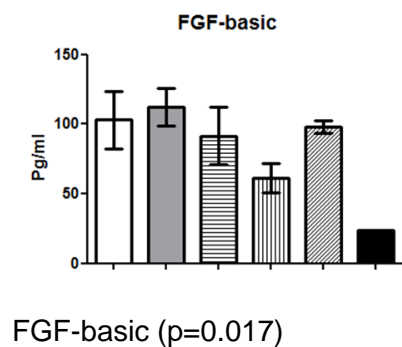
IL-1 $\beta$  ( $p=0.002$ )

IL-6 ( $p=0.004$ )

**Chemokines**

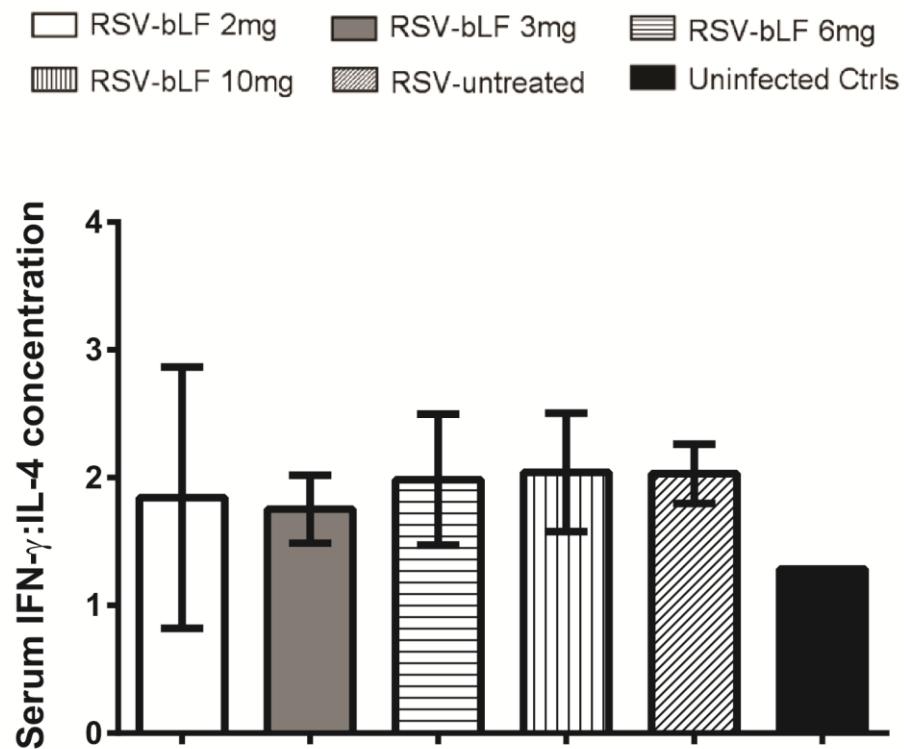


**Growth factors**



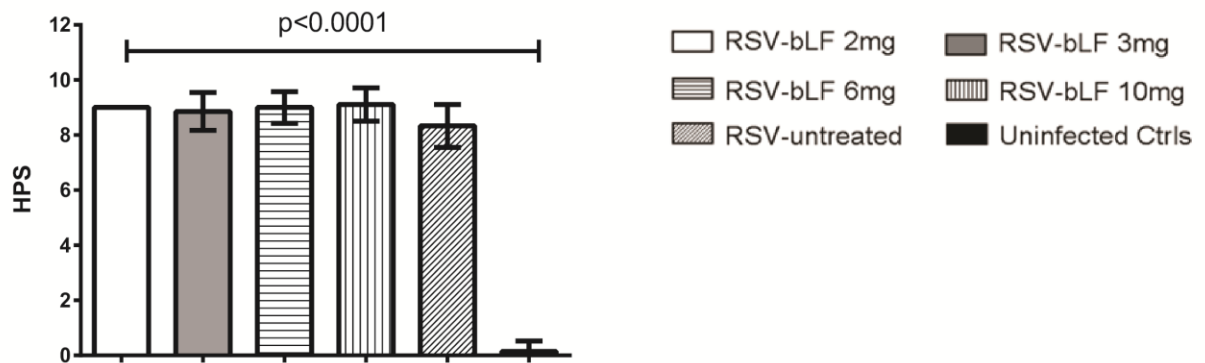
RSV-bLF 2mg    
  RSV-bLF 3mg    
  RSV-bLF 6mg  
 RSV-bLF 10mg    
  RSV-untreated    
 Uninfected Ctrl

**Figure 4** - Serum cytokine concentrations (pg/mL) on Day 5 post-RSV inoculation. Data is expressed as mean ± SD or median [25-75 IQR] as appropriate; One-way ANOVA with Tukey test for multiple comparisons; P value: comparisons between RSV-infected bLF treated/untreated groups and uninfected controls.

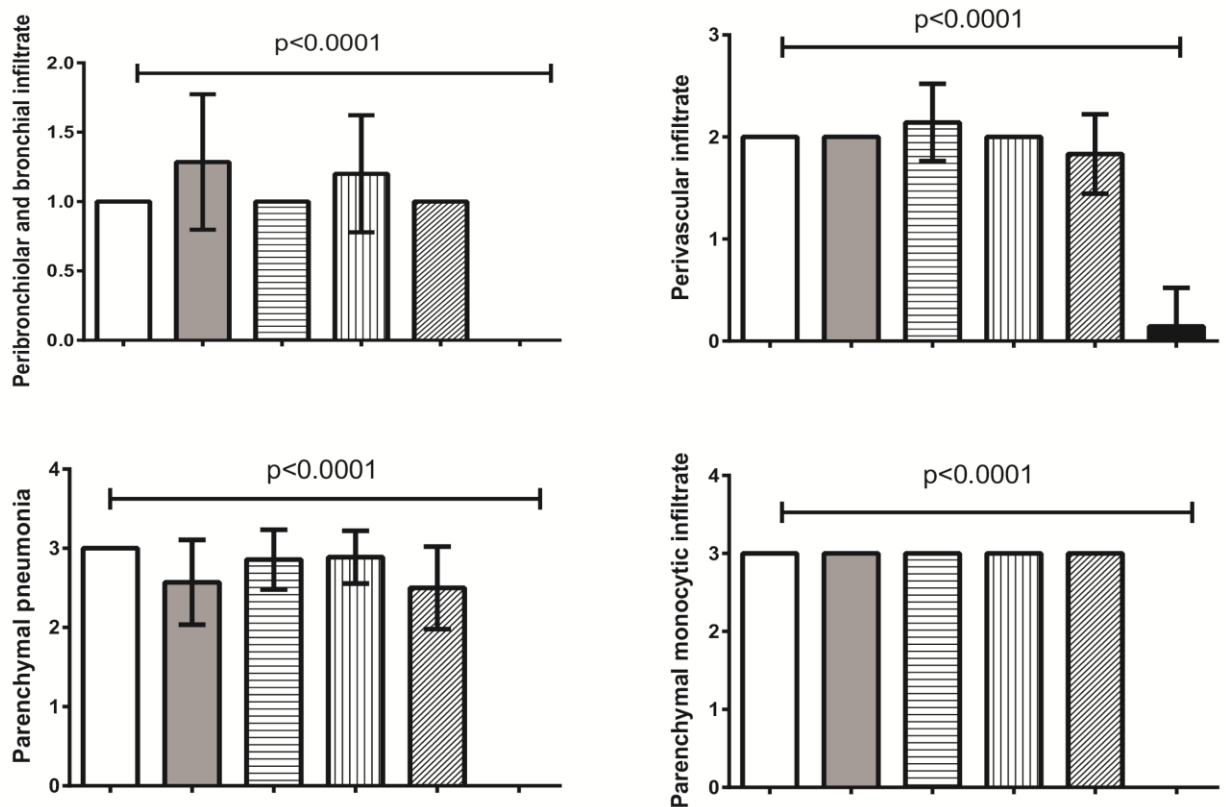


**Figure 5** - Serum interferon IFN- $\gamma$ :IL-4 ratio. Ratios between concentrations of serum Th1 (IFN- $\gamma$ ) and Th-2 (IL-4) were calculated ( $n= 4-8$  mice/group) on day 5 post RSV inoculation. Comparisons were made by one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test ( $p<0.05$ ). For uninfected mice a value half of the lowest limit of detection was assigned for statistical analysis. Values are shown as means  $\pm$  SD.

A

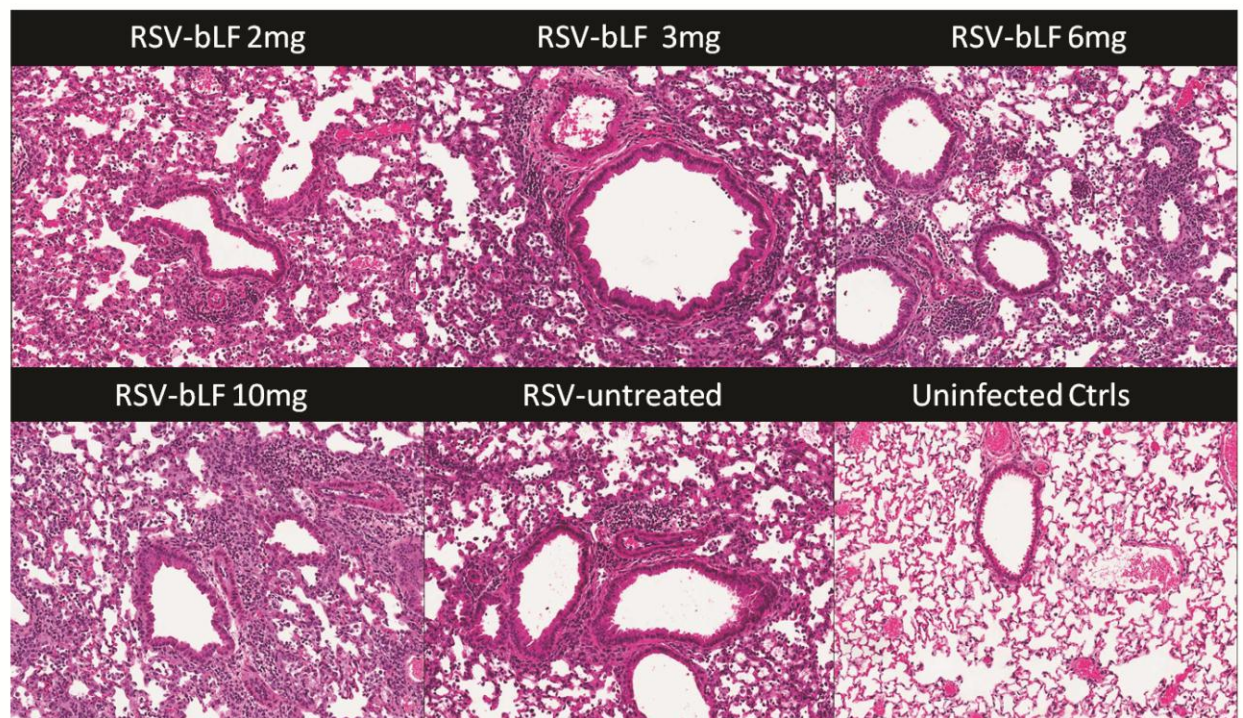


B

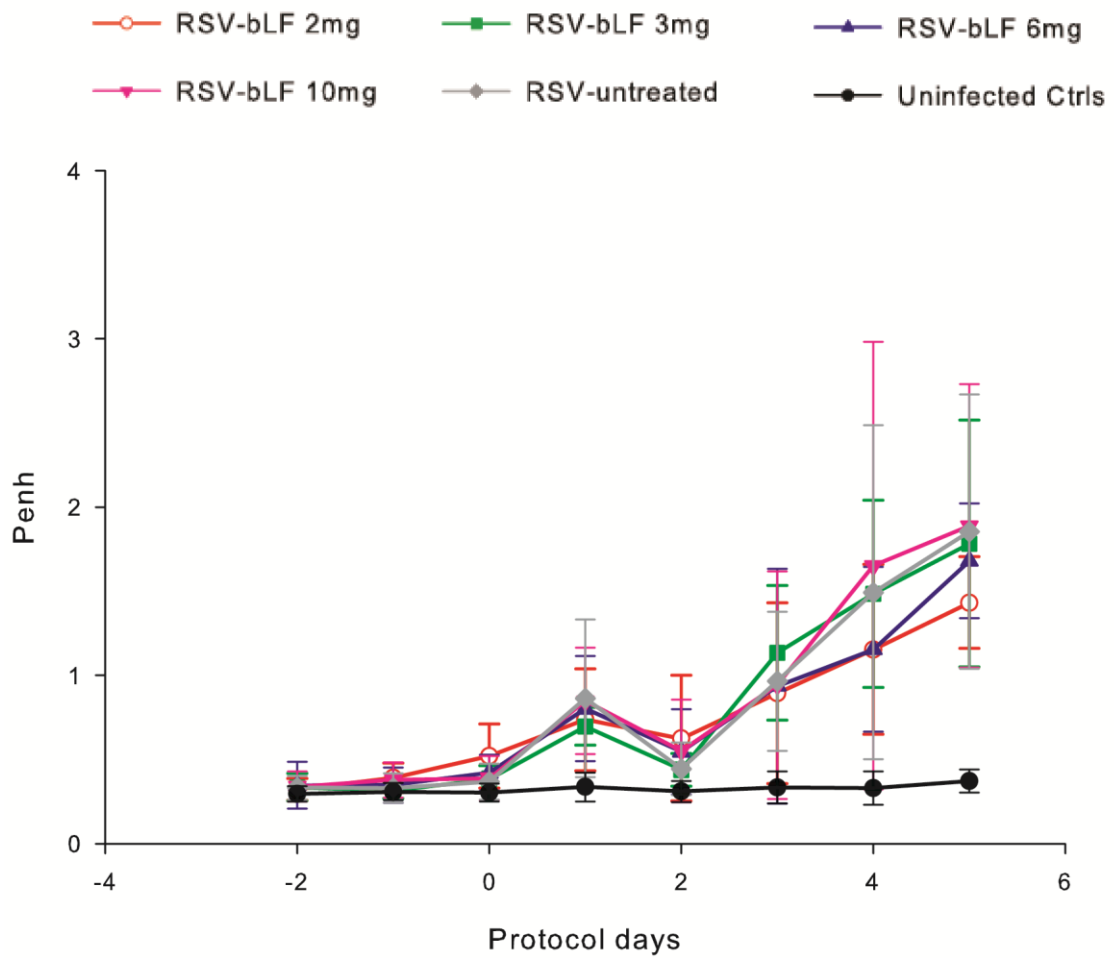


**Figure 6** - Effect of bLF treatment on lung inflammation. (a) Total HPS for lung specimens harvested on day 5 post RSV (n=7 to 15); (b) HSP for 4 independent parameters evaluated of a total of 5. Luminal exudate scores were zero for all samples (not shown). Values are represented as mean and SD.  $p < 0.05$  by one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test. RSV-infected bLF treated mice show similar HPS compared with RSV-infected untreated mice ( $p > 0.05$ ) however, HPS were significantly greater on RSV-infected mice compared with uninfected controls ( $p < 0.0001$ ) for total score and independent parameters.





**Figure 7** - A, B, C, D, E and F: H&E stained lung sections. RSV infected untreated mice and RSV-infected mice treated with 2 mg, 3 mg, 6 mg, 10 mg of bLF demonstrate marked perivascular and peribronchial lymphocyte infiltrates. Note the activation of the vascular endothelium with binding of intravascular leukocytes to the endothelial cells and perivascular edema. There is also acute pneumonia with neutrophils and moderate numbers of macrophages in the alveolar spaces. In some foci, the alveolar septae are expanded by lymphocytic inflammation. No significant differences in the degree or type of inflammation were found between the different treatment groups. In contrast, lung sections from uninfected mice demonstrate no perivascular/peribronchial infiltrates or alveolar infiltrates.



**Figure 8** - Effects of bLF on airway obstruction. To assess AO Penh values were recorded daily before the administration of bLF or DPBS in 7 to 15 mice. The Y axis represents the Penh values and the x axis the study days. Comparisons made by one-way ANOVA with Tukey's multiple comparison test ( $p < 0.05$ ).

**TABLES****Table 1** - bLF dosing according to study groups

<b>Group (dosing)</b>	<b>Number of animals per group</b>
RSV infected bLF treated (2mg/day)	N= 7
RSV infected bLF treated (3mg/day)	N=7
RSV infected bLF treated (6mg/day)	N=8
RSV infected bLF treated (10mg/day)	N=12
RSV infected untreated	N=15
Uninfected control	N=9

Five independent experiments were performed to the study. The lowest dose used was 2mg/day/mice and the highest dose used was 10mg/day/mice. To each group three to four mice were used. Mice were grouped according to received dose for statistical analysis.

**Table 2** - Clinical disease severity score

	<b>Normal (0)</b>	<b>Mild (1)</b>	<b>Moderate (2)</b>	<b>Severe (3)</b>	<b>Total</b>
<b>Activity</b>	Normal	Decreased	Inactive	Inactive and hunched	
<b>Fur</b>	Normal	Barely ruffled	Increased ruffled	Ruffled	
<b>Weight loss</b>	No	3-9%	10%	>10%	
<b>Penh</b>	0.4-0.6	0.7-0.9	1-1.2	>1.3	

**Table 3** - Comparative weight loss of RSV-infected bLF treated mice, RSV-infected untreated mice and uninfected controls during acute RSV infection

Group	Protocol days								Total weight loss (%)
	-2	-1	0	1	2	3	4	5	
Uninfected controls	17.7±1.22	17.5±1.43	17.0±2.15	17.0±2.15	16.8±2.09	16.9±2.11	17.2±1.87	17.1±1.65	3.39%
RSV-untreated	18.5±1.80	18.3±2.09	18.2±2.11	17.4±2.00	17.2±1.85	17.5±1.95	16.9±1.99	15.9±1.90	14.05%
RSV-bLF 2mg	17.3±1.32	17.6±0.95	17.2±1.94	16.5±2.18	16.4±2.32	16.1±2.70	16.8±0.78	15.7 ± 0.81	9.25%
RSV-bLF 3mg	18.9±0.77	18.9±0.66	18.9±0.74	18.2±0.79	17.7±0.84	17.3±0.66	17.1±1.17	15.8±0.77	16.40%
RSV-bLF 6mg	18.2±1.16	18.2±1.31	17.7±1.72	17.8±1.26	17.0±1.31	16.5±0.99	16.6±1.19	15.3±1.01	15.93%
RSV-bLF 10mg	17.8±1.40	17.4±1.56	17.4±1.64	16.5±1.64	16.7±1.29	16.6±1.46	16.3±1.20	15.3±1.13	14.04%
*P Value	0.310	0.279	0.356	0.324	0.777	0.563	0.860	0.161	

Weight (in grams) is expressed as means  $\pm$  SD. \*One-way ANOVA with Tukey test for multiple comparisons was applied to identify differences between the groups ( $p < 0.05$ ).

## REFERENCES

1. Shay DK, Holman RC, Newman RD, Liu LL, Stout JW, Anderson LJ. Bronchiolitis-associated hospitalizations among US children, 1980-1996. *JAMA*. 1999; **282**(15): 1440-6.
2. Hall CB, Weinberg GA, Iwane MK, Blumkin AK, Edwards KM, Staat MA, et al. The burden of respiratory syncytial virus infection in young children. *N Engl J Med*. 2009; **360**(6): 588-98.
3. Nair H, Nokes DJ, Gessner BD, Dherani M, Madhi SA, Singleton RJ, et al. Global burden of acute lower respiratory infections due to respiratory syncytial virus in young children: a systematic review and meta-analysis. *Lancet*. 2010; **375**(9725): 1545-55.
4. Wang EE, Law BJ, Boucher FD, Stephens D, Robinson JL, Dobson S, et al. Pediatric Investigators Collaborative Network on Infections in Canada (PICNIC) study of admission and management variation in patients hospitalized with respiratory syncytial viral lower respiratory tract infection. *J Pediatr*. 1996; **129**(3): 390-5.
5. Bloemers BL, van Furth AM, Weijerman ME, Gemke RJ, Broers CJ, van den Ende K, et al. Down syndrome: a novel risk factor for respiratory syncytial virus bronchiolitis--a prospective birth-cohort study. *Pediatrics*. 2007; **120**(4): e1076-81.
6. Garcia CG, Bhore R, Soriano-Fallas A, Trost M, Chason R, Ramilo O, et al. Risk factors in children hospitalized with RSV bronchiolitis versus non-RSV bronchiolitis. *Pediatrics*. 2010; **126**(6): e1453-60.
7. Beaudry M, Dufour R, Marcoux S. Relation between infant feeding and infections during the first six months of life. *J Pediatr*. 1995; **126**(2): 191-7.
8. Lopez-Alarcon M, Villalpando S, Fajardo A. Breast-feeding lowers the frequency and duration of acute respiratory infection and diarrhea in infants under six months of age. *J Nutr*. 1997; **127**(3): 436-43.
9. Dixon DL, Griggs KM, Forsyth KD, Bersten AD. Lower interleukin-8 levels in airway aspirates from breastfed infants with acute bronchiolitis. *Pediatr Allergy Immunol*. 2010; **21**(4 Pt 2): e691-6.
10. Metz-Boutigue MH, Jolles J, Mazurier J, Schoentgen F, Legrand D, Spik G, et al. Human lactotransferrin: amino acid sequence and structural comparisons with other transferrins. *Eur J Biochem*. 1984; **145**(3): 659-76.
11. Bennett RM, Kokocinski T. Lactoferrin content of peripheral blood cells. *Br J Haematol*. 1978; **39**(4): 509-21.
12. Levy O. Antibiotic proteins of polymorphonuclear leukocytes. *Eur J Haematol*. 1996; **56**(5): 263-77.
13. Manzoni P, Rinaldi M, Cattani S, Pugin L, Romeo MG, Messner H, et al. Bovine lactoferrin supplementation for prevention of late-onset sepsis in very low-birth-weight neonates: a randomized trial. *JAMA*. 2009; **302**(13): 1421-8.
14. Ikeda M, Sugiyama K, Tanaka T, Tanaka K, Sekihara H, Shimotohno K, et al. Lactoferrin markedly inhibits hepatitis C virus infection in cultured human hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998; **245**(2): 549-53.

15. Ikeda M, Nozaki A, Sugiyama K, Tanaka T, Naganuma A, Tanaka K, et al. Characterization of antiviral activity of lactoferrin against hepatitis C virus infection in human cultured cells. *Virus Res.* 2000; **66**(1): 51-63.
  16. Superti F, Ammendolia MG, Valenti P, Seganti L. Antirrotaviral activity of milk proteins: lactoferrin prevents rotavirus infection in the enterocyte-like cell line HT-29. *Med Microbiol Immunol.* 1997; **186**(2-3): 83-91.
  17. Puddu P, Borghi P, Gessani S, Valenti P, Belardelli F, Seganti L. Antiviral effect of bovine lactoferrin saturated with metal ions on early steps of human immunodeficiency virus type 1 infection. *Int J Biochem Cell Biol.* 1998; **30**(9): 1055-62.
  18. Hasegawa K, Motosuchi W, Tanaka S, Dosako S. Inhibition with lactoferrin of in vitro infection with human herpes virus. *Jpn J Med Sci Biol.* 1994; **47**(2): 73-85.
  19. Andersen JH, Osbakk SA, Vorland LH, Traavik T, Gutteberg TJ. Lactoferrin and cyclic lactoferricin inhibit the entry of human cytomegalovirus into human fibroblasts. *Antiviral Res.* 2001; **51**(2): 141-9.
  20. Fujihara T, Hayashi K. Lactoferrin inhibits herpes simplex virus type-1 (HSV-1) infection to mouse cornea. *Arch Virol.* 1995; **140**(8): 1469-72.
  21. Grover M, Giouzeppos O, Schnagl RD, May JT. Effect of human milk prostaglandins and lactoferrin on respiratory syncytial virus and rotavirus. *Acta Paediatr.* 1997; **86**(3): 315-6.
  22. Jafri HS, Chavez-Bueno S, Mejias A, Gomez AM, Rios AM, Nassi SS, et al. Respiratory syncytial virus induces pneumonia, cytokine response, airway obstruction, and chronic inflammatory infiltrates associated with long-term airway hyperresponsiveness in mice. *J Infect Dis.* 2004; **189**(10): 1856-65.
  23. Mejias A, Chavez-Bueno S, Rios AM, Saavedra-Lozano J, Fonseca Aten M, Hatfield J, et al. Anti-respiratory syncytial virus (RSV) neutralizing antibody decreases lung inflammation, airway obstruction, and airway hyperresponsiveness in a murine RSV model. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; **48**(5): 1811-22.
  24. Estripeaut D, Torres JP, Somers CS, Tagliabue C, Khokhar S, Bhoj VG, et al. Respiratory syncytial virus persistence in the lungs correlates with airway hyperreactivity in the mouse model. *J Infect Dis.* 2008; **198**(10): 1435-43.
  25. Torres JP, Gomez AM, Khokhar S, Bhoj VG, Tagliabue C, Chang ML, et al. Respiratory syncytial virus (RSV) RNA loads in peripheral blood correlates with disease severity in mice. *Respir Res.* 2010; **11**: 125.
  26. Mella C, Suarez-Arrabal M, Lopez CS, Stephens J, Fernandez S, Hall M, et al. Innate Immune Dysfunction is Associated with Enhanced Disease Severity in Infants with Respiratory syncytial Bronchiolitis *J Infect Dis.* 2012; **(in press)**.
  27. Rios AM, Mejias A, Chavez-Bueno S, Fonseca-Aten M, Katz K, Hatfield J, et al. Impact of cethromycin (ABT-773) therapy on microbiological, histologic, immunologic, and respiratory indices in a murine model of *Mycoplasma pneumoniae* lower respiratory infection. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004; **48**(8): 2897-904.
  28. Conneely OM. Antiinflammatory activities of lactoferrin. *J Am Coll Nutr.* 2001; **20**(5 Suppl): 389S-95S; discussion 96S-97S.
  29. Lonnerdal B, Iyer S. Lactoferrin: molecular structure and biological function. *Annu Rev Nutr.* 1995; **15**: 93-110.
-

30. van der Strate BW, Harmsen MC, The TH, Sprenger HG, de Vries H, Eikelboom MC, et al. Plasma lactoferrin levels are decreased in end-stage AIDS patients. *Viral Immunol.* 1999; **12**(3): 197-203.
  31. van der Strate BW, Beljaars L, Molema G, Harmsen MC, Meijer DK. Antiviral activities of lactoferrin. *Antiviral Res.* 2001; **52**(3): 225-39.
  32. Legrand D. Lactoferrin, a key molecule in immune and inflammatory processes. *Biochem Cell Biol.* 2012; **90**(3): 252-68.
  33. Sano H, Nagai K, Tsutsumi H, Kuroki Y. Lactoferrin and surfactant protein A exhibit distinct binding specificity to F protein and differently modulate respiratory syncytial virus infection. *Eur J Immunol.* 2003; **33**(10): 2894-902.
  34. Togawa J, Nagase H, Tanaka K, Inamori M, Nakajima A, Ueno N, et al. Oral administration of lactoferrin reduces colitis in rats via modulation of the immune system and correction of cytokine imbalance. *J Gastroenterol Hepatol.* 2002; **17**(12): 1291-8.
  35. Li XJ, Liu DP, Chen HL, Pan XH, Kong QY, Pang QF. Lactoferrin protects against lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *Int Immunopharmacol.* 2012; **12**(2): 460-4.
  36. Sands BE, Winston BD, Salzberg B, Safdi M, Barish C, Wruble L, et al. Randomized, controlled trial of recombinant human interleukin-11 in patients with active Crohn's disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2002; **16**(3): 399-406.
  37. Walmsley M, Butler DM, Marinova-Mutafchieva L, Feldmann M. An anti-inflammatory role for interleukin-11 in established murine collagen-induced arthritis. *Immunology.* 1998; **95**(1): 31-7.
  38. Lawitz EJ, Hepburn MJ, Casey TJ. A pilot study of interleukin-11 in subjects with chronic hepatitis C and advanced liver disease nonresponsive to antiviral therapy. *Am J Gastroenterol.* 2004; **99**(12): 2359-64.
  39. Kuhara T, Yamauchi K, Iwatsuki K. Bovine lactoferrin induces interleukin-11 production in a hepatitis mouse model and human intestinal myofibroblasts. *Eur J Nutr.* 2012; **51**(3): 343-51.
  40. Shin K, Wakabayashi H, Yamauchi K, Teraguchi S, Tamura Y, Kurokawa M, et al. Effects of orally administered bovine lactoferrin and lactoperoxidase on influenza virus infection in mice. *J Med Microbiol.* 2005; **54**(Pt 8): 717-23.
  41. Shestakov A, Jenssen H, Nordstrom I, Eriksson K. Lactoferricin but not lactoferrin inhibit herpes simplex virus type 2 infection in mice. *Antiviral Res.* 2012; **93**(3): 340-5.
-



---

## **CAPÍTULO IV**

### **Conclusões**

---

## **4 CONCLUSÕES**

Com base nos dados anteriormente mostrados é possível concluir:

1. Administração de bLF, independente de dose e via de administração, não alterou as cargas virais em camundongos infectados com VSR.
  2. Administração de bLF em diferentes doses e via de administração não modificou a gravidade da doença clínica em camundongos infectados com VSR.
  3. Concentração de citocinas no soro não foi modificada pela administração de bLF em camundongos infectados com VSR.
  4. Administração de bLF não modificou as alterações pulmonares avaliadas através de um escore histopatológico em um modelo murino de VSR.
  5. Valores de Penh (obstrução de via aérea) não foram modificados pela administração de bLF em um modelo murino de VSR.
  6. A extrapolação desses dados para crianças merece ser melhor avaliada através de estudos clínicos.
-