

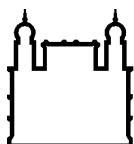
MINISTÉRIO DA SAÚDE  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Biologia Celular e Molecular

**A INFLUENZA GRAVE EXPERIMENTAL É DEPENDENTE DA NECROPTOSE DE  
MACRÓFAGOS**

**ANDRÉ COSTA FERREIRA**

Rio de Janeiro  
Abril de 2018



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**  
**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**ANDRÉ COSTA FERREIRA**

*A influenza grave experimental é dependente da necroptose de macrófagos*

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz  
como parte dos requisitos para obtenção do título  
de Doutor em Biologia Celular e Molecular.

**Orientador (es):** Prof. Dr. Fernando Augusto Bozza  
Prof. Dr. Thiago Moreno Lopes e Souza

**RIO DE JANEIRO**

Abril de 2018

COSTA FERREIRA, ANDRÉ.

A INFLUENZA GRAVE EXPERIMENTAL É DEPENDENTE DA  
NECROPTOSE DE MACRÓFAGOS / ANDRÉ COSTA FERREIRA. - Rio de  
janeiro, 2018.

115 f.; il.

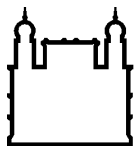
Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia  
Celular e Molecular, 2018.

Orientador: Fernando Augusto Bozza.

Co-orientador: Thiago Moreno Lopes e Souza.

Bibliografia: f. 98-113

1. INFLUENZA. 2. MACRÓFAGOS. 3. NECROPTOSE. 4. INFLAMAÇÃO. I.  
Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

**AUTOR: ANDRÉ COSTA FERREIRA**

### **A INFLUENZA GRAVE EXPERIMENTAL É DEPENDENTE DA NECROPTOSE DE MACRÓFAGOS**

**ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. FERNANDO AUGUSTO BOZZA  
Prof. Dr. THIAGO MORENO LOPES E SOUZA**

**Aprovada em: 26/04/2018**

#### **EXAMINADORES:**

**Prof. Dr. Carmen Penido Monteiro - Presidente (IOC - FIOCRUZ-RJ)**

**Prof. Dr. Juliana De Meis (IOC - FIOCRUZ-RJ)**

**Prof. Dr. Maurício Lacerda Nogueira (FAMERP-SP)**

**Prof. Dr. Lívia Melo Villar (IOC - FIOCRUZ-RJ)**

**Prof. Dr. Eduardo de Mello Volotão (IOC - FIOCRUZ-RJ)**

Rio de Janeiro, 26 de Abril de 2018

***Dedico esse trabalho a minha Família, que é responsável pelo que sou, e a qual quero muito encher de orgulho.***

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus queridos orientadores Dr. Fernando Augusto Bozza e Dr. Thiago Moreno Lopes e Souza, pelos ensinamentos, pelo apoio, ajuda e principalmente por terem acreditado em mim. Sem vocês nada disso seria possível.

Ao Dr. Hugo Caire por ter me ensinado muito nessa minha jornada, a Dra. Patrícia Bozza pelo exemplo de dedicação e coragem, e ao Dr. Válber Frutuoso pela ajuda e serenidade.

A Patrícia Ferreira, minha esposa maravilhosa e a minha linda filhinha Rachelzinha, meus amores e fôlego de vida. Sem vocês eu não sei o que seria da minha vida. Só posso agradecer por vocês existirem, pois isso significa a minha própria existência.

Aos meus queridos pais Fátima e Josias pela força e pelas lutas que venceram para me criar no caminho certo, acreditem, isso não tem preço, e aos meus amados e queridos irmãos João e Raquel pelo companheirismo, pela amizade e por todo o amor que tem para comigo, e claro que eu não posso esquecer de meu querido amigo e cunhado Alan Souza.

A minha queridinha irmãzinha científica Dra. Isaclaudia Gomes pelo carinho, companheirismo, saiba que você mora dentro do meu coração. Não posso esquecer de agradecer a você Dra. Isabel Mattos, sempre compartilhando de seus desesperos comigo e eu os meus com você, haha.

As alunas de iniciação científica (e loucas) Mayara e Priscila, que ajudaram sempre prontamente, mesmo com a Mayara chegando atrasada para a carona e a Priscila sempre procurando alguma coisa para comer.

A Dra. Patrícia Reis pela ajuda e carinho constantes no laboratório, uma parceira como você não tem preço. A Dra. Adriana Ribeiro pelo incentivo desde que eu comecei no lab.

As meninas do grupo vírus, ou grupo Thiago: Carois, Natasha, Andressa e você também Natália, como eu esqueceria de você, ah claro, você não vai me deixar de esquecer seus westerns.

A equipe do laboratório de Vírus Respiratórios e do Sarampo, pelo grande apoio nos experimentos *in vivo*, principalmente as Dras. Marilda Siqueira e Cristiana Couto Garcia.

Ao Dr. Marcelo Bozza e sua equipe laboratorial, por gentilmente nos ceder os animais deficientes para TLR4 e TLR2.

A Dra. Juliana De Meis e a mestre Dina Antunes por tão gentilmente ter me doado o ENBREL para meus experimentos *in vivo*.

Para não ser injusto, a toda a equipe do laboratório de IMUNOFARMACOLOGIA, que por motivo de espaço aqui não posso colocar os seus nomes, mas todos vocês foram fundamentais para o meu crescimento.

A secretária Rose Branco que mantém as engrenagens do laboratório rodando, sempre disposta a resolver nossos problemas, em especial pela amizade e conselhos nos mais diversos temas. Ao pessoal de apoio do pavilhão Ozório de Almeida pelo apoio e ajuda.

A minha mãe científica Dra. Adriana Vieira, que me ensinou meus primeiros passos na ciência. Saiba que te tornas eternamente responsável pelo que cativas.

Aos componentes da banca por terem tão generosamente aceitado ao convite de avaliar a minha Tese.

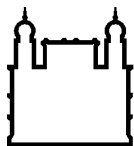
Aos meus queridos amigos da igreja, pelas suas orações incessantes por mim.

E para encerrar, gostaria de agradecer principalmente ao Deus, Todo Poderoso, pelo dom da vida e por ter me dado uma família tão linda, amigos e companheiros inesquecíveis ao longo de minha trajetória neste mundo. Para ELE seja dada toda a Honra e Glória.

***“Todas as vitórias ocultam alguma  
abdicação.”***

***Simone de Beauvoir***





Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

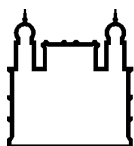
### **A INFLUENZA GRAVE EXPERIMENTAL É DEPENDENTE DA NECROPTOSE EM MACRÓFAGOS**

#### **RESUMO**

#### **TESE DE DOUTORADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR**

**André Costa Ferreira**

O vírus da gripe A é uma das principais preocupações com a saúde pública hoje, afetando 20% da população mundial, gerando cerca de 5 milhões de casos graves e aproximadamente 500.000 mortes anualmente. Embora na maioria dos casos, o sistema imune dos hospedeiros, seja capaz de controlar e debelar a doença, existe uma parcela extremamente significativa da população afetada, em que a doença não consegue ser restringida, e nesses casos pode até mesmo evoluir para o óbito. Apesar da urgência na saúde pública, os mecanismos envolvidos nessa morbidade e mortalidade ainda não foram completamente elucidados. Vários estudos mostram que o vírus da gripe, bem como suas proteínas, por exemplo, a hemaglutinina (HA), geram apoptose das células pulmonares, o que potencializa os efeitos deletérios nos alvéolos pulmonares, destruindo a barreira alvéolo-capilar e induzindo uma resposta inflamatória robusta. Além disso, os macrófagos presentes neste ambiente, uma vez infectados, contribuem para potencializar essa resposta inflamatória, com a produção de várias citocinas pró-inflamatórias, um fenômeno que contribui ainda mais para esta morte celular maciça. No entanto, dados recentes mostraram que, em várias infecções virais, incluindo infecções por vírus da gripe, além da indução de apoptose, podem gerar a necroptose. A necroptose é uma via de morte celular independente da ativação de caspases. Aqui demonstramos que a gripe induz a necroptose em macrófagos humanos e murinos. As análises mecânicas revelaram que a infecção e HA induzem o aumento dos níveis de moléculas da via de necroptose, sendo este fenômeno resultante da produção de TNF- $\alpha$ , através da ativação de TLR4. Nossos dados sugerem que a indução de TNF- $\alpha$  pelo vírus e hemaglutinina não só contribui para o aumento do processo de recrutamento, mas induz um perfil de resposta pró-inflamatória em macrófagos, contribuindo para uma potencialização da resposta inflamatória. O tratamento anti-TNF (Etanercept) foi capaz de minimizar o processo inflamatório no tecido pulmonar, além de prevenir a necroptose em células presentes no líquido alveolar. Esses dados juntos sugerem, portanto, que o tratamento anti-TNF- $\alpha$  pode ser uma alternativa promissora para o tratamento da infecção por vírus da gripe.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

### EXPERIMENTAL SEVERE INFLUENZA IS DEPENDENT ON NECROPTOSIS IN MACROPHAGES

#### ABSTRACT

#### PHD THESIS IN BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

André Costa Ferreira

The influenza A virus is a major public health concern today, affecting 20% of the world's population, generating about 5 million serious cases and approximately 500,000 deaths annually. Although in most cases, the immune system of the host, is able to control and eradicate the disease, there is still a very significant portion of the affected population, the disease can not be restricted, and in such cases may even evolve to death. Despite the urgency in public health, the mechanisms involved in this morbidity and mortality have not yet been fully elucidated. Gravel studies show that the influenza virus and their protein for example, hemagglutinin (HA) generate apoptosis of lung cells, which enhances the deleterious effects in the lung alveoli, destroying the alveolar-capillary barrier and induce an inflammatory response robust. Moreover, macrophages present in this environment once infected, contribute to enhance this inflammatory response with the production of various proinflammatory cytokines, a phenomenon which further contributes to this massive cell death. However, recent data have shown that in various viral infections, including influenza virus infections, in addition to the induction of apoptosis, they can generate necroptosis. Necroptosis is a cell death pathway independent of the activation of caspases. Here we demonstrate that influenza induces necroptosis in human and murine macrophages. The mechanical analysis revealed that the HA infection and induce increased levels of necroptose pathway molecules, and this phenomenon resulting from TNF- $\alpha$  production by TLR4 activation. Our data suggest that TNF- $\alpha$  induction by virus hemagglutinin and not only contributes to increased of recruitment process but induces a pro-inflammatory response profile in macrophages, contributes to an enhancement of the inflammatory response. The anti-TNF treatment (Etanercept) was able to minimize the inflammatory process in the lung tissue, besides preventing necroptosis in cells present in the alveolar fluid. These data together suggest, therefore, that anti-TNF- $\alpha$  treatment may be a promising alternative for the treatment of influenza virus infection.

## ÍNDICE

RESUMO	IX
ABSTRACT	X
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>XIX8</b>
1.1 Histórico da Influenza.....	18
1.2 Epidemiologia.....	23
1.3 Vacinação.....	27
1.4 O vírus Influenza.....	28
1.4.1 Caracterização viral .....	28
1.4.1.1 Hemaglutinina .....	30
1.5 Classificação viral.....	32
1.6 Ciclo replicativo.....	34
1.7 Fisiopatologia do vírus influenza.....	36
1.7.1 Necroptose .....	38
1.7.1.1 Receptores do tipo Toll e Necroptose .....	40
1.7.2 Macrófagos.....	43
1.7.3 Tempestade de citocinas (Cytokine Storm).....	46
1.7.3.1 O papel do TNF- $\alpha$ na Cytokine Storm .....	51
1.7.3.2 TNF- $\alpha$ como potencial alvo terapêutico .....	51
<b>2 JUSTIFICATIVA</b>	<b>55</b>
<b>3 OBJETIVOS</b>	<b>56</b>
3.1 Objetivo Geral.....	56
3.2 Objetivos Específicos .....	56
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>57</b>
5.1 Vírus.....	57
5.2 Células.....	57
5.2.1 Culturas primárias .....	57
5.2.2 Culturas de linhagens .....	58
5.2.3 Estimulação e tratamento das culturas .....	59
5.3 Animais.....	59
5.3.1 Infecção e tratamento dos animais .....	59
5.3.2 Sobrevivência e perda de peso corporal .....	60

5.3.3	Obtenção de tecidos .....	60
5.3.4	Lavado broncoalveolar - LBA.....	60
5.3.5	Contagem total e diferencial das células do LBA .....	61
5.3.6	Quantificação de proteínas.....	61
5.4	Quantificação de citocinas.....	61
5.5	Quantificação de óxido nítrico.....	62
5.6	Quantificação de Desidrogenase Láctica (LDH).....	63
5.7	Citometria de fluxo.....	63
5.8	Western Blotting.....	63
5.9	Análise estatística.....	65
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>LXVII66</b>
5.1	Vírus influenza e hemaglutinina são capazes de induzir o processo de necroptose em macrófagos.....	66
5.2	FLU e HA ativam a necroptose de maneira dependente da ativação de TLR4.....	69
5.3	A indução da produção de TNF- $\alpha$ por Flu e HÁ contribui para a ativação de necroptose.....	74
5.4	Necroptose induzida por FLU e HA promove um perfil de resposta inflamatória exacerbado.....	76
5.5	A ativação de TLR4 por FLU e HA contribuem para uma resposta inflamatória exacerbada.....	77
5.6	A inflamação da necroptose promovida por FLU e HA depende da produção de TNF- $\alpha$ .....	79
5.7	Tratamento anti-TNF- $\alpha$ tem efeito protetor em animais infectados com vírus influenza.....	80
5.8	Tratamento anti-TNF- $\alpha$ previne a formação de infiltrado inflamatório pulmonar.....	81
5.9	Tratamento anti-TNF- $\alpha$ previne a formação de edema pulmonar.....	82
5.10	Tratamento anti-TNF- $\alpha$ previne a formação de um intenso processo inflamatório pulmonar.....	83
5.11	Tratamento anti-TNF- $\alpha$ previne o processo de necroptose em animais infectados com FLU.....	84
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>87</b>

<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>97</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>98</b>
<b>9</b>	<b>ANEXO</b>	<b>114</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Rearranjo e adaptação dos vírus influenza que causaram as pandemias de 1918, 1957, 1968 e 2009.....	21
Figura 1.2 Distribuição dos vírus respiratórios em função das semanas epidemiológicas no Brasil e regiões no ano de 2016.....	25
Figura 1.3 - Esquema representativo do vírus Influenza.....	29
Figura 1.4 - Esquema representativo dos diferentes padrões de glicosilação da HA ao longo do tempo.....	32
Figura 1.5 - As diferentes hemaglutininas e neuraminidases existentes na natureza.....	33
Figura 1.6 - Representação esquemática do ciclo replicativo do vírus influenza A.....	36
Figura 1.7 - Ativação dos receptores TNFR1 e TLRs induzem a necroptose.....	45
Figura 1.8 - Esquema espacial e temporal da cytokine storm na infecção pelo vírus influenza.....	47
Figura 5.1 - FLU e HA induzem o processo de necroptose em macrófagos.....	68
Figura 5.2 - FLU e HA ativam a via da necroptose de maneira dependente de TLR4.....	73
Figura 5.3 - A indução da produção de TNF- $\alpha$ por vírus da Influenza e HA contribui para o estabelecimento da necroptose.....	75

<b>Figura 5.4 - Necroptose induzida por vírus da FLU e HA promove um perfil de resposta inflamatória exacerbado.....</b>	<b>76</b>
<b>Figura 5.5 - A ativação de TLR4 contribui para uma resposta inflamatória exacerbada.....</b>	<b>78</b>
<b>Figura 5.6 - O perfil de resposta inflamatória da necroptose depende da produção de TNF-<math>\alpha</math>.....</b>	<b>79</b>
<b>Figura 5.7 - O tratamento anti-TNF-<math>\alpha</math> tem efeito protetor em animais infectados com vírus influenza.....</b>	<b>80</b>
<b>Figura 5.8 - O tratamento anti-TNF-<math>\alpha</math> previne o processo inflamatório pulmonar.....</b>	<b>81</b>
<b>Figura 5.9 - O tratamento anti-TNF-<math>\alpha</math> previne a formação de edema pulmonar.....</b>	<b>82</b>
<b>Figura 5.10 - O tratamento anti-TNF-<math>\alpha</math> previne o processo inflamatório intenso pulmonar.....</b>	<b>83</b>
<b>Figura 5.11 - O tratamento anti-TNF-<math>\alpha</math> inibe a necroptose.....</b>	<b>86</b>
<b>Figura 6.1 - Representação diagramática da estrutura do Etanercept.....</b>	<b>93</b>

## **LISTA DE TABELAS**

**Tabela 1.1-Pandemias humanas de influenza ocorridas no século XX....20**



## Lista de Abreviaturas

AS	Ácido Siálico
ATP	Adenosina trifosfato
BCA	Ácido Bicinconínico
BSA	Albumina Sérica Bovina
CD	Grupo de diferenciação
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
DAMPs	Padrões Moleculares Associados a Dano
DMEM	Meio de eagle modificado por Dulbecco
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
ELISA	Ensaio Imunoenzimático
FDA	Administração de Alimentos e Medicamentos
FLU	Influenza
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HMGB1	Proteína de Grupo de alta Mobilidade 1
Ig	Imunoglobulina
IL-1	Interleucina-1
IL-6	Interleucina-6
IL-10	Interleucina-10
IFN- $\alpha$	Interferon- $\alpha$
IFN- $\beta$	Interferon- $\beta$
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
HA	Hemaglutinina
KC	Quimiocina Derivada de Queratinócitos
LBA	Lavado Broncoalveolar
LDH	Desidrogenase Láctica
LPA	Lesão Pulmonar Aguda
LPS	Lipopolissacarídeo
L929	Linhagem de Fibroblasto Murino
mAbs	Anticorpos Monoclonais
MCP-1	Proteína Quimiotática de Mononucleares 1
MDCK	Células epiteliais de rim canino
MIP-2	Proteína 2 Inflamatória de Macrófagos

MLKL	Proteína semelhante ao domínio da quinase da linhagem mista
MOI	Multiplicidade de infecção (relação vírus/célula)
MyD88	Proteína adaptadora de diferenciação mielóide 88
NA	Neuraminidase
NF- $\kappa$ B	Fator Nuclear kappa B
NK	Células Natural Killer
NO	Óxido nítrico
NP	Nucleoproteínas virais
NS1	Proteína não estrutural 1
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAMPs	Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PB1	Polimerase básica 1
PB2	Polimerase básica 2
PBMCs	Células Mononucleares do Sangue Periférico
PI	Iodeto de Propídio
PRRs	Receptores de Reconhecimentos de Padrões
RANTES	Quimiocina regulada sob ativação, expressa e secretada por células T normais
RAP	Receptor ativado por proteinase
RIPK1	Proteína quinase serina-treonina 1
RIPK3	Proteína quinase serina-treonina 3
RNPs	Ribonucleoproteínas
RNA	Ácido Ribonucléico
RNAv	Ácido Ribonucléico viral
RPMI	Meio de cultura desenvolvido em Roswell Park Memorial Institute
SEM	Erro Padrão
S1P	O receptor 1 da esfingosina-1-fosfato
TNFR1	Receptor de Fator de Necrose Tumoral
TRADD	Proteína de Domínio Morte Associada a Receptor do Fator de Necrose Tumoral
TRIF	Indutor de Adaptador de Interferon- $\beta$ (TIR)
SARA	Síndrome da Angústia Respiratória Aguda
TLRs	Receptores do tipo Toll
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral- $\alpha$
UTI	Unidade de tratamento intensivo

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Histórico da Influenza

A gripe, doença cujo agente etiológico é o vírus influenza, já vem sendo relatado desde os primórdios da história da humanidade. Embora o rastreamento de epidemias e pandemias seja mais preciso a partir dos últimos 300 anos (Potter, 2001), as primeiras suspeitas de gripe ocorreram por volta do século V a.C. quando Hipócrates relatou casos de uma doença respiratória letal (Nicholson, 1998).

Entretanto, apenas a partir de 1932, quando o vírus foi isolado pela primeira vez é que a infecção pelo vírus influenza pode ser identificada e confirmada laboratorialmente. Antes disso, as infecções só podiam ser identificadas pelos sinais e sintomas conhecidos da doença e pelas características violentas dos surtos (Potter, 2001).

A nomenclatura “Influenza”, no idioma italiano, tem o mesmo significado geral de influência, porém, clinicamente, tornou-se sinônimo de gripe. O termo provém do latim medieval “influentia”, do verbo influo, influere, penetrar. Marcovecchio, em seu “Dizionario etimologico storico dei termini medici” relata que o termo foi utilizado pela primeira vez como termo médico por Matteo Villani em 1358, com base na cultura popular de que se tratava de uma tragédia causada por “influência oculta dos céus” (***ab occulta coeli influentia***) (Marcovecchio, 1993).

A palavra “Gripe” provém do francês *grippe*, vocábulo utilizado desde o século XIII com o sentido de “gancho” ou “garra”. No século XVII, o termo era utilizado com o sentido de “capricho, desejo repentino” e, no século XVIII, passou a denominar “o catarro epidêmico”, em uma extensão do sentido de “capricho”, pois segundo Bloch e Wartburg, a doença foi assim chamada por seu início súbito (Bloch, *et al.*, 1986), como um desejo caprichoso do destino (Ws, 1997). A utilização da palavra gripe como termo médico data de 1743. Para Corominas (1980), entretanto, o termo vincula-se ao suíço-alemão *grüpen*, acocorar-se, tremer de frio, estar mal. Do francês gripe passou para o português em 1881 e para o espanhol em 1897.

Históricamente, temos vários registros de surtos, com certa precisão, principalmente dos últimos 300 anos, entretanto, esses registros se tornam menos precisos à medida que se volta mais no tempo; e a referência a influenza pode ser encontrada nas publicações científicas e leigas desde 1650. Dramática e sistematicamente, ocorrem pandemias de influenza: estas, aparentemente, primeiramente surgem em uma área geográfica específica e isolada, e são transmitidas por todo o mundo infectando milhões de pessoas e causando grande quantidade de mortes. Ao longo da história, temos cerca de 10 prováveis pandemias e três, registradas desde o ano 1590 (Potter, 1998).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2012), o termo “pandemia” se origina do grego que significa “reunião do povo” e foi extrapolado epidemiologicamente para “doença de todo o povo”. Trata-se de uma doença epidêmica que afeta diversos países e que acometendo praticamente toda a população de uma determinada região, estado ou nação. As epidemias são doenças que afetam vários indivíduos de uma determinada população, propagando-se sazonalmente numa determinada região. Estes surtos fazem que o nível de incidência de uma doença supere as expectativas (há mais doentes do que os previstos), e a partir daí, podem evoluir para uma pandemia.

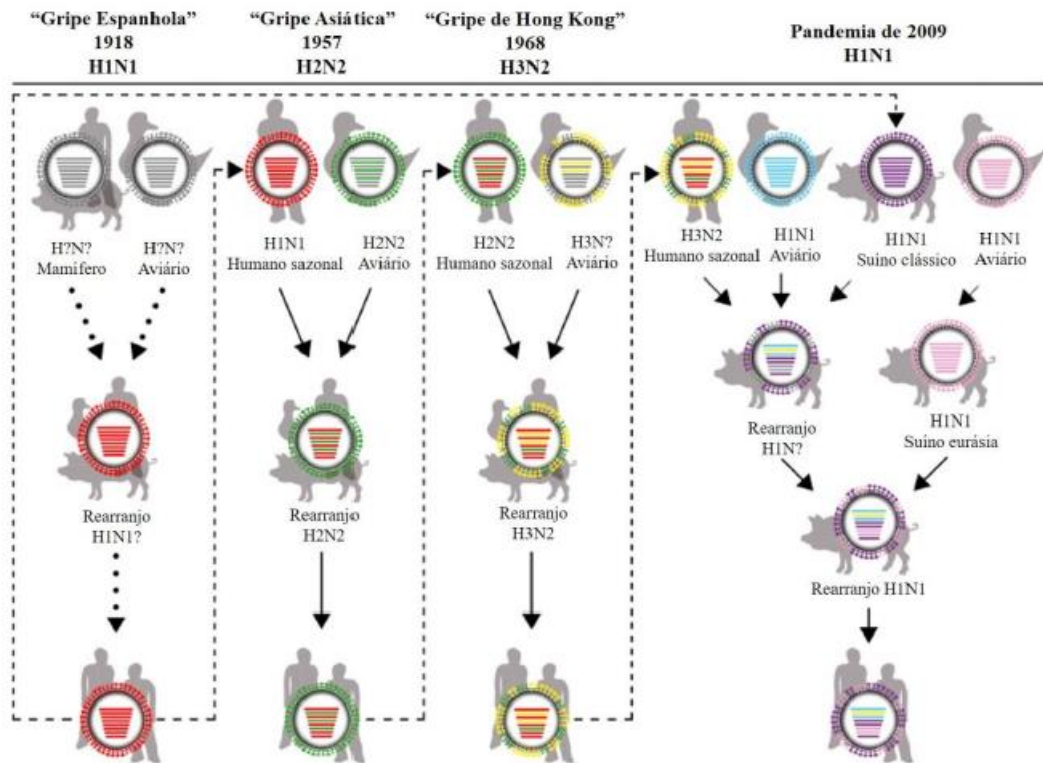
Existem duas condições para que um surto de influenza possa ser classificado como uma pandemia. Em primeiro lugar, o surto de infecção, que surge em uma determinada área geográfica específica, se espalha em todo o mundo; uma alta porcentagem de indivíduos é infectada resultando em altas taxas de mortalidade. Em segundo lugar, é necessário o surgimento de um novo subtipo de vírus influenza A, como por exemplo, uma nova recombinação de hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA) que não está relacionada com os vírus circulantes imediatamente antes do surto (Laver *et al.*, 2000).

Desde o século XVI foram relatadas epidemias e pandemias causadas pelo vírus influenza. No século XX ocorreram três grandes pandemias: nos anos de 1918, 1957 e 1968 e, de menor impacto em 1977 (WHO, 1999). A Tabela 1.1 e a Figura 1.1 resumem as quatro pandemias do século XX, identificando o subtipo viral e a possível origem do vírus influenza A que causou cada uma delas, além do impacto gerado pelas pandemias (WHO, 1999).

**Tabela 1.1 - Pandemias humanas de influenza ocorridas no século XX.**

Ano	Nome	Vírus	Origem	Impacto
1918	“Gripe Espanhola”	H1N1	Recombinação do vírus suíno ou aviário ou adaptação direta do vírus aviário em humanos.	20 a 40 milhões de óbitos.
1957	“Gripe Asiática”	H2N2	Possível recombinação genética do vírus humano (H1N1) e aviário (H2N2).	1 milhão de óbitos. Vírus H1N1 desapareceu.
1968	“Gripe de Hong Kong”	H3N2	Alta probabilidade de recombinação genética do vírus humano (H2N2) e do vírus aviário (H3Nx).	1 milhão de óbitos. Vírus H2N2 desapareceu.
1977	“Gripe Russa”	H1N1	Origem desconhecida, mas o vírus H1N1 é idêntico ao de 1950.	Potencial pandêmico. Envolveu inicialmente pessoas nascidas após 1950. O vírus H1N1 co-circulou com o H3N2.

Fonte: Adaptado de Organização Mundial da Saúde – *Influenza Pandemic Plan* (Who, 1999).



**Figura 1.1 - Rearranjo e adaptação dos vírus influenza que causaram as pandemias de 1918, 1957, 1968 e 2009.**

Humanos, aves e suínos podem ser infectados simultaneamente por vírus influenza de diferentes cepas do gênero A. Este fato, combinado ao genoma segmentado do vírus influenza, pode levar ao rearranjo gênico e o surgimento de cepas pandêmicas, como foram os casos dos vírus H1N1 (1918), H2N2 (1957), H3N2 (1968) e H1N1 (2009). Os genes identificados em cinza dentro das partículas virais indicam origem incerta dos segmentos genômicos ou ausência de dados. As setas pontilhadas indicam cenários incertos e, as setas cheias, eventos com evidência científica. As setas tracejadas representam os vírus pandêmicos que circularam de forma sazonal posteriormente a pandemia. Fonte: Adaptado de Schrauwen, EJA. *et al.*, 2015.

A primeira pandemia do século XXI ocorreu em 2009, quando uma nova linhagem do vírus influenza A/H1N surgiu, e ficou conhecido como A(H1N1)pdm09, a famosa “gripe suína”. A circulação deste vírus teve início no México e Canadá, se espalhando da América do Norte/Central para todo o mundo de forma extremamente rápida (CDC, 2010).

Este novo vírus foi o resultado de um rearranjo entre dois genes derivados da linhagem aviária norte-americana (PA e PB2), um gene da linhagem sazonal de

H3N2 (PB1), três genes da linhagem suína clássica norte-americana (HA, NP e NS) e dois genes da linhagem suína euro-asiática (NA e M) (Figura 1.1) (Ha et al., 2011). Este vírus teve alta transmissibilidade entre humanos, afetando 74 países, de forma endêmica, entre 2009 e 2010 (Belshe, 2009). O Centro de Controle de Doenças dos Estados Unidos (CDC – sigla em inglês para Center of Disease Control) estimou que entre 43 e 89 milhões de pessoas foram infectadas pelo vírus A(H1N1)pdm09, de oito a 18 mil óbitos de Abril de 2009 a Abril de 2010 (Flu.Gov, 2011). No Brasil, em 2009, foram notificados cerca de 105 mil casos de influenza, e se registraram 2.051 óbitos, já em 2010, graças a medidas preventivas, e a campanha de vacinação, o número caiu para 100 mortes (Rosseto & Luna, 2016).

A OMS declarou o fim da pandemia em Agosto de 2010, e a partir daí, o vírus A(H1N1)pdm09 passou a co-circular na população juntamente com o H3N2, tornando-se portanto, um influenza sazonal, e por devido a isso, foi incluído nas vacinas de 2010 a 2016 (WHO, 2009a; 2010a; b; 2011; 2012a; 2013a; 2014c; 2015a). É interessante ressaltar, que a cepa do vírus influenza A(H1N1)pdm09 que tem circulado desde 2009 (A/California/7/2009), foi modificada pela primeira vez nos últimos sete anos. Portanto, na campanha de vacinação anual de 2017, ocorreu uma mudança para a cepa A/Michigan/45/2015 (Saúde, M. D., 2017b).

Além das quatro pandemias dos séculos XX e XXI, também se registrou algumas ameaças de pandemias. No ano de 1976, o primeiro surto registrado de gripe suína provocou pânico nos Estados Unidos, onde soldados de uma base militar de Nova Jersey foram infectados, com um óbito. Em 1977, na China, um novo vírus foi detectado e se espalhou muito rapidamente tornando-se uma epidemia mundial. Este fato não foi considerado como pandemia porque a maioria das pessoas infectadas eram crianças (Flu.Gov, 2011).

Em 1996, surge um novo vírus influenza aviário H5N1 extremamente infeccioso, que foi isolado de alguns gansos na província de Guangdong na China. Em 1997, foi detectado um surto deste mesmo subtipo em aves domésticas em Hong Kong e, neste mesmo ano, foram reportados 18 casos de infecção em seres humanos, sendo seis casos fatais, confirmando o rompimento da barreira animal-humano. Em 2013, na Ásia, houve um aumento significativo de surtos causados pelo vírus H5N1 altamente patogênico (WHO, 2015b). De acordo com o último reporte da

OMS, de 2013 a maio de 2017, 859 casos de infecção foram confirmados em laboratório incluindo 453 mortes em 16 países asiáticos (WHO, 2017a).

Em 2013, foi detectada pela primeira vez a infecção de seres humanos com o vírus influenza aviário A(H7N9). Foram confirmados 132 casos na China. A maioria dos casos foi considerada grave e houve 37 óbitos. O vírus H7N9 ainda é pouco conhecido com relação aos seus 5 reservatórios e sua capacidade de transmissão de aves para humanos e entre humanos, porém, por ser um vírus altamente patogênico, a OMS recomenda que os países se mantenham em alerta para uma possível circulação maciça desse subtipo viral (WHO, 2013b).

Em 2014, o número de casos detectados teve um aumento: 454 casos de infecção em humanos pelo vírus A(H7N9) foram reportados em toda a China, sendo importados para Hong Kong, Taiwan e Malásia (Blachere et al., 2007). Desde 2015 até último boletim liberado pela OMS (maio de 2017), dados epidemiológicos mostram que o número de novos casos de infecção em humanos pelo vírus H7N9 e sua distribuição geográfica continua aumentando, enfatizando a necessidade de intensa vigilância e medidas de controle tanto em humanos como em animais. Porém, a sustentabilidade de infecção entre humanos não foi comprovada e, por isso, o risco de espalhamento pela comunidade é pequeno (WHO, 2017a).

Um terceiro subtipo de vírus influenza aviário A(H9N2) segue circulando na China, porém, esse subtipo viral causa doença leve em seres humanos. Sua situação epidemiológica segue sendo monitorada pela OMS, embora até o momento não tenham sido reportados clusters de casos e esse vírus não tenha adquirido a capacidade de transmissão entre humanos (WHO, 2017a).

## **1.2 Epidemiologia**

Os vírus influenza são os principais agentes responsáveis pelas infecções respiratórias agudas que, apesar de geralmente autolimitadas, constituem uma das principais causas de morbidade e mortalidade. Essas infecções ocorrem por todo o globo, sob a forma de surtos localizados ou regionais, mas podem progredir para casos de epidemias ou pandemias associadas aos subtipos do vírus influenza A (WHO, 2017b).

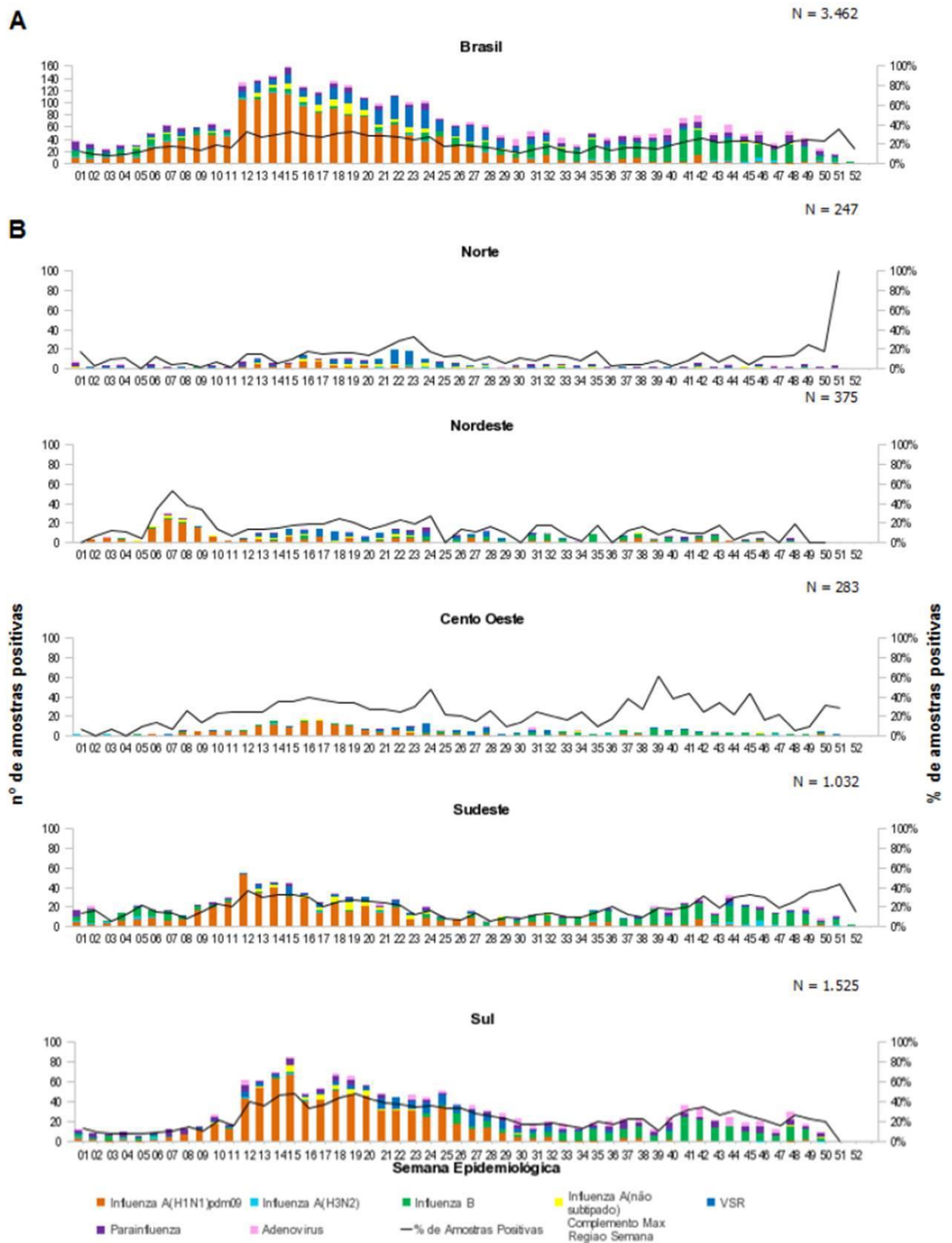


As infecções agudas do trato respiratório provocadas pelos vírus influenza, podem se manifestar sob diferentes formas clínicas. O período de incubação pode variar de 24 horas até quatro dias, dependendo da carga viral e do estado imunológico do hospedeiro. A transmissibilidade em adultos ocorre principalmente 24 horas antes do início dos sintomas e dura até três dias após o final da febre. Nas crianças pode durar em média dez dias, podendo se prolongar por mais tempo em pacientes imunossuprimidos (Souza *et al.*, 2010; Saúde, 2015).

Normalmente, os primeiros sintomas da infecção pelo vírus influenza se iniciam de dois a três dias após a infecção. Entre eles estão calafrios, cefaleia e tosse seca, seguidos de febre entre 38 e 40°C. Além disso, os pacientes infectados podem apresentar mialgia generalizada, prostração intensa, fadiga, anorexia, dor de garganta, coriza e congestão nasal, sendo os três últimos sintomas associados à liberação de produtos celulares e virais e a uma resposta imunológica à lesão tecidual. Geralmente, a evolução da infecção tem resolução espontânea em sete dias, mas a tosse e a prostração podem persistir por uma ou duas semanas adicionais, o que caracteriza a alta taxa de morbidade da infecção (Wright *et al.*, 2007). Alguns casos podem evoluir para complicações como pneumonia primária por influenza, pneumonia secundária bacteriana ou por outros vírus, sinusite, otite, desidratação e piora de doenças crônicas (Saúde, M. D., 2015).

Globalmente, segundo a OMS, há a ocorrência de dois a cinco milhões de casos graves e de 250 a 500 mil óbitos anualmente e apontam que as taxas de infecção global anual são de 5-10% em adultos e de 20-30% em crianças (WHO, 2014a).

As infecções pelo vírus influenza apresentam um padrão sazonal definido, ocorrendo surtos principalmente durante o período de inverno. Desta maneira, os surtos epidêmicos nos hemisférios Norte e Sul ocorrem em períodos do ano diferentes (WHO, 2017b). No Brasil (Figura 1.4), devido à grande diversidade climática, são observados diferentes padrões de sazonalidade, cujo o pico da epidemia no Norte do país costuma ocorrer cerca de três meses antes (março-abril) daquele observado na região Sul (Saúde, M. D., 2017a).



**Figura 1.2 - Distribuição dos vírus respiratórios em função das semanas epidemiológicas no Brasil (A) e regiões (B) no ano de 2016.**

Fonte: Sistemas de Informações da Vigilância em Saúde e Análise de Situação de Saúde (SIVEP) – Gripe (janeiro de 2017) (Saúde, M. D., 2017b).

A vigilância da circulação dos vírus influenza no Brasil é dividida em duas vertentes bem definidas: a vigilância sentinela de Síndrome Gripal (SG) junto com a vigilância sentinela de Síndrome Respiratória Aguda Grave (SRAG) em pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) e pela vigilância universal de SRAG. Os objetivos dessa forma de vigilância incluem identificar e caracterizar os vírus circulantes em um determinado período, o que caracteriza uma informação crucial para composição da vacina anual. A vigilância sentinela conta com uma rede de unidades distribuídas em todas as regiões do país, o que permite o monitoramento da demanda de atendimento por essa doença. A vigilância universal de SRAG monitora os casos hospitalizados e óbitos com o objetivo de identificar o comportamento da influenza no país para orientar na tomada de decisão em situações que requeiram novos posicionamentos do Ministério da Saúde e Secretarias de Saúde Estaduais e Municipais (Saúde, M. D., 2017a).

As infecções causadas pelos vírus influenza são infecções agudas do trato respiratório inferior cujos principais sintomas (febre, coriza, tosse, dor de cabeça e no corpo e inflamação das vias aéreas superiores) duram geralmente de 7 a 10 dias, o que caracteriza a SG. Na SRAG, o indivíduo infectado é hospitalizado com febre, acompanhada de tosse ou dor de garganta e que apresente dispneia. Além disso, podem ser observados os seguintes sinais: saturação de O<sub>2</sub> menor que 95% ou desconforto respiratório ou aumento da frequência respiratória. A vigilância universal de SRAG monitora os casos hospitalizados (Saúde, M. D., 2017b).

É importante ressaltar que as altas taxas de infecção e complicações causadas pelos vírus influenza ocorrem principalmente entre os indivíduos pertencentes aos grupos de risco, como os indivíduos com algum tipo de imunocomprometimento como câncer, HIV positivos (vírus da imunodeficiência humana, ou, do inglês, *human immunodeficiency virus*) e submetidos a transplante de órgãos. Este grupo de pacientes geralmente apresenta os sinais e sintomas clínicos de infecção do trato respiratório superior, porém, sintomas sistêmicos como febre, mialgia e fadiga são ausentes (Casper *et al.*, 2010; Memoli *et al.*, 2014).

A infecção muitas vezes progride para o trato respiratório inferior, gerando danos pulmonares, pneumonia entre 70-80% dos indivíduos imunocomprometidos e

mortalidade acima de 30%. Isto leva a maiores índices de hospitalização, necessidade de cuidado intensivo e ventilação mecânica quando comparado aos indivíduos imunocompetentes (Saúde, 2015). Além disso, como este grupo pode apresentar períodos prolongados de excreção viral, muitas vezes associados à uma co-infecção viral simultânea de dois subtipos virais e, por consequência, o *shift* genético, e/ou, o *drift* antigênico, o que pode acarrear no desenvolvimento de resistência antiviral; sendo considerada uma fonte importante de propagação comunitária destas cepas virais (Souza *et al.*, 2010).

Recentemente, nos Estados Unidos, 47 mil casos de gripe foram confirmados neste início de inverno (2018), onde se espalhou por 49 dos 50 estados americanos neste inverno, e se tornou uma epidemia. O Departamento de Controle de Doenças (CDC) dos Estados Unidos confirmou que o número de pessoas infectadas pelo vírus H3N2 cresce rapidamente em todo o país e já matou 759 pessoas, segundo o último relatório (CDC, 2018).

### **1.3 Vacinação**

Como as infecções por vírus influenza apresentam um padrão sazonal e disseminam-se principalmente durante o período de inverno, torna-se possível a sua prevenção através da vacinação da população anualmente. A vacina é um método de prevenção seguro e tem grande impacto na epidemia sazonal de influenza, e consequentemente impacta positivamente na saúde pública.

Atualmente a vacina contra influenza é trivalente, composta basicamente por hemaglutininas dos diferentes tipos de Influenza circulantes, H1N1, H3N2 e FluB. Em 2016 as cepas que compunham a vacina eram A/California/7/2009 (H1N1), A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2), e B/Brisbane/60/2008. Em 2017, devido as informações geradas pela vigilância das cepas circulantes, o subtipo H1N1pdm, que permanecia o mesmo desde seu aparecimento em 2009, foi modificado e a cepa que compõe a nova vacina é A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 (Saúde Md, 2017). No Brasil, a vacina é gratuitamente oferecida para grupos especiais que inclui idosos, gestantes, crianças menores de 5 anos, profissionais da saúde e indivíduos com doenças crônicas não transmissíveis, imunocomprometidos e outras condições clínicas especiais.

Uma das grandes dificuldades no processo de produção das vacinas para o vírus influenza é o fato da HA apresentar uma grande variabilidade genética. Mutações na HA são a peça chave para a emergência de novas variantes virais e escape do sistema imunológico do hospedeiro (Wiley e Skehel, 1987). Desta maneira, os anticorpos produzidos contra uma determinada sequência de HA, desenvolvidos em exposições anteriores como infecção natural ou vacinação, não são capazes de neutralizar os epítomos de uma linhagem variante, mesmo se produzidos em altos títulos (Carrat e Flahault, 2007). Esse fato explica também a necessidade de revisão anual da composição das vacinas sazonais. Portanto, é de grande interesse o desenvolvimento de novos anticorpos amplamente neutralizantes (do inglês *new broadly neutralizing antibodies* – nbnAb) que reconhecem regiões altamente conservadas da HA para serem utilizados como estratégias de vacinação ou tratamento contra os vírus influenza (Laursen e Wilson, 2013).

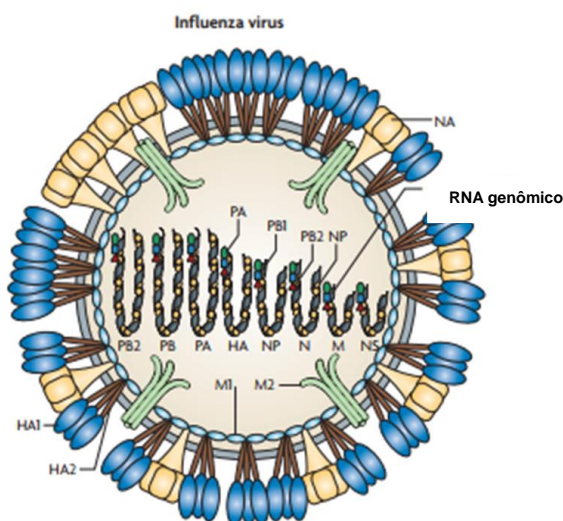
## **1.4 O vírus Influenza**

### **1.4.1 Caracterização viral**

O vírus influenza faz parte da família Orthomyxoviridae gênero *Influenzavirus* (Murphy & Webster, 1996) e apresentam quatro gêneros distintos: Influenzavirus A, B, C e D, com tamanho de 80-120 nm de diâmetro e apresentam capsídeo proteico com simetria helicoidal de aproximadamente 100 nm de diâmetro. São constituídos de 0,8 a 1% de RNA, 70% de proteína, 20% de lipídeos e 5 a 9% de carboidratos (Abbas & Lichtman, 2008). O gênero D foi descrito recentemente no sudeste da China e está associado a doenças respiratórias principalmente em bovinos e suínos.

Enquanto o tipo A possui uma extensa variedade de hospedeiros, os gêneros B e C são isolados predominantemente de humanos. Os vírus influenza A, como por exemplo, o vírus A(H1N1)pdm09, responsável pela pandemia de 2009, estão associados aos surtos epidêmicos sazonais e a pandemias, enquanto o gênero B causa epidemias periódicas e o gênero C endemias e doenças respiratórias leves (Taubenberger & Morens, 2008).

A característica geral dos 5 gêneros é a apresentação do genoma na forma de RNA fita simples, segmentado com polaridade negativa (Palese & Shaw, 2007). O vírus influenza A é envelopado (Figura 1.2) e apresentam em seu envoltório lipídico duas glicoproteínas extremamente importantes, a hemaglutinina (HA) e a neuraminidase (NA), além da proteína formadora de canal de prótons M2. Abaixo do envelope viral há um arranjo de proteínas de matriz M1, que delimitam a porção interna da partícula viral, conferem rigidez ao envelope, atuam como a força motriz do brotamento viral, além de ancorarem o material genético (Gomez-Puertas *et al.*, 2000). Cada segmento de RNA encontra-se associado a nucleoproteínas virais (NP), e o RNA viral também está associado a um complexo polimerase (formados pelas proteínas PA, PB1 e PB2), que recebem o nome de ribonucleoproteína (RNP) (Mikulasova *et al.*, 2000).



**Figura 1.3 - Esquema representativo do vírus Influenza.**

Inseridas no envelope estão as glicoproteínas HA e NA, além de M2. O genoma do vírus é formado por oito segmentos de RNA fita simples com polaridade negativa. Fonte: adaptado de Karlsson Hedestam *et al.*, 2008.

A NA catalisa a clivagem de resíduos de ácido siálico presentes na membrana plasmática, permitindo a liberação das novas partículas virais formadas. Além disso, a NA também remove o ácido siálico presente nas próprias glicoproteínas virais impedindo a agregação das novas partículas formada durante a replicação. Este processo é importante para a mobilidade dos vírus no trato respiratório (Von Itzstein, 2007).

Abaixo do envelope viral há um arranjo de proteínas de matriz M1, que delimitam a porção interna da partícula viral, conferem rigidez ao envelope e atuam como a força motriz do brotamento viral (Gomez-Puertas *et al.*, 2000). Além disso, as proteínas M1 ancoram o material genético internamente ao envelope lipídico, que é fragmentado em oito segmentos de RNA de fita simples negativa.

As moléculas de RNA nunca se encontram desnudas dentro das partículas virais ou das células infectadas. Cada segmento encontra-se associado a um número nucleoproteínas virais (NP), dependendo do comprimento do RNA viral (RNAv), e forma uma estrutura no qual RNAv enovela-se adquirindo uma forma helicoidal. Além das NPs, o RNAv também está associado a um complexo polimerase, e este conjunto recebe o nome de ribonucleoproteína (RNP) (Mikulášová *et al.*, 2000).

#### **1.4.1.1. Hemaglutinina**

A hemaglutinina é transcrita pelo quarto segmento gênico dos vírus com aproximadamente 1778 nucleotídeos, o qual codifica uma proteína composta por 550 aminoácidos (Knipe & Howley, 2007).

Encontra-se inserida no envelope viral na forma trimérica. Sua síntese ocorre no retículo endoplasmático, e seu processamento envolve a adição de açúcares (glicosilação) e ácidos graxos, além da clivagem do precursor HA0 por proteases celulares em duas subunidades monoméricas HA1 e HA2 que permanecem unidas por pontes dissulfeto (o que é importante na patogenicidade do vírus) (Gamblin & Skehel, 2010). A subunidade HA1 é a extremidade amínica e hidrofílica, onde ocorrem as glicosilações, e nela estão localizados os domínios de ligação aos receptores celulares e os cinco sítios antigênicos (Sriwilaijaroen & Suzuki, 2012). A subunidade HA2, parte hidrofóbica da HA, constitui a maior parte da haste contendo o domínio fusogênico, que atua na fusão do envelope viral com a membrana endossomal durante o ciclo replicativo (Bouvier & Palese, 2008; Sriwilaijaroen & Suzuki, 2012).

Devido a sua função na adsorção viral, a HA tornou-se um dos principais alvos para desenvolvimento de antivirais. A HA é o principal componente antigênico da vacina anual e a proteína viral para qual os anticorpos neutralizantes do hospedeiro são dirigidos, e conseqüentemente apresenta uma grande variabilidade

genética (Kim & Park, 2012). Essas mutações na HA têm papel fundamental na emergência de novas variantes virais, o que justifica a necessidade de revisão anual da composição da vacina sazonal, além da importância dos estudos dessa proteína como potencial alvo em antivirais e possíveis estratégias antiinflamatórias.

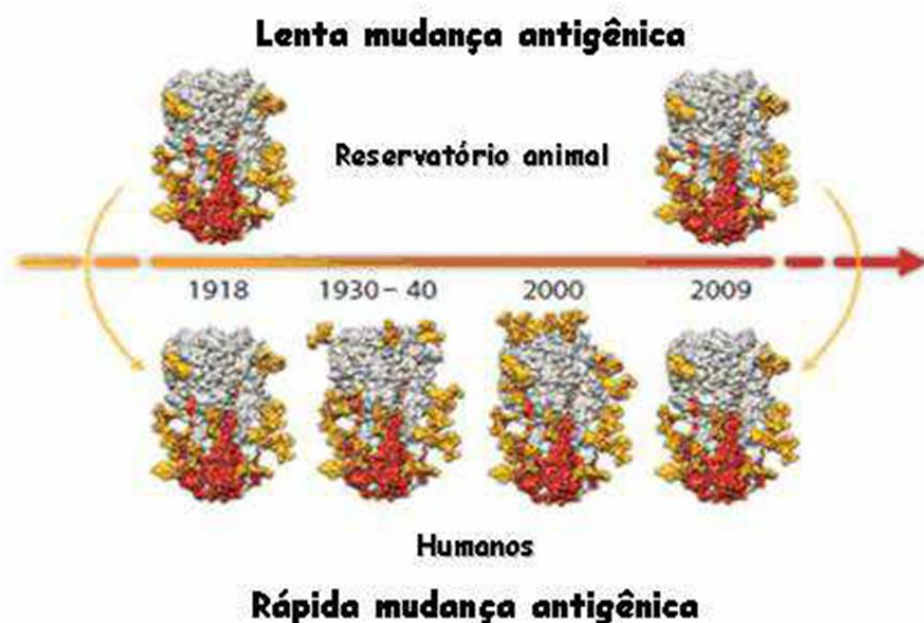
Os vírus da Influenza estão sujeitos a dois tipos de variações antigênicas: o *drift* antigênico, também chamados de variações menores ou pontuais, e o *shift* antigênico, também chamados de variações maiores.

O *drift* antigênico resulta de mutações pontuais inseridas durante a replicação, devido a ação da enzima RNA polimerase viral que apresenta baixa capacidade de reparação gênica durante a replicação viral (McHardy & Adams, 2009). Esse processo permite a seleção de novas variantes contendo alterações nas sequências da HA, assim como na NA. Essas pequenas mudanças são suficientes para alterar a antigenicidade dessas proteínas virais e, assim, superam a imunidade pré-existente em humanos, ou seja, as alterações tornam inespecíficas as ligações aos anticorpos existentes, sendo estas novas cepas responsáveis por uma nova epidemia sazonal (Medina & Garcia-Sastre, 2011).

Já o *shift* antigênico apresenta uma mudança mais drástica na partícula viral, pois resulta de rearranjo de segmentos gênicos de vírus diferentes durante infecção simultânea e pode levar ao surgimento de uma nova variante com potencial pandêmico, como ocorreu em 2009 com o vírus A(H1N1)pdm09 (Smith *et al.*, 2009).

A HA viral foi a principal diferença entre o vírus A (H1N1)pdm09 e o A H1N1 sazonal, que circulou na população humana desde sua reemergência em 1977 até 2009. Além disso, curiosamente houve uma inversão de faixa etária mais acometida nesta recente pandemia de H1N1 em 2009, onde os adultos jovens foram os mais atingidos (Dawood *et al.*, 2009). Tal inversão na faixa etária seria resultado da falta de anticorpos contra esta nova cepa que apresenta menor taxa de glicosilação da HA entre adultos jovens, já que indivíduos com idade superior a 60 anos poderiam apresentar imunidade cruzada adquirida por possível exposição a variantes similares que circularam entre 1940 e 1950 (Settembre *et al.*, 2010) (Figura 1.3). ]





**Figura 1.4 - Esquema representativo dos diferentes padrões de glicosilação da HA ao longo do tempo.**

Pode-se observar que o padrão de glicosilação da HA do vírus que circulou em 2009 era mais próximo do vírus que circulou em 1918. Essa semelhança pode ter proporcionado reação cruzada da resposta imune e talvez por isso a infecção não tenha afetado o grupo de idosos, como nos anos anteriores. Fonte: adaptado de Settembre *et al.*, 2010.

## 1.5 Classificação viral

Por convenção internacional, os vírus influenza A são divididos em subtipos de acordo com a combinação das suas principais glicoproteínas de superfície, a HA e a NA (Murphy & Webster, 1996). A figura 1.3 demonstra os 18 tipos de HA (H1 a H18) e 11 tipos de NA (N1 a N11), encontrados em diferentes espécies animais até o momento (Webster & Govorkova, 2014). Estes números levam a 198 possíveis combinações de HA e NA, porém, nem todas são viáveis na natureza e algumas geram subtipos virais restritos a alguns hospedeiros (Cardona *et al.*, 2009).

Hemaglutinina					Neuraminidase				
Subtipo	Humanos	Aves	Porcos	Morcegos/outros	Subtipo	Humanos	Aves	Porcos	Morcegos/outros
H1					N1				
H2					N2				
H3				Outros animais	N3				
H4				Outros animais	N4				
H5					N5				
H6					N6				
H7				Outros animais	N7				Outros animais
H8					N8				Outros animais
H9					N9				
H10					N10				
H11					N11				
H12									
H13									
H14									
H15									
H16									
H17									
H18									

**Figura 1.5 - As diferentes hemaglutininas e neuraminidasas existentes na natureza.**

Podemos observar na figura os 18 subtipos de hemaglutininas e 11 subtipos de neuraminidase descritos e seus diferentes hospedeiros. Fonte: adaptado de [www.cdc.gov/flu/about/viruses/transmission.htm](http://www.cdc.gov/flu/about/viruses/transmission.htm).

Os tipos são divididos em dois grupos filogenéticos devido a suas diferenças antigênicas: grupo 1 (H1, H2, H5, H6, H8, H9, H11–H13, H16-H18) e grupo 2 (H3, H4, H7, H10, H14 e H15) (Webster e Govorkova, 2014). Vírus contendo três subtipos de HA adquiriram a habilidade de serem transmitidos eficientemente entre humanos (H1, H2 e H3), embora, atualmente circulam sazonalmente os subtipos contendo as HAs tipo 1 e 3 (Schrauwen *et al.*, 2014).

É importante mencionar que outros subtipos de HA, como H5, H6, H7 e H9, podem ocasionalmente acometer seres humanos e são considerados possíveis ameaças para uma futura pandemia (Beigel *et al.*, 2005; Gao *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2014; Shen *et al.*, 2015).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, a nomenclatura dos vírus Influenza é representada pelo gênero do vírus ao qual pertence (A, B, C ou D), o local de isolamento (cidade ou país), número da amostra do laboratório, ano de isolamento e, o subtipo de HA e NA.

Por exemplo, o vírus responsável pela pandemia de 2009 foi nomeado como A/Califórnia/07/2009(H1N1). No caso dos vírus influenza B, eles não apresentam subtipos de HA e NA, este gênero é constituído por duas linhagens principais (Yamagata e Victoria). Assim, a nomenclatura adotada para o vírus influenza B descreve apenas o gênero, local de detecção, número de origem e ano, por exemplo: B/Florida/4/2006. No caso de isolamento de amostra animal, a espécie é escrita logo após o gênero, por exemplo: A/duck/Alberta/35/76(H1N1) para vírus isolado de pato (CDC, 2017).

## **1.6 Ciclo Replicativo**

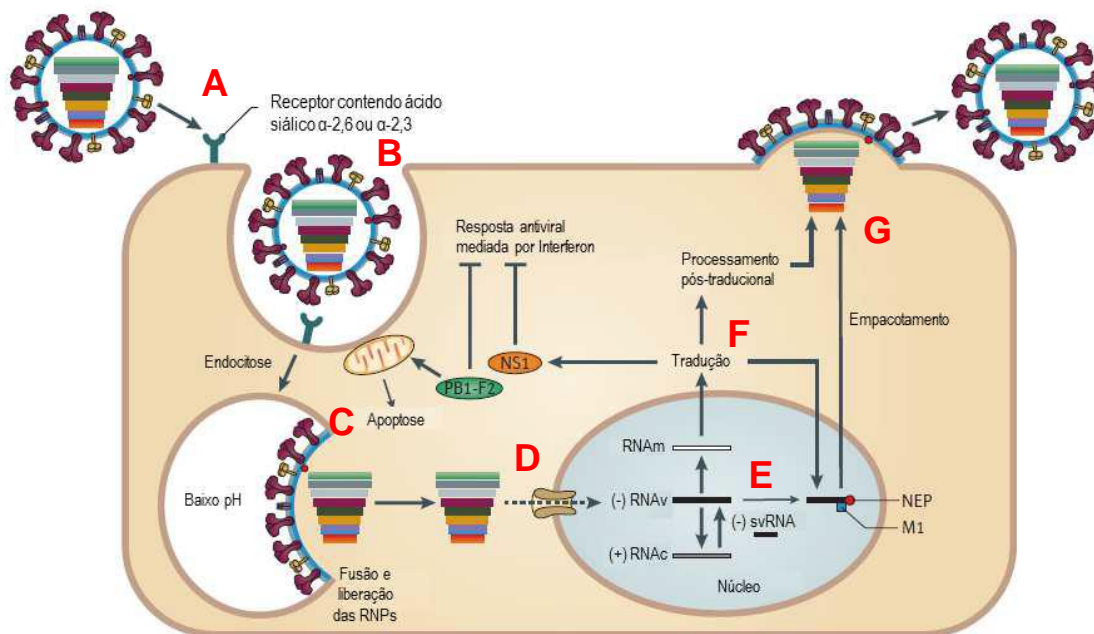
O principal alvo da infecção pelos vírus influenza em humanos são as células epiteliais ciliadas do trato respiratório superior e inferior. Estas células apresentam grandes quantidades de resíduos de ácido siálico (AS), nas suas membranas plasmáticas (Palese & Shaw, 2007). Esses resíduos de AS presentes nas glicoproteínas e glicolípídios da membrana ficam associados a resíduos de galactose por ligações  $\alpha$ -2,3 ou  $\alpha$ -2,6, que se encontram preferencialmente no trato respiratório superior e inferior, respectivamente (Liu *et al.*, 2010). Essas ligações são reconhecidas de maneira distinta por hemaglutininas de vírus humanos e animais e são críticos na determinação do hospedeiro e no tropismo tecidual. Tanto a HA quanto a NA viral possuem alta afinidade pelo AS (Palese & Shaw, 2007).

O ciclo replicativo do vírus influenza A inicia com a adsorção viral, promovida pela ligação da HA aos resíduos de ácido siálico presentes na superfície celular, culminando com a endocitose (Knipe & Howley, 2007). No endossomo ocorre um processo de acidificação devido ao influxo de prótons H<sup>+</sup>, através dos canais iônicos

formados pela proteína M2 (Kollerova & Betakova, 2006). O baixo pH no endossomo (pH entre 5,0 e 6,0) do interior da partícula viral causa uma mudança conformacional na HA, que leva à exposição de seu domínio hidrofóbico contendo o peptídeo de fusão (PF), o que desencadeia a fusão entre o envelope viral e a membrana endossomal, liberando as ribonucleoproteínas (RNPs) virais para o citoplasma (Nayak & Barman, 2004). Os vírus influenza são uma exceção entre os vírus de RNA, pois seu material genético é replicado e transcrito no núcleo celular pelo complexo polimerase (Palese & Shaw, 2007). Assim, uma vez no citoplasma, as RNPs migram para o núcleo celular através da ligação a nucleoporinas. Uma vez no núcleo, o complexo da polimerase viral inicia o processo de transcrição e replicação viral.

Durante a duplicação, é sintetizado o RNA anti-genômico de polaridade positiva (também chamado de RNA complementar), que serve de molde para a síntese das novas fitas de RNA viral. A tradução das novas proteínas virais e montagem dos novos vírions ocorrem no citoplasma da célula (Fodor, 2013).

As RNPs recém-sintetizadas são exportadas do núcleo para o local de montagem no citoplasma, então protegidas pela proteína M1 migram até a membrana celular, onde são recobertos por um envelope lipídico contendo as glicoproteínas da superfície virais HA e NA e a proteína M2. A NA é responsável pela liberação da partícula viral recém-sintetizada, pois cliva o AS da superfície celular, impedindo assim retenção na superfície da célula devido à interação com a HA da superfície viral (Nayak & Barman, 2004). As etapas do ciclo replicativo do vírus influenza. A encontram-se esquematicamente apresentadas na figura 1.8 (Das *et al.*, 2010).



**Figura 1.6 - Representação esquemática do ciclo replicativo do vírus influenza A.**

A HA se liga aos resíduos de AS presentes na superfície da célula hospedeira (A), e o vírus sofre o processo de endocitose (B). A alteração do pH no interior do endossomo promove a liberação das RNPs para o citoplasma (C), que são transportadas para o núcleo (D), onde ocorrerá a transcrição e replicação dos RNAs do vírus (E). Esses RNAs são transportados para o citoplasma, onde ocorre a tradução das proteínas virais (F) e os novos vírus montados são liberados por brotamento devido a ação da NA (G). Fonte: adaptado de Medina *et al.*, 2011.

## 1.7 Fisiopatologia do vírus influenza

A susceptibilidade ou a resistência a infecções virais dependem de diversos fatores, tanto dos vírus, quanto dos hospedeiros. No que diz respeito ao vírus influenza, esses fatores são: sua virulência, capacidade de entrada, replicação e lise das células do epitélio respiratório; e quanto aos fatores associados ao hospedeiro, podemos citar a eficácia da resposta imunológica e agressividade do sistema imune contra o agente infeccioso, que pode seguir para duas vertentes diferentes: a resolução da infecção ou um processo exacerbação da infecção (Mesquita *et al.*, 2014).

O entendimento em relação a essas diferentes respostas imunes (resolução ou exacerbação), em relação ao vírus influenza pode ser a chave para o

desenvolvimento de estratégias mais eficazes de controle da doença. Em relação ao vírus, essas respostas imunes mais agressivas já foram correlacionadas com maior morbidade e piores desfechos clínicos durante as pandemias de 1918 e 2009, e em humanos infectados com o vírus aviário H5N1 (Teijaro, 2015).

A transmissão do vírus influenza ocorre pela inalação de partículas virais oriundas de gotículas da tosse e do espirro ou pelo modo indireto, quando as mãos entram em contato com superfícies contaminadas por secreções e são levadas em contato com as mucosas nasal, oral ou ocular. Após vencer as primeiras barreiras físicas imposta pela mucosa do epitélio respiratório, os vírus podem penetrar nas células do trato respiratório superior e inferior, onde ocorrerá a replicação. Indivíduos saudáveis podem transmitir o vírus de 24 a 48 h antes do início dos sintomas até entre cinco e dez dias pós infecção. Entretanto, indivíduos imunocomprometidos podem excretar vírus por semanas ou meses (Leekha *et al.*, 2007; Souza *et al.*, 2010).

O quadro clínico dos casos de influenza não apresenta sintomas específicos, sendo caracterizado por febre, tosse, coriza, cefaleia, congestão nasal, calafrio, dor no corpo e, algumas vezes, diarreia e vômito com evolução clínica geralmente benigna e autolimitada. Ou seja, a maioria dos pacientes recupera-se em uma semana, no entanto podem ser observados casos com acometimento pulmonar de forma grave, principalmente em grupos de risco para complicações da infecção por influenza, levando até a morte (SUS, 2017).

Apesar de não se conhecer exatamente os fatores que contribuem para o estabelecimento deste quadro patológico grave, já foi demonstrado que a infecção pelo vírus da Influenza gera uma persistente e descontrolada resposta imune no tecido pulmonar e pode culminar com Lesão Pulmonar Aguda (LPA) e a Síndrome da Angústia Respiratória Aguda (SARA) (Jones *et al.*, 2005). Trabalhos clássicos da literatura demonstram que o vírus influenza ao infectar e se replicar em células que compõe o epitélio alveolar, geram a apoptose dessas células (Armstrong *at al.*, 2012; Zeng *et al.*, 2012), fenômeno este amplificado pelas citocinas produzidas.

Todos esses eventos contribuem ainda mais para essa morte celular maciça exacerbando a resposta inflamatória, promovendo a quebra desta barreira alvéolo-

vascular, o que permite que novas partículas virais alcancem e infectem as células endoteliais da microvasculatura pulmonar. Entretanto, dados recentes têm mostrado que em várias infecções virais, inclusive infecções pelo vírus Influenza, nem sempre induzem a apoptose, um tipo de morte celular não inflamatória, mas a uma recentemente descrita via de morte celular: necrose programada ou necroptose (Upton *et al.*, 2014; Rodrigue-Gervais *et al.*, 2014; Sridharan & Upton, 2014).

### **1.7.1 Necroptose**

Necroptose é uma via de morte celular que se assemelha em morfologia à necrose clássica. Porém, ao contrário da apoptose, depende de uma via de sinalização mediada por quinases denominadas RIPK1 e RIPK3 e tem como molécula efetora a pseudoquinase MLKL (Schworer *et al.*, 2014). A importância biológica da necroptose parece estar principalmente relacionada a processos patológicos, pois durante o desenvolvimento embrionário, a apoptose aparece como um processo vital no processo de desenvolvimento, enquanto que poucas evidências indicam que a necrose ou a necroptose seria um processo de morte celular que ocorre durante a embriogênese em condições fisiológicas (Kerr *et al.*, 1972).

Apesar da necrose ser tradicionalmente classificada como uma morte celular inflamatória, e não-programada, diversos trabalhos tem demonstrado, em infecções virais, que a necroptose é uma via de morte celular altamente regulada, e que funciona como uma forma de se conter a infecção, eliminando, as células reservatórias desses vírus (Vercammen *et al.*, 1998; Degterev *et al.*, 2005; Galluzzi *et al.*, 2012). Isso se explica pelo fato da necroptose não depender da atividade da caspase, em vez disso, a necroptose é inibida pela ativação da caspase-8 (Holler *et al.*, 2000; Degterev *et al.*, 2005). Como a inibição da caspase-8 é um mecanismo de evasão viral da resposta imune com o objetivo de prevenir a apoptose (Mocarski *et al.*, 2015), a capacidade de inibição da caspase-8 em células para induzir necroptose fornece um importante mecanismo de restrição da replicação viral (Orzalli & Kagan, 2017).

Apesar da diferença clara entre a apoptose e a necroptose, diversos trabalhos já têm descrito que os mecanismos efetores entre essas duas formas de morte celular, possuem vias de sinalização em comum, o que torna tão complexo a identificação exata e precisa da cascata de reações que levam ou a apoptose ou a necroptose (Zhang *et al.*, 2009). Entretanto, apesar da existente lacuna no conhecimento dessa via de ativação de morte celular, trabalhos tem demonstrado que a necroptose é dependente da ativação das proteínas quinases de interação a receptores 1 e 3 (RIPK1 e RIPK3, respectivamente) (Cho *et al.*, 2009; Upton *et al.*, 2010; Moriwaki & Chan, 2014).

A necroptose, assim como a apoptose, pode ser ativada tanto extrinsecamente quanto intrinsecamente. De uma forma geral, um estímulo extrínseco, como o Fator de Necrose Tumoral (TNF- $\alpha$ ), através de seu receptor específico (TNFR1) inicializa a sinalização com o recrutamento do domínio de morte associada ao receptor do TNF (TRADD), que por sua vez, recruta RIPK1. Uma vez que as caspase estão inibidas, RIPK1 e RIPK3 formam um dímero e se fosforilam, levando à formação de um complexo de microfilamentos, chamado o necrossomo (He *et al.*, 2009; Linkermann *et al.*, 2012; VandenBerghe *et al.*, 2014).

O necrossomo ativa e fosforila uma proteína pró-necroptótica chamada de MLKL. RIPK3 se liga a um trímero de proteínas MLKL e aciona o fenótipo necrose, fundindo as membranas das organelas com a membrana plasmática, e além disso, forma poros na membrana induzindo a lise celular, o que culmina com liberação de diversos fatores encontrados no conteúdo citoplasmático no espaço extracelular como IL-1 $\alpha$ , HMGB1, ácido úrico, ATP and DNA (Kaczmarek *et al.*, 2013; Su *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2014). Essa ruptura inflamatória programada gera um crescimento exponencial de liberação desses moleculares associados a danos (DAMP's), o que promove o recrutamento de células imunes ao local da infecção, contribuindo, assim, como um alerta ao sistema imune (Vandenabeele *et al.*, 2010). Embora a sinalização TNFR1 esteja normalmente associada à apoptose, este receptor também pode induzem a necroptose em condições de inibição da proteína caspase-8.

Intrinsecamente, a necroptose pode ser iniciada após a infecção viral, através da ativação de receptores citoplasmáticos de morte celular que detectam ácidos



nucleicos ou proteínas virais. Receptores do tipo Toll (TLRs – do inglês Toll like receptores), por exemplo TLR3, TLR7 e TLR9, induzem necroptose após a ligação da molécula viral ao seu receptor específico e inibição da caspase-8. Porém, essa sinalização para necroptose pode ocorrer através de diferentes mecanismos. Por exemplo, apenas os TLRs que dependem em TRIF (ou seja, TLR3) promovem a necroptose através de um mecanismo intrínseco de produção de IFN- $\beta$ , e independente da produção de TNF- $\alpha$  (He *et al.*, 2011; Kaiser *et al.*, 2013). TLRs que sinal através do adaptador MyD88 induz indiretamente a necroptose através da expressão de TNF- $\alpha$  (Kaiser *et al.*, 2013).

Recentemente, alguns trabalhos da literatura têm demonstrado que o processo de necroptose é importante na fisiopatologia da infecção pelo vírus influenza, sendo, inclusive, um fenômeno importante no controle da infecção e no aumento de sobrevivência em modelos murinos *in vivo* (Nogusa *et al.*, 2016). Entretanto outros trabalhos demonstram que apesar da necroptose funcionar como forma de controle da infecção viral, por outro lado também contribui para um aumento significativo dos danos gerados pela infecção (Clancy & Martin, 2016; Thapa *et al.*, 2016). Além disso, Kuriakose e colaboradores (2016), demonstraram que a inibição do processo de necroptose foi capaz de diminuir a mortalidade após infecção letal com vírus Influenza A (A/PR 8/34 (H1N1) – PR8).

O exposto anteriormente torna claro que a necroptose é importante na gripe, entretanto os relatos da literatura são conflitantes e escassos, sendo necessário mais investigações para uma compreensão dos mecanismos envolvidos na tríade influenza X necroptose X resposta imune. Inclusive, nenhum desses trabalhos deixa claro quais mecanismos de disparo do processo de necroptose pode levar a um desfecho benéfico ou deletério para o hospedeiro. Mas nesses mecanismos de disparos, podemos citar a importância dos receptores do tipo Toll.

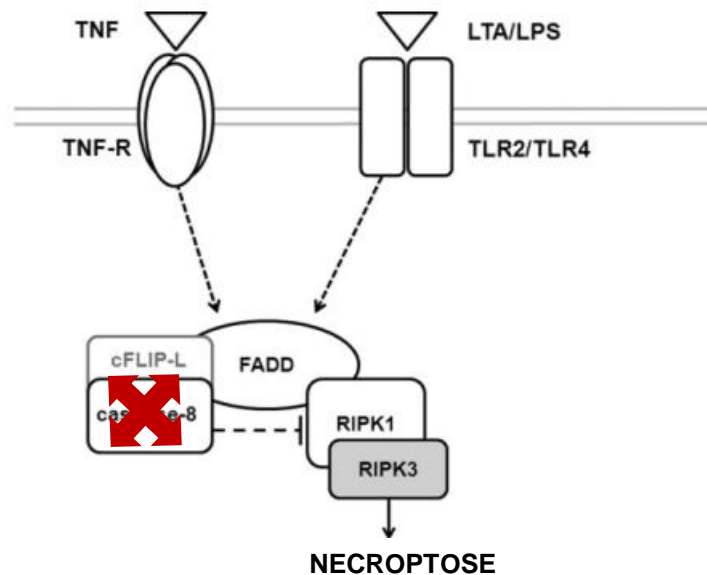
#### **1.7.1.1 Receptores do tipo Toll e Necroptose**

A imunidade inata é a primeira linha de defesa contra as infecções e seus mecanismos são rapidamente ativados pelos microrganismos antes do desenvolvimento de anticorpos específicos. É bem descrito que tanto moléculas protéicas quanto RNAs virais podem ser reconhecidos pelas células infectadas como

padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) por numerosos receptores de reconhecimento de patógenos (PRRs), que por sua vez podem promover uma cascata de sinalizações extracelular, que culminam com a produção exacerbada de citocinas e morte celular (Guo & Thomas, 2017). Dentro desse contexto, alguns estudos sugerem que produtos estruturais do vírus influenza podem ativar os TLRs (Trinchieri *et al.*, 2007).

Os TLRs são sensores fundamentais do sistema imune inato, sendo os primeiros e mais bem caracterizados receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) identificados em mamíferos (Lemaitre *et al.*, 1996; Takeda *et al.*, 2003; Lester & Li, 2014). Eles iniciam respostas inflamatórias chave contribuem para a formação da imunidade adaptativa. Todos os TLR's (10 em seres humanos e 11 em camundongos) são proteínas transmembranares de tipo I caracterizadas por um domínio extracelular rico em leucina e uma cauda citoplasmática. Eles reconhecem diversos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) de bactérias, fungos, parasitas e vírus, incluindo componentes de paredes celulares bacterianas baseadas em lipídios, tais como lipopolisacarídeos (LPS) e lipopéptidos, componentes de proteínas microbianas tais como flagelina e ácidos nucleicos, tais como solteiros - ARN de cadeia dupla ou de cadeia dupla e DNA de CpG. Eles também reagem a certos padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) das células endógenas e do meio ambiente (Takeda *et al.*, 2003).

Em resposta à infecção viral, o hospedeiro lança rapidamente uma resposta imune inata caracterizada pelo envolvimento dos TLRs e outras classes de PRRs com PAMPs virais, tais como ácidos nucleicos virais e proteínas virais, que desencadeiam a ativação de vias de sinalização intracelular distintas essenciais para a indução da resposta imune antiviral de IFN (Mogensen *et al.*, 2001). A indução dessas respostas antivirais compartilha mecanismos reguladores sobrepostos e depende da ativação coordenada dos fatores transcricionais citossólicos latentes, como os fatores reguladores de IFN (IRFs), principalmente IRF3 e IRF7, e o fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B). Além disso, dados publicados revelam que tanto TLR4 e TNF- $\alpha$  podem separadamente ou em conjunto, podem desencadear o processo de necroptose (Ermolaeva *et al.*, 2008) (Figura 1.7).



**Figura 1.7 – Ativação dos receptores TNFR1 e TLRs induzem a necroptose.**

A ativação do TNFR1 e de TLRs é conhecida por induzir a formação de um "complexo I" que medeia a ativação de NF- $\kappa$ B. A formação do complexo I pode ser seguida pela formação no citosol do "complexo II", onde a caspase-8 no complexo com cFLIP-L suprime a atividade necroptótica de RIPK1. A inibição da caspase-8 resulta na ativação de RIPK1 e na formação da necroptose dependente de RIPK3. Fonte: Adaptado de Fricker *et al.*, 2013.

Como citado anteriormente, a necroptose possui duas formas principais de ativação, extrínseca e intrínseca, sendo as duas bem ativas em infecções virais. Entretanto, o mecanismo que causa a ativação da necroptose em resposta ao vírus influenza ainda não está bem compreendido, mas sumarizando, a ativação de TLRs pode ativar a proteína TRIF (Domínio Adaptador de Indutor de Interferon- $\beta$ ), molécula essa que dimeriza com RIPK3, ativando-a e promovendo a ligação desse complexo com a MLKL, uma vez formado esse trimero, o fenótipo de necrose é estabelecido. Além disso, outros trabalhos demonstram que a ativação dos TLRs pode induzir, via RIPK1, a promoção da translocação de NF $\kappa$ B para o núcleo, onde iniciara a ativação de diversos genes pró-inflamatórios, como a produção de TNF- $\alpha$ , que poderá iniciar o processo de necroptose descrita primeiramente nesse trabalho (Kelliher *et al.*, 1998).

Dentro desse contexto, alguns estudos sugerem que vários produtos estruturais do vírus Influenza podem ativar os receptores TLRs (Trinchierie *et al.*,

2007). Dentre esses produtos, podemos ressaltar a hemaglutinina (HA) que é uma proteína extremamente importante para a adsorção viral, apresenta capacidade de ativação de células dendríticas murinas via TLR4 (Liu *et al.*, 2010), apresenta grande importância na patogenicidade do vírus, além de ser a estrutura para a qual os anticorpos neutralizantes do hospedeiro são dirigidos (Kim *et al.*, 2012).

Esses dados expostos até aqui sugerem que há uma grande morte celular na infecção pelo vírus Influenza, evento esse acompanhado pela produção exacerbada de diversas citocinas pró-inflamatórias, dentre elas a mais proeminente é o TNF- $\alpha$ , e que a via de sinalização dos TLR's tem papel crítico nesses eventos, o que pode culminar em um sinergismo para a indução de apoptose, ou seja, ativação de TLRs mais a produção exacerbada de citocinas (cytokine storm) cooperando para esse processo de morte celular.

### **1.7.2 Macrófagos**

Os leucócitos são células derivadas de precursores mielóides na medula óssea, que circulam pelo sangue em estado quiescente de baixa aderência antes de migrarem para um tecido alvo, onde iniciam a resposta imune ou mesmo constituam uma nova população residente fixa (Abbas e cols, 2005). Dentre os diversos tipos de leucócitos, os monócitos são liberados na circulação como células imunes efetoras (Auffray *et al.*, 2009; Geissmann *et al.*, 2010). Neste estágio os monócitos possuem morfologia heterogênea com variedade de tamanho, granulosidade e morfologia nuclear, podendo ser, em alguns casos, confundidos com células polimorfonucleares, e constituem menos de 10% dos leucócitos circulantes em humanos (Gordon & Taylor, 2005), o que em um adulto saudável representa cerca de 450 monócitos/ $\mu$ L (Robbins & Swirski, 2010). Devido a esta variedade morfológica, os monócitos são divididos em subtipos de acordo com as moléculas expressas em sua superfície (fenótipo), o que varia entre monócitos de diferentes espécies (Shi & Pamer, 2011).

Em humanos os monócitos são divididos em dois subtipos de acordo com sua expressão de CD14 (molécula acessória do receptor de LPS) e CD16 (receptores que se ligam à porção Fc de anticorpos IgG - Fc $\gamma$ RIII) (Ziegler-Heitbrock, 2007). O tipo mais abundante em humanos são os monócitos CD14<sup>high</sup>/CD16<sup>-</sup>, também

chamados de clássicos ou inflamatórios, e os monócitos CD14<sup>+</sup>CD16<sup>+</sup> são chamados de residentes (Gordon & Taylor, 2005; Shi & Pamer, 2011). Os monócitos expressam diversas outras moléculas como CD36, importante no reconhecimento e fagocitose de microorganismos (Kzhyshkowska *et al.*, 2016), receptores TLRs (Lee *et al.*, 2013), selectinas e integrinas, que medeiam os processos de migração e adesão dessas células no foco inflamatório, etc. Além disso, quando estimuladas produzem diversas moléculas efetoras envolvidas na defesa do organismo, como o TNF- $\alpha$  (Serbina *et al.*, 2008; Auffray *et al.*, 2009).

Monócitos possuem receptores de adesão que medeiam sua migração para os tecidos, onde se diferenciam em células dendríticas ou macrófagos, seja para formarem uma população fixa ou em resposta a alguma infecção (Abbas *et al.*, 2005; Geissmann *et al.*, 2010; Liddiard *et al.*, 2011; Murray & Wynn, 2011). Macrófagos são células fagocíticas de tecidos linfoides e não linfoides. Estas células exercem diversas funções na resposta imune como regulação da homeostase, fagocitose de patógenos, apresentação de antígenos aos linfócitos e produção de fatores de crescimento (Gordon, 2002; Geissmann *et al.*, 2010). De uma forma geral, os macrófagos detectam e reagem a diferentes tipos de moléculas, patógenos e antígenos, além disso, também respondem a diferentes tipos de desequilíbrios fisiológicos que podem ser uma injúria tecidual ou a uma infecção (Liddiard *et al.*, 2011).

Macrófagos também são dotados de diversos tipos de receptores de reconhecimento de padrão (CD36, TLRs, etc.), que ao reconhecerem a algum tipo de patógeno são ativados e produzem diversos tipos de quimiocinas e citocinas, que irão iniciar a resposta imune inata (Liddiard *et al.*, 2011; Murray & Wynn, 2011). A importância dos macrófagos na resposta imune foi demonstrada através de experimentos, em que a depleção destas células em um modelo de peritonite reduziu dramaticamente a produção dos níveis de KC e MIP-2, o que prejudicou o recrutamento de neutrófilos para o foco inflamatório (Cailhier *et al.*, 2005). Estas células são divididas em subtipos de acordo com sua localização anatômica e fenótipo funcional, ou seja, possuem especificações funcionais que estão criticamente relacionados com o microambiente anatômico onde residem: pulmão, baço, ossos, etc. (Gordon & Taylor, 2005; Murray & Wynn, 2011).

No pulmão existem macrófagos em vários microambientes anatômicos e fluidos como uma população heterogênea de células que atuam como sentinelas para detectar e responder a infecções. Como células fagocíticas, macrófagos fagocitam partículas infecciosas e promovem a remoção de células e detritos citoplasmáticos através da fagocitose de células apoptóticas e ajuda na formação da resposta imune adaptativa através da apresentação de antígenos a linfócitos T (Cline *et al.*, 2017), entretanto, o papel dos macrófagos pulmonares na infecção pelos vírus influenza é extremamente complexa (Lietzén *et al.*, 2011).

A importância dos macrófagos na gripe foi demonstrada através de experimentos de depleção de macrófagos alveolares em modelos murinos de BALB/c infectados com vírus A/Puerto Rico/8/34(H1N1) demonstraram uma maior susceptibilidade de camundongos a uma coinfeção bacteriana secundária nesses animais (Ghoneim *et al.*, 2013). Por outro lado, os macrófagos foram associados a desfechos mais graves da doença, uma vez que foi observado um intenso infiltrado pulmonar de macrófagos secretando grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias que é uma marca registrada na geração da cytokine storm na pneumonia grave por influenza (Kobasa *et al.*, 2007; Högner *et al.*, 2013).

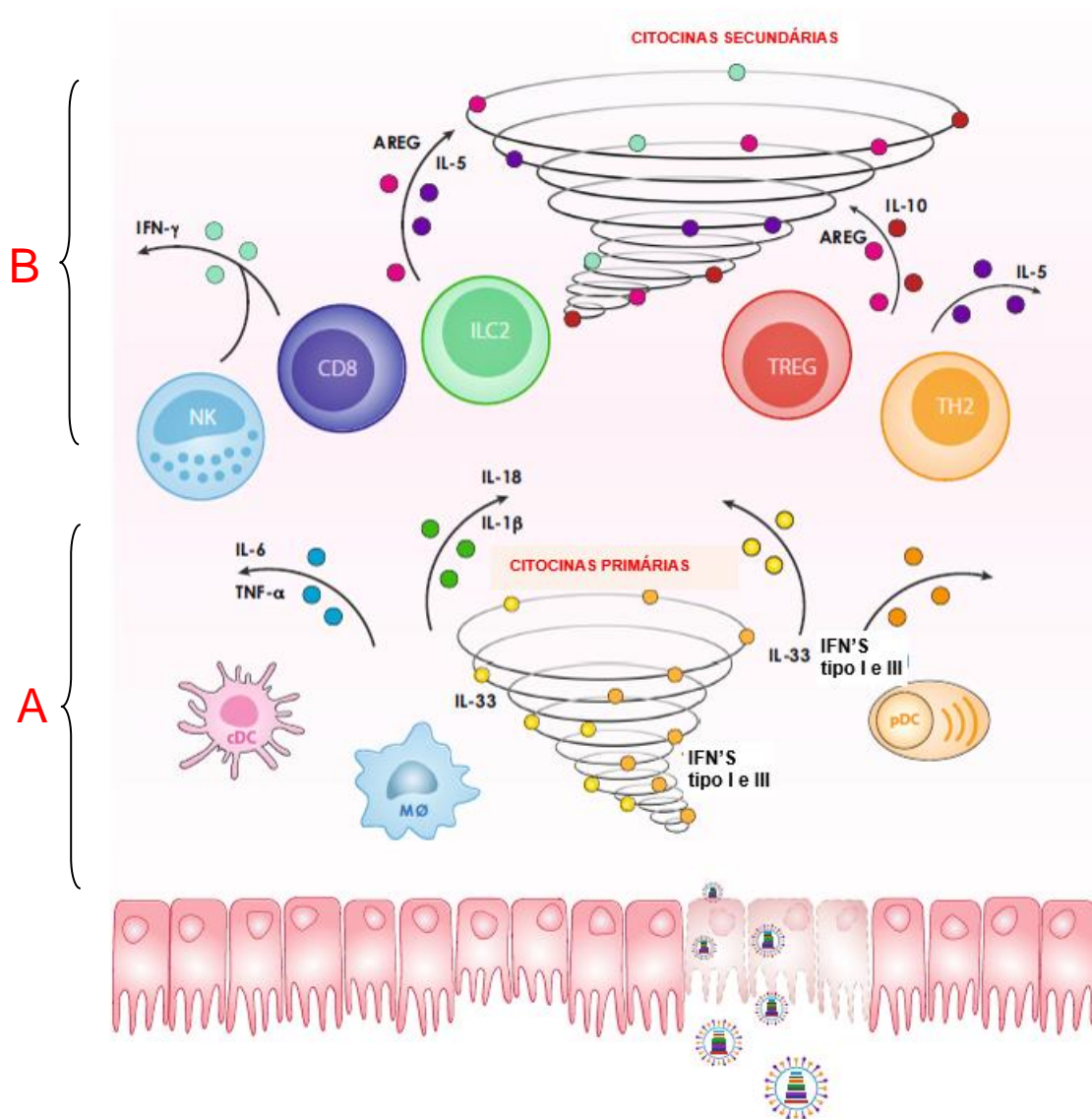
Classicamente em relação a influenza, os macrófagos são suscetíveis à infecção e as proteínas virais são produzidas, mas nenhuma progênie infecciosa do vírus é feita (Upham *et al.*, 2010). Mas atualmente, é considerado que a replicação de vírus influenza ser efetiva ou não é uma questão do tipo “macrófago-dependente”, entretanto, os modelos mais eficientes de produção de progênie viral, até o momento, são melhores observados em infecções com vírus altamente patogênico H5N1 (Cline *et al.*, 2017).

De uma forma mais genérica, os macrófagos infectados pelo vírus influenza tanto podem orquestrar a resposta imune do hospedeiro (Guilliams *et al.*, 2013), mas podem liberar citocinas de forma atípica e descontrolada - levando a cytokine storm (Woo *et al.*, 2010). A polarização a uma dessas condições é complexa e pode ser altamente influenciada pela presença de diferentes estímulos no trato respiratório, tais como diferentes tipos de moleculares associados aos patógenos (PAMPs) que poderiam ativar receptores específicos tais os TLRs (Quian & Cao 2013).

### 1.7.3 Tempestade de citocinas (Cytokine Storm)

O termo cytokine storm foi utilizado pela primeira vez em 2003, para descrever uma resposta imune extremamente exacerbada a infecção por influenza, caracterizada pela produção potencialmente fatal e consistente de um ciclo de retroalimentação entre citocinas e leucócitos (Yokota, 2003; Clark, 2007). Atualmente, essa produção descontrolada de citocinas induzidas pelo vírus influenza tem sido ligadas a respostas pró-inflamatórias descontroladas, que induzem imunopatologia significativa e resultados graves da doença (Tisoncik *et al.*, 2012).

Usualmente, a cytokine storm, é dividida em duas fases distintas e complementares. A primeira fase é chamada de tempestade de citocinas primárias, que são citocinas e quimiocinas produzidas pela ação direta da infecção pelo vírus influenza em células como macrófagos alveolares, células epiteliais e endoteliais do ambiente alvéolo-capilar, tornando esse microambiente extremamente pró-inflamatório. Essas citocinas e quimiocinas produzidas na primeira fase, recrutam e ativam células como linfócitos T CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, células natural killer (NK), células T reguladoras (Tregs), entre outras, levando a um segundo round de produção de citocinas que é chamado de tempestade de citocinas secundárias (Figura 1.7) (Guo & Thomas, 2017).



**Figura 1.8 - Esquema espacial e temporal da cytokine storm na infecção pelo vírus influenza.**

Após a infecção de células epiteliais, os vírus podem ser detectados por receptores da imunidade inata e desencadear uma robusta produção de citocinas, a primeira onda na cytokine storm. Nessa primeira onda de citocinas primárias, células epiteliais do pulmão, endotélias e outras células imunes produzem IFNs do tipo I e III, IL-1β, IL-18, TNF-α, IL-6, IL-33 e outras citocinas, principalmente para limitar a replicação viral e propagação e para iniciar uma resposta imune anti-viral (A). Após o recrutamento e ativação por citocinas primárias, células T CD8, células NK, ILC2s, Tregs, e as células Th2 podem secretar as citocinas secundárias IFN-γ, IL-10, amphiregulin e IL-5 com o objetivo de eliminar a infecção e restaurar a função pulmonar (B). Fonte: Adaptado de Guo & Thomas, 2017.



Na primeira fase da cytokine storm, podemos destacar os interferons (IFNs), moléculas que induzem uma polarização de uma resposta imune antiviral através da indução da expressão de proteínas celulares que atuam nessa resposta. Os IFNs são classificados em três tipos: tipo I (IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ ), tipo II (IFN- $\gamma$ ) e tipo III (IFN- $\lambda$  1, 2 e 3 ou IL-29, IL-28a e IL-28b, respectivamente). Apesar de serem classicamente classificadas como moléculas antivirais, vários estudos sugerem um papel patogênico dos IFNs durante a infecção pelos vírus influenza, já que essas citocinas super regulam a produção de diversas outras citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias (Kato *et al.*, 2005; Teijaro, 2015).

Os IFNs do tipo I estimulam as células epiteliais infectadas a produzirem IL-6, IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-8, MCP-1 e RANTES (também chamados de CCL2 e CCL5, respectivamente), que promovem um intenso infiltrado inflamatório no microambiente pulmonar ao estimularem o recrutamento de monócitos/macrófagos, linfócitos T e B, e células Natural Killer (NK) (Adachi *et al.*, 1997). Esse infiltrado, por sua vez, produz ainda mais citocinas pró-inflamatórias, ampliando a resposta inflamatória e favorecendo a montagem de uma resposta Th1, necessária para a imunidade antiviral específica. Além disso, a resposta celular é de grande importância no combate inicial a infecção pelo vírus influenza, já que as células T CD8+ possuem papel crucial no clearance viral. Embora essas respostas celulares Th1 e citotóxica sejam essenciais para a eliminação da infecção viral, a combinação com a grande liberação de citocinas pró-inflamatórias (cytokine storm) acabam atuando em sinergismo para causar um grande dano tecidual e o consequente agravamento da infecção (Bermejo-Martin *et al.*, 2009; Ramana *et al.*, 2009).

Os IFN- $\lambda$  também estão envolvidos na resposta anti-influenza. Sua produção e sinalização em outras células, como linfócitos, induzem a produção de diversas outras proteínas com propriedades imunomodulatórias. Os IFN- $\lambda$  reduzem a produção de citocinas relacionadas à resposta Th2 (IL-4, IL-5, IL-13, IL-14, IL-15), favorecendo, assim, uma resposta Th1 e, também, aumentando a citotoxicidade de células T CD8 (Kelly *et al.*, 2011), entretanto o seu papel na cytokine storm ainda não está perfeitamente elucidado.

Como visto anteriormente, a produção de interferons pode desencadear uma super expressão de diversos outros fatores inflamatórios como as quimiocinas, que

contribuem fortemente para gerar um intenso infiltrado celular. Entretanto, várias quimiocinas também participam desse processo na primeira fase da cytokine storm. Essas quimiocinas recrutam outras células do sistema imune, e com isso, contribuem para o início da segunda fase da cytokine storm. No caso das principais quimiocinas envolvidas na resposta anti-influenza, MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , RANTES, sua produção local e sistêmica, além de seus efeitos como moléculas quimiotáticas também são associadas à patogênese da infecção. Altos níveis destas moléculas são encontrados no soro de pacientes infectados com cepas mais virulentas do vírus influenza, como H5N1 (Teijaro, 2015).

Além dos interferons e quimiocinas, outras citocinas estão fortemente ligadas a primeira fase da cytokine storm durante a infecção pelo vírus influenza, principalmente IL-6 e TNF- $\alpha$ . Altos níveis de TNF- $\alpha$  e IL-6 são normalmente encontrados em pacientes infectados pelos vírus H5N1 e H1N1pdm09. Apesar da correlação entre estas citocinas e a patogênese da infecção, estudos em modelos animais sugerem que a ausência de IL-6 não reduz a mortalidade dos camundongos infectados e a sinalização desencadeada é necessária para o controle da replicação viral nos pulmões, pois leva a geração de células T helper e resposta por células B e anticorpos (Teijaro, 2015).

A primeira fase da cytokine storm possui uma ação de restrição da replicação viral, porém também age no recrutamento e ativação de células efetoras que podem executar uma eliminação mais extensa dos vírus e células infectadas, e envolve vários tipos de células que podem contribuir para a restauração do tecido pulmonar.

Essas células iniciam um segundo round de produção de citocinas, que continuam o processo de clearance viral, atenuam a inflamação e tentam restaurar a função pulmonar. Entretanto, vários trabalhos demonstram que a primeira e a segunda fase da cytokine storm podem se retroalimentar, descontrolando a resposta inflamatória, e por consequência, causar ainda mais dano ao hospedeiro (Cheung *et al.*, 2002; Chan *et al.*, 2005; Peiris *et al.*, 2009; Guo & Thomas, 2017).

Dentre as citocinas da segunda fase, podemos destacar o IFN- $\gamma$  e a IL-10. O IFN- $\gamma$  também pode possuir um papel tanto protetor, quanto deletério durante a infecção pelo vírus influenza. Durante a entrada e fusão do vírus na célula hospedeira, é necessário que proteases intra e extracelulares clivem a HA0 em HA1

e HA2. As células permissivas a infecção no trato respiratório são repletas destas proteases, e possuem um papel importante na replicação viral e na resposta imune inata já que são mediadores inflamatórios através da ativação dos receptores ativados por proteinase (RAPs). Existem 4 RAPs descritos (RAP 1-4) e, entre eles, os subtipos 1 e 2 já foram associados a infecção pelo vírus influenza (Perrone *et al.*, 2010).

A ativação de RAP2 leva a produção de IFN- $\gamma$ , que foi associada a redução da replicação viral nas células epiteliais, além da redução dos níveis de RANTES e infiltrado de neutrófilos nos fluidos broncoalveolares, ou seja, contribui para o estabelecimento de uma potente resposta protetora anti-influenza (Perrone *et al.*, 2010). Entretanto, a ativação do receptor RAP1, contribui para a exacerbação da resposta pró-inflamatória, levando ao aumento descontrolado da produção de citocinas, aumento da replicação viral, aumento da permeabilidade alvéolo-capilar, edema e dano pulmonar, contribuindo, então para patogênese da infecção (Brun-Buisson *et al.*, 2011). Outros trabalhos também demonstraram que o IFN- $\gamma$  não é necessário para a recuperação da infecção, sugerindo que possíveis alterações na concentração desta citocina e a presença de outros fatores podem ser necessárias para a definição do papel do IFN- $\gamma$  durante a infecção (Perrone *et al.*, 2010).

A IL-10 é outra citocina importante nessa fase mais tardia da cytokine storm, possuindo um papel regulatório da resposta inflamatória. Esta citocina regula negativamente a imunidade inata e adaptativa durante várias infecções virais, incluindo na infecção por vírus influenza (Ouyang *et al.*, 2011).

Na infecção por influenza, a IL-10 é altamente abundante, especialmente durante o sistema imune adaptativo resposta (McKinstry *et al.*, 2009; Phung *et al.*, 2017). Linfócitos T CD4 e CD8 são os principais produtores de IL-10. No entanto, apesar de sua função regulatória primária na resposta imune, o papel da IL-10 na infecção por influenza é extremamente complexa.

Na infecção pelo vírus influenza, níveis séricos elevados de IL-10 estão correlacionados com inflamação pulmonar grave (Shen *et al.*, 2011), e óbitos de crianças durante a pandemia de 2009 (Phung *et al.*, 2017).

### **1.7.3.1 O papel do TNF- $\alpha$ na Cytokine Storm**

A grande questão que surge nos estudos relacionados a cytokine storm, na infecção pelo vírus influenza, é qual seria a citocina chave para o controle desse fenômeno. Dentre essas citocinas, o TNF- $\alpha$  é considerado como o centro da cytokine storm, sendo produzido principalmente na primeira fase da cytokine storm por diferentes tipos de celulares, incluindo macrófagos alveolares, células dendríticas, células epiteliais pulmonares (Guo & Thomas, 2017).

Um dos motivos que levam os pesquisadores a considerar o TNF- $\alpha$  como uma citocina central na cytokine storm é o fato dessa citocina ser produzida por uma grande variedade de células imunes, principalmente nas que fazem parte da primeira fase da cytokine storm (Guo & Thomas, 2017), e que seu principal receptor, TNFR1, parece ser expressado por todos os tipos de células, garantindo efeitos generalizados desta citocina. Além disso, os efeitos pleiotrópicos do TNF- $\alpha$  são ainda mais amplificados pela existência de uma superfamília de proteínas TNF- $\alpha$  que é composta por 19 membros e que sinalizam através de 29 receptores diferentes (Aggarwal, 2003). Esses dados demonstram que os eventos imunológicos na infecção aguda por influenza, envolvendo a produção de TNF- $\alpha$ , são complexos e envolvem uma grande rede de interações de células e moléculas imunes.

O papel do TNF- $\alpha$  nessa rede de interações não está completamente elucidado, porém, os níveis de TNF- $\alpha$  demonstraram correlacionar-se com sintomas graves na gripe humana (Fritz *et al.*, 1999), e com a persistência da febre e comprometimento pulmonar em modelos suínos (Kim *et al.* 2009). O envolvimento dessa citocina em um desfecho deletério para o hospedeiro tem sido demonstrado em diversos trabalhos, inclusive sendo utilizado como padrão de avaliação da gravidade de doença (Peiris *et al.*, 2009 Perrone *et al.*, 2010).

### **1.7.3.2 TNF- $\alpha$ como potencial alvo terapêutico**

Nas infecções mais graves pelos vírus influenza, como H5N1 e H1N1pdm09, drogas imunomodulatórias começaram a ser proposta como terapia adjuvante a gripe. Lee (2017), publicou uma revisão que demonstra que o uso precoce de imunomoduladores associado a antivirais pode interromper a progressão da pneumonia e induzir recuperação rápida de lesões pulmonares em pacientes

infectados pelo vírus influenza e que, durante a pandemia de H1N1 de 2009, pneumônicas que se desenvolveram rapidamente após a infecção viral foram resolvidas drasticamente dentro de 24 h após o tratamento com corticosteroides.

Receptores de esfingosina são críticos nas respostas imunes inatas (Rivera *et al.*, 2011) e os análogos de esfingosina têm mostrado potencial para controlar a cytokine storm causada pelo vírus influenza (Marsolais *et al.*, 2009). O receptor 1 da esfingosina-1-fosfato (S1P) suprime o recrutamento de células imunitárias através da redução da produção de citocinas e quimiocinas por células endoteliais respiratórias na presença de agonistas seletivos de S1P1, CYM-5442 e RP-002, incluindo a produção de IFN- $\alpha$ , CCL2, IL-6, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ , (Teijaro *et al.*, 2011).

Entretanto, outros trabalhos já mostram que essa estratégia pode não ser tão eficaz, uma vez que a utilização do receptor S1P1 como terapia adjuvante não tem efeito na replicação viral e podem até se correlacionar com o aumento da suscetibilidade à infecção. Isto foi observado em camundongos tratados com DNA que codificava o fator de crescimento transformante  $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1), que inibia as respostas eosinofílicas pulmonares, mas aumentou a suscetibilidade a *Cryptococcus neoformans*, vírus da gripe e vírus respiratório sincicial (Williams *et al.*, 2005).

O uso de corticoides também é muito controverso na literatura, pois efeitos causados pelo tratamento com estas moléculas são controversos com relação à melhora do paciente, período de excreção e carga viral (Souza *et al.*, 2010; Brun-Buisson *et al.*, 2011; Lee, 2017). Vários grupos demonstram que o uso de corticoides para tratar pacientes com síndrome da dificuldade respiratória do adulto (ARDS – do inglês adult respiratory distress syndrome) secundária a pneumonia causada pela infecção com o vírus influenza não apresentou benefícios. Inclusive, o tratamento precoce desses pacientes foi associado com casos fatais, casos de pneumonia mais grave e uma tendência para uma maior duração da ventilação mecânica (Brun-Buisson *et al.*, 2011).

Devido aos fatos expostos até o momento nesse trabalho, a cytokine storm passou a ser um dos alvos mais promissores nesse tipo de tratamento adjuvante imunomodulatório na infecção por influenza (Fage *et al.*, 2017). Entretanto, esse fenômeno de produção exacerbada de citocinas é muito complexo e os dados da literatura em relação aos seus benefícios são controversos, o que sugere a

necessidade da utilização de um alvo específico na cytokine storm. Além disso, para todas as citocinas e quimiocinas mencionadas anteriormente, tem sido difícil provar uma relação entre as moléculas individualmente e a patogênese da infecção, já que elas também são necessárias para o controle e resolução da infecção pelo vírus influenza.

O equilíbrio entre o controle imunológico do vírus influenza e a patologia é bastante delicado. A modulação excessiva da resposta imunológica resulta na perda do controle da infecção viral, enquanto a resposta inflamatória exacerbada que parece contribuir para a redução da replicação viral leva também ao agravamento do quadro infeccioso como um todo. O que nos leva a pensar no TNF- $\alpha$  devido ao seu potencial papel como iniciador da cytokine storm (Guo & Thomas, 2017).

Devido à complexidade dos mecanismos moleculares e imunológicos desencadeados pela produção de TNF- $\alpha$ , diversos modelos animais são utilizados para a elucidação desses eventos. Assim, modelos animais são necessários para o entendimento dos eventos que regem a patogênese do vírus da influenza e a transmissibilidade entre os hospedeiros, bem como para realizar avaliação pré-clínica da eficácia de intervenções preventivas e terapêuticas, como vacinas e, principalmente, antivirais (Thangavel & Bouvier, 2014). Diversos modelos animais foram utilizados no passado para pesquisar vários aspectos da influenza mamífera, incluindo camundongos, ratos, hamsters sírios, cobaias, furões, cães, gatos, suínos domésticos e primatas não humanos, como rhesus, pigtailed e macacos cynomolgus e, mais recentemente, saguis (Tripp & Tompkins, 2009; Thangavel & Bouvier, 2014).

Vários modelos experimentais corroboram a ideia da importância do TNF- $\alpha$  na patogênese do vírus influenza. Camundongos deficientes de receptor 1 (TNFR1) exibem reduzida mortalidade durante infecção pelo vírus H5N1 (Szretter *et al.*, 2007). Além disso, camundongos que não possuem TNF-R1/TNF-R2 e receptor de IL-1 exibiram diminuição da morbidade e atraso na mortalidade com inflamação reduzida das vias aéreas, após o desafio letal com H5N1 (Perrone *et al.*, 2010). Esses dados demonstram que o TNF- $\alpha$  contribui robustamente para o estabelecimento de um quadro clínico desfavorável para o hospedeiro.

Além disso, confirmando o papel de TNF- $\alpha$  na gênese da cytokine storm, estudos utilizando tratamento anti-TNF foram capazes de diminuir a produção de duas

citocinas extremamente importantes nesse fenômeno como a IL-6 e IFN- $\gamma$ , além de diminuir drasticamente o infiltrado inflamatório no microambiente pulmonar de camundongos BALB/c desafiados com o vírus influenza A/FM/1/47(H1N1) (Shi *et al.*, 2013). Outros dados de modelos murinos provaram que tratamento utilizando anticorpos anti-TNF pode reduzir a perda de peso e doença após desafio com vírus H3N2 (Hussell *et al.*, 2001).

Devido ao exposto até o momento, esse trabalho visou esclarecer como o vírus Influenza e a HA, através da produção de TNF- $\alpha$  desencadeiam o processo de necroptose e como esse processo impacta a resposta imune do hospedeiro e pode determinar um desfecho letal no curso da infecção.

## 2 JUSTIFICATIVA

Apesar da infecção pelo vírus influenza ser na maioria dos casos autolimitada, sendo a maioria dos indivíduos infectados capazes de responder de forma eficiente a doença, o que leva a um desfecho benéfico, existem muitos casos de influenza grave, inclusive letal. Os dados atuais da literatura, ainda não definiram bem, quais os eventos imunológicos que definem qual o desfecho final da infecção, o que representa uma séria lacuna no conhecimento da doença, dificultando, inclusive, o controle e monitoramento da doença sazonal, e formas de prevenir as futuras pandemias. Entretanto, diversos trabalhos apontam para os macrófagos como células chaves nesses processos resolução/letalidade.

Macrófagos são células que apesar de serem infectadas pelo vírus influenza, não são capazes de gerar uma progênie infecciosa, porém, orquestram a resposta imune contra a infecção. Sendo assim, são células efetoras importantes na determinação do desfecho final da doença. Logo, o conhecimento dos mecanismos celulares desempenhados pelos macrófagos é extremamente importante no conhecimento do curso natural da infecção, além disso, podem determinar terapias alternativas para o tratamento da gripe. Uma vez que a resposta inflamatória exacerbada esta associada aos quadros mais graves da doença, e que os macrófagos representam um dos grupos celulares mais importantes na montagem dessa resposta deletéria ao hospedeiro, o presente trabalho focou exatamente nessa dicotomia de resposta dos macrófagos na infecção e como uma terapia anti-inflamatória focada nessa célula pode contribuir para um desfecho benéfico para a população.



## **3. OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo Geral**

Investigar o potencial papel da produção de TNF- $\alpha$  dependente da ativação de TLR4, no processo de necroptose na infecção pelo vírus influenza e estimulação por hemaglutinina e as consequências destes fenômenos na severidade da doença.

### **3.2 Objetivos Específicos**

- Analisar a indução de necroptose por vírus influenza e HA.
- Caracterizar o fenômeno de necroptose por vírus influenza e HA.
- Identificar a resposta inflamatória induzida pelo processo de necroptose.
- Verificar a eficácia do tratamento anti-TNF- $\alpha$  no controle do processo de necroptose em modelos de influenza grave *in vivo*.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Vírus

O vírus influenza A H1N1 (PR8) foi expandido em células de rim canino (Madin-Darby Canine - MDCK), segundo protocolo estabelecido Szretter, (2006). A titulação do vírus foi realizada pelo método de TCID<sub>50</sub>/mL. Assim, células MDCK previamente semeadas em placas de 96 poços, com densidade de  $5 \times 10^4$  células/poço foram expostas a diluições virais seriadas de base 10. Após 72 h de infecção, esses poços foram avaliados seguindo metodologia descrita previamente (Szretter *et al.*, 2006). As ações virais foram aliquotadas e armazenadas a  $-80^\circ \text{C}$  para estudos adicionais.

### 4.2 Células

#### 4.2.1 Culturas primárias

Os macrófagos murinos foram diferenciados da medula óssea de camundongos da linhagem C57BL/6 conforme descrito por Schworer e colaboradores (2014), essas células foram cultivadas em meio de cultura RPMI 1640 (Sigma-Aldrich).

Os macrófagos humanos derivados de monócitos foram obtidos através da aderência plástica de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) previamente isoladas por centrifugação por gradiente de densidade (Ficoll-Paque, GE) a partir da separação de buffy coat de sangue de doadores saudáveis. Resumidamente, os PBMCs foram plaqueados em placas de 48 poços (NalgeNunc) em meio DMEM (Sigma-Aldrich) contendo 10% de soro humano (HS, Millipore) e penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich). As células foram mantidas em condições de cultura padrão durante 6-7 dias para a diferenciação de monócitos em macrófagos. Em seguida, as células não aderentes foram lavadas e a camada de macrófagos restante foi mantida em DMEM com 5% de HS. A pureza do macrófago foi superior a 95%, conforme determinado por análise de citometria de fluxo

(FACScan; Becton Dickinson) usando anticorpos monoclonais antiCD3 (BD Biosciences) e anti-CD16 (Southern Biotech). Esta cultura foi suplementada com 10% de soro bovino fetal (FBS, HyClone), 100 U/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina. As células foram cultivadas a 37°C numa atmosfera de CO<sup>2</sup> a 5%.

#### **4.2.2 Culturas de linhagens celulares**

##### **Linhagem MDCK**

Células MDCK, doadas pelo Recurso de Reagente de Influenza (IRR; <http://www.influenzareagentresource.org/>) ao Centro Nacional de Influenza Nacional (NIC), foram cultivadas em Meio MEM (LGC Biotecnologia), contendo 10% de soro bovino fetal - FBS (HyClone), 100 U/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina. As células foram cultivadas a 37°C numa atmosfera de CO<sup>2</sup> a 5%.

##### **Linhagem L929**

Células da linhagem L929 (linhagem de fibroblasto murino), foram gentilmente doados pelo Dr. Guy Zimmerman do Laboratório de Biologia Molecular e Genética Humana da Universidade de Utah - Salt Lake, EUA. Linhagem foi cultivada para a obtenção do fator GM-CFS (para diferenciação dos macrófagos murinos).

As células da linhagem L929 foram descongeladas e cultivadas em estufa (Labline) a 37°C numa atmosfera de CO<sup>2</sup> a 5%, com o meio RPMI 1640 (LGC Biotecnologia) contendo 10% de soro bovino fetal - FBS (HyClone), 100 U/mL de penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina. Após atingir uma confluência de 100% em garrafas de cultura de 150cm<sup>2</sup> (CORNING), foi acrescentado 100mL do meio descrito acima em cada garrafa e células foram incubadas em condições de cultura por 7 dias. Após o período de incubação, sobrenadantes das garrafas de cultura foram recolhidos, filtrados em sistema de filtração de quinhentos mililitros de 0.22 µm (MILLIPORE), e estocados congelados para posterior utilização em cultura de diferenciação de macrófagos da medula óssea.

### **4.2.3 Estimulação e tratamento de culturas**

Os macrófagos foram estimulados com LPS (10ng/mL); Hemaglutinina A (diferentes concentrações); infectados com o vírus H1N1 - PR8 (MOI: 0,25). As células também foram pré-tratadas ou não com 2  $\mu$ M do inibidor farmacológico de TLR4, CLI095 (Invivogen); com 10 $\mu$ M do inibidor pan-caspase Z-VAD-FMK (Invivogen); com o 25 $\mu$ M do inibidor de RIPK1 Necrostatin-1 (Calbiochem) e com 1 ng/mL de anticorpos anti-TNF- $\alpha$  (R&D SYSTEM).

## **4.3 Animais**

Foram utilizados camundongos selvagens da linhagem C57BL/6, que são mantidos no Centro de Criação de Animais de Laboratório (CECAL) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). Durante os experimentos, os animais foram mantidos no Biotério do Pavilhão Ozório de Almeida, do Instituto Oswaldo Cruz. Animais machos com peso entre 20 a 25g foram mantidos em gaiolas plásticas de micro isoladores ventilados (Gabinete Biotério mod. EB-273, Insight, Brasil) com livre acesso a água e ração, com temperatura controlada entre 22 a 24°C, e ciclos de claro e escuro com duração de 12 horas. Os animais receberam uma dose de vermífugo (20  $\mu$ L Petzi Plus/Vetbrands em 180  $\mu$ L de salina) por via oral (gavagem) e foram utilizados uma semana após o tratamento. Todos os procedimentos foram realizados após a aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Fiocruz sob as licença n° L-050-2015.

### **4.3.1 Infecção e tratamento dos animais**

Camundongos foram anestesiados com injeção subcutânea de cetamina (60mg/kg) e xilasina (4mg/kg) e inoculados com 1X10<sup>3</sup> PFU de vírus H1N1. Seis horas após a infecção, os camundongos foram tratados intraperitonealmente com 200 $\mu$ l de 2,5mg/kg etanercept (ENBREL<sup>®</sup>, gentilmente doado pelo Laboratório de Pesquisa sobre o Timo - IOC) (dissolvido em água). O tratamento foi realizado por 7 dias.

### **4.3.2 Sobrevivência e perda de peso corporal**

Para o estudo de sobrevivência (n = 10 animais por grupo), os camundongos foram monitorados continuamente para a sobrevivência (15 dias) e perda de peso corporal (8 dias). Essas experiências foram repetidas 3 vezes.

### **4.3.3 Obtenção de tecidos**

Para a obtenção de tecidos para diversas análises, posteriormente descritas, animais controle e infectados (tratados ou não) foram profundamente anestesiados com isoflurano (Abott). Após a aplicação da anestesia os animais foram então perfundidos com 5 mL de salina não estéril, para exclusão de leucócitos e hemácias. O sistema de perfusão continha um escalpe acoplado a uma bomba peristáltica (MINIPULS 3-GILSON). Após a perfusão, as cavidades torácica e peritoneal foram expostas para retirada do tecido pulmonar, que foi pesado. O tecido pulmonar foi colocado em criotubo e congelado instantaneamente em gelo seco, e depois estocados em freezer -80°C para posterior análises de citocinas, proteínas e western blotting.

### **4.3.4 Lavado broncoalveolar – LBA**

Os animais foram submetidos à eutanásia pela inalação de isoflurano e procedeu-se a coleta de amostras de lavado broncoalveolar (LBA). Após a eutanásia, foi feita a exposição da traqueia e secção dos músculos adjacentes. Em seguida, foi aberto um pequeno orifício na região proeminente da cartilagem traqueal para a inserção de uma cânula acoplada a uma agulha de 21G (BD). O lavado bronco-alveolar foi obtido pela injeção de 2mL de PBS 1X gelado. Ao término do processo, recuperava-se um volume aproximado de 1.5 mL do LBA por camundongo. O LBA foi centrifugado a 0,2 G por 5 minutos, células e o sobrenadante foram separados e estocados em freezer -80°C para futuras análises.

### **4.3.5 Contagem total e diferencial das células do LBA**

A contagem total de leucócitos do LBA foi efetuada em câmaras de Neubauer em microscópio óptico (aumento de 10X), após diluição das mesmas em solução de Turk. As células do LBA foram diluídas 5 vezes no grupo controle e 10 vezes nos grupos infectados. A análise diferencial de leucócitos do LBA através de citoesfregaços preparados em citocentrífuga (Cytospin3- Shandon – 0,05 g por 5 minutos). Os citoesfregaços foram corados pelo kit Panótico (Laborclin), através de imersão por um minuto em cada uma das soluções que compõe o kit. Foram contadas 100 células consecutivas por citoesfregaço em microscópio de luz, com objetiva de imersão em óleo (aumento de 100X). O valor absoluto de cada tipo celular foi calculada a partir da porcentagem encontrada em relação ao número total de células.

### **4.3.6 Quantificação de proteínas**

A concentração total de proteína LBA foi medida usando o kit de análise de proteína BCA (Thermo Scientific). Para isso, o reagente de trabalho foi preparado adicionando-se cinquenta partes de Reagente BCA A e uma parte de Reagente BCA B. Uma curva padrão (de 0,01562 a 2mg/mL) foi construída através de diluições seriadas a partir de albumina humana fornecida pelo fabricante. Um total de 25µL das amostras de sobrenadantes das culturas foi adicionado em triplicata nos poços de placas de fundo em U (Nunc). Foram adicionados 200µL do reagente de trabalho descrito acima nos poços. A placa foi incubada em estufa (Labline) a 37°C por trinta minutos e a leitura das amostras foi realizada a 562 nm na leitora de placas.

## **4.4 Quantificação de Citocinas**

Realizou-se dosagem de citocinas e quimiocinas nos sobrenadantes dos macrófagos (humanos e murinos), no LBA e no tecido pulmonar dos animais. Para as análises pulmonar, os pulmões foram homogeneizados em 800µL de água MILIQ contendo um coquetel de inibidores de protease (Complete mini EDTA-free /Roche) por trinta segundos, usando a Ultra-Turrax Disperser T10 basic (IKA). Após a

homogeneização dos tecidos, estes foram centrifugados a 0,2g por 5 minutos e o sobrenadante foi aliquotado para as análises.

Para realização do ELISA placas de fundo chato (Nunc) para ensaio em volume reduzido foram cobertas com o anticorpo de captura (50µL/poço) e seladas com filme plástico. Após incubação overnight a 4°C, as placas foram lavadas 4X com tampão de lavagem (100µL/poço de 1L de PBS1X + 500µL de Tween® 20) e incubadas durante 1 hora com a solução de bloqueio (50µL/poço de 100mL PBS 1X +1g BSA (Sigma Aldrich)) à temperatura ambiente. A curva padrão foi diluída em solução de bloqueio + Tween® 20 e aplicada na placa, bem como as amostras (50µL/poço). Após nova incubação overnight a 4°C as placas foram lavadas 6X com tampão de lavagem e o anticorpo de detecção diluído em solução de bloqueio+ Tween® 20 (50µL/poço) foi adicionado. Uma hora após a incubação com o anticorpo de detecção, as placas foram lavadas 8X com tampão de lavagem e foi adicionada a solução de streptavidina-peroxidase (50µL/poço de 25uL de Streptavidina-peroxidase (R&D)+ 5mL de Tampão de bloqueio com Tween® 20). Trinta minutos após a incubação no escuro, foi acrescida a solução de 3,3',5,5'-Tetrametilbenzidina (TMB, Sigma Aldrich), substrato para a reação colorimétrica. Após desenvolvimento satisfatório de cor na curva-padrão, a reação foi parada com solução de parada (50µL/poço de 10,65mL de H2SO4 (Merck) + Água MilliQ q.s.p. 1L) e a absorbância a 405 nm foi determinada pela leitora de placas (Spectr Max 190).

Foram feitas as quantificações das seguintes citocinas: TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, IFN- $\gamma$ , KCe MCP-1.

#### **4.5 Quantificação de óxido nítrico (NO)**

Para a dosagem da produção de óxido nítrico em nossas culturas foi realizada quantificação da produção de nitrito nos sobrenadantes através da técnica de Griess (Thermo Scientific). Para isso, uma curva padrão (de 0,78125 a 100µM) foi construída através de diluições seriadas a partir de nitrito fornecido pelo fabricante. Um total de 25µL das amostras de sobrenadantes das culturas foi adicionado em triplicata nos poços de placas de fundo chato (Nunc). Foram adicionados 100µL de

solução de Griess do kit. A placa foi incubada em estufa a 37°C por trinta minutos e a leitura das amostras foi realizada a 590nm na leitora de placas.

#### **4.6 Quantificação da Desidrogenase Láctica (LDH)**

A dosagem de desidrogenase láctica (LDH) extracelular foi quantificada no sobrenadante da cultura e no LBA pelo Kit LDH (Doles). Para isso, aplicou-se por poço, 5µL de alúmen férrico do kit em placas de fundo chato (Nunc) mais 25µL de amostras mais 100µL de substrato do kit. Incubou-se a placa por 3 minutos a 37°C, e depois do tempo de incubação aplicou-se 5µL de NAD e incubou-se a placa por mais 5 minutos. Após a incubação pipetou-se 100µL de solução estabilizadora. A placa foi incubada por 10 minutos em temperatura ambiente e a leitura das amostras foi realizada a 492nm na leitora de placas (Spectramax L).

#### **4.7 Citometria de fluxo**

Macrófagos e células do LBA foram diluídas em solução tampão de marcação do kit ( $10 \times 10^6$  células/mL), depois 100µL das amostras foram transferidas para um tubo a parte e marcadas com 5µL de AnexinaV e 1µL Iodeto de Propídio (PI) (BD Biosciences) por 15 minutos para análises de morte celular. Cerca de 10.000 eventos foram adquiridos utilizando o FACSCalibur e análises foram feitas utilizando o software CellQuest. As análises foram realizadas utilizando o programa Cell Quest (BD).

#### **4.8 Western Blotting**

O gel separador foi preparado e aplicado entre as placas que compõem o sistema de suporte (BioRad). Álcool isopropílico (Merck) foi adicionado entre as placas para evitar o contato do gel com o ar e acelerar o processo de polimerização. Após a solidificação do gel, o isopropanol foi removido e as placas foram rinsadas com água MilliQ. Depois da secagem com papel de filtro, o gel de empilhamento foi aplicado sobre o gel separador e o pente foi colocado entre as placas. Após a polimerização do gel de empilhamento, as placas foram transferidas para a cuba de



eletroforese (BioRad), à qual se adicionou tampão de corrida suficiente para cobrir totalmente o gel.

Um volume de lisado diluído em tampão de amostra correspondente a 10µg de proteínas totais foi aplicado em cada poço. Aplicou-se também 4,5µL do padrão peso molecular Rainbow™ (Amersham). A cuba foi então conectada a uma fonte (BioRad) programada para fornecer 120 Volts durante uma hora. Após o tempo de corrida, o gel foi removido das placas e a parte correspondente ao gel de empilhamento foi descartada. O restante do gel foi imerso em tampão de transferência. Uma membrana PVDF (Immobilon-FL) foi cortada no tamanho do gel separador e ativada por um minuto em metanol (Merck). Em seguida, a membrana e os filtros de papel foram encharcados com tampão de transferência e colocados no aparelho de transferência trans-blot dry (BioRad) formando um sistema composto por filtro de papel, membrana de PVDF, gel separador e filtro de papel, de baixo para cima. O aparelho foi então conectado a uma fonte (BioRad) programada para fornecer 120V por uma hora e meia. Ao término da transferência, a membrana foi retirada do aparelho e incubada em cerca de 7mL de tampão de bloqueio por 30 minutos no agitador.

Em seguida, a solução de bloqueio foi descartada, e foi adicionado a membrana 6mL de solução de bloqueio contendo os anticorpos anti-fosfo-RIPK1, anti-MLKL e anti-RIPK3 e Anti-caspase-8 clivada (Cell Signaling Technology), diluído 500X. As membranas ficaram incubando overnight, a 4°C, no agitador (Labline). Após a incubação, as membranas foram lavadas 3X por cinco minutos com TBS/Tween® e incubada por uma hora e meia com anticorpo de camundongo antiIgG de coelho acoplado a fluoróforo (IRDye 680-RD) diluído 20.000x. Após a incubação foi realizada a revelação no equipamento Odyssey Clx (Uniscience). O controle de carregamento foi feito pela detecção da expressão de β-actina. As duas membranas foram lavadas 3x por cinco minutos com TBS/Tween®. As membranas ficaram incubando por 15 minutos na solução de stripping (Uniscience), depois foram realizadas mais 3x lavagens por cinco minutos com TBS/Tween®. As membranas foram então bloqueadas por 30 minutos e adicionado o anticorpo primário de coelho anti-β-actina de camundongo (Sigma) por 30 minutos, a temperatura ambiente no agitador (Labline). Após este período foi realizada novamente 3x lavagens por cinco minutos com TBS/Tween®. Incubamos por 30

minutos com anticorpo secundário de cabra anti-IgG de coelho acoplado a fluoróforo (IRDye 800-RD) diluído 20.000x e a revelação no Odssey Clx (Uniscience).

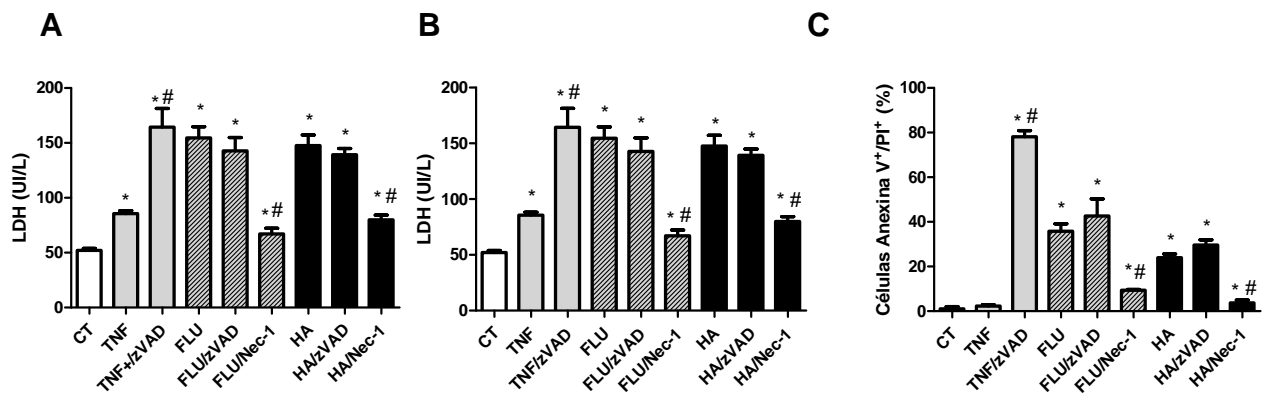
#### **4.9 Análise estatística**

A análise estatística foi realizada utilizando o software GraphPad Prism (San Diego, CA, EUA). Os valores de P foram calculados pelo teste t de Student não remunerado, exceto pelo PMC calculado com o teste de soma de classificação de Wilcoxon. Os resultados são expressos como média  $\pm$  SEM (mediana (IQR)). O nível de significância foi estabelecido em  $P \leq 0,05$ .

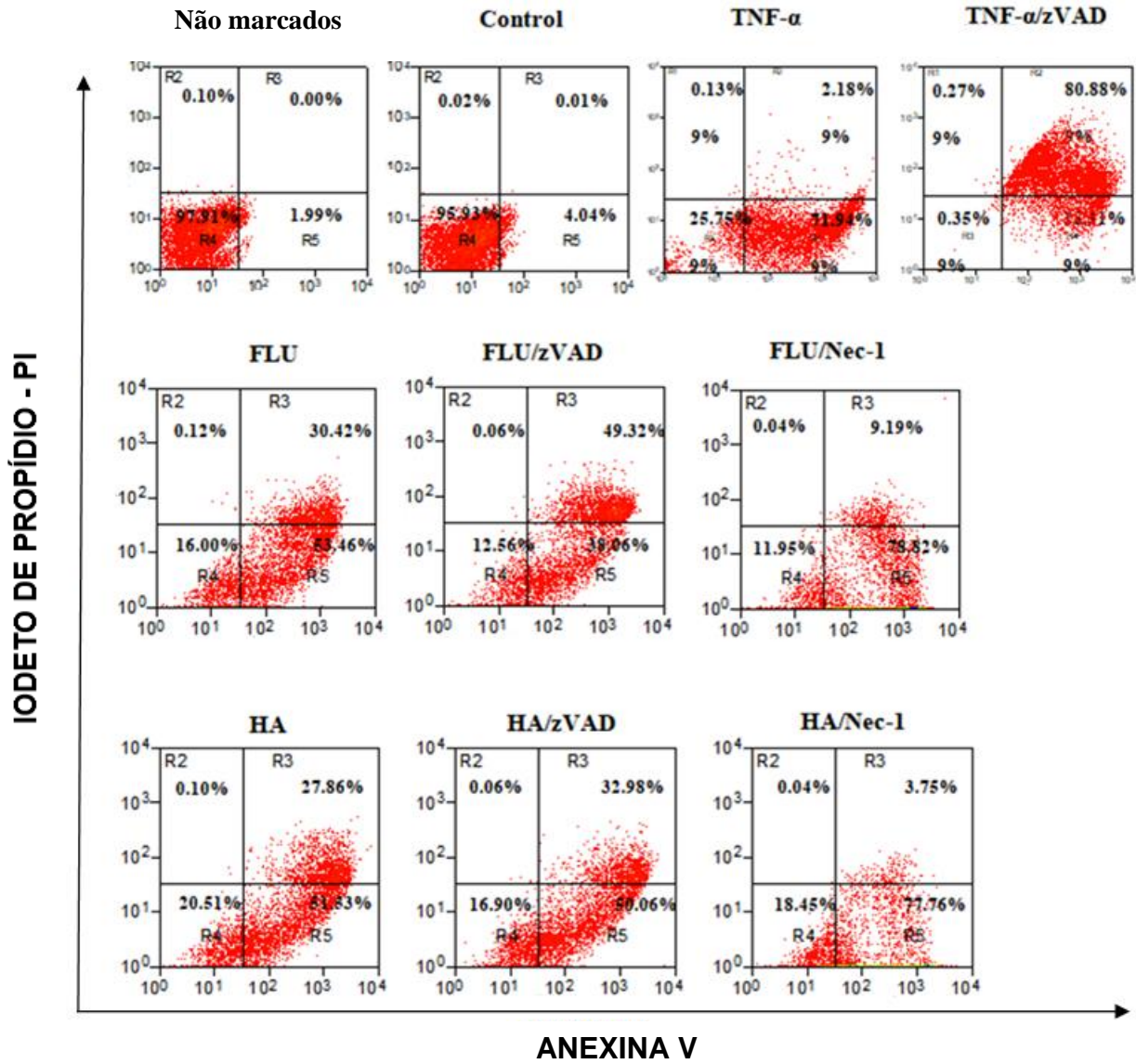
## 5 RESULTADOS

### 5.1 Vírus influenza e hemaglutinina são capazes de induzir o processo de necroptose em macrófagos

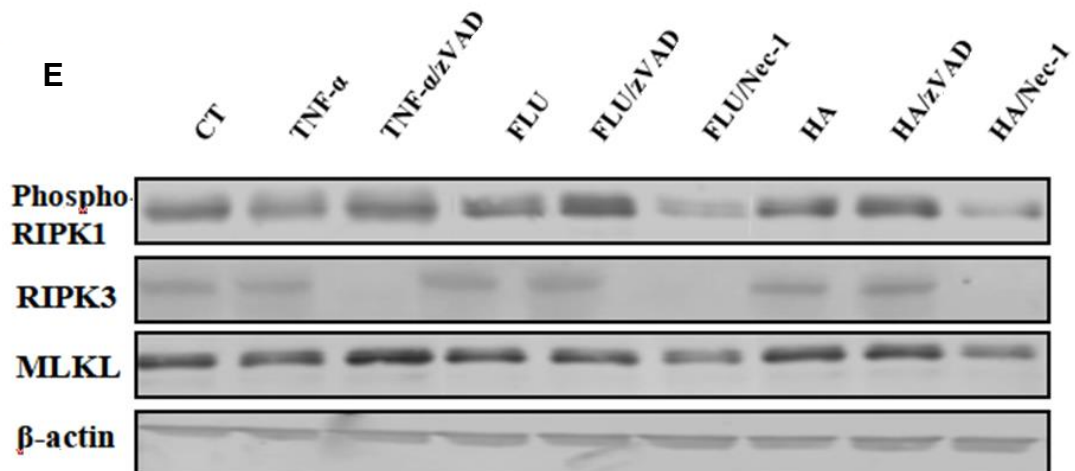
Para determinar a indução de necroptose, macrófagos humanos e murinos foram pré-tratados com inibidor de pan-caspase (ZVAD) ou inibidor de necroptose (Nec-1) durante 2 horas. Após este período de pré-tratamento, os macrófagos foram infectados com o vírus da influenza (FLU) ou estimulados com hemaglutinina (HA) por 24 horas para determinar seus mecanismos citotóxicos de morte celular. FLU e HA foram citotóxicos para macrófagos, conforme determinado pela liberação de LDH nos sobrenadantes das células. No entanto, o pré-tratamento com Nec-1 foi capaz de reverter este efeito citotóxico tanto em macrófagos humanos (Fig. 5.1A) quanto em macrófagos murinos (Fig. 5.1B) que foi confirmado pela técnica de citometria de fluxo (Fig. 5.1C e fig. 5.1D). Uma vez que o fenômeno da morte celular era idêntico em ambos os macrófagos murinos e humanos, decidimos realizar nosso modelo murino nas demais análises. Além disso, o pré-tratamento Nec-1 foi capaz de inibir a ativação de moléculas de via necrótica, como RIPK1, RIPK3 e MLKL (Fig. 5.1E e 5.1F).



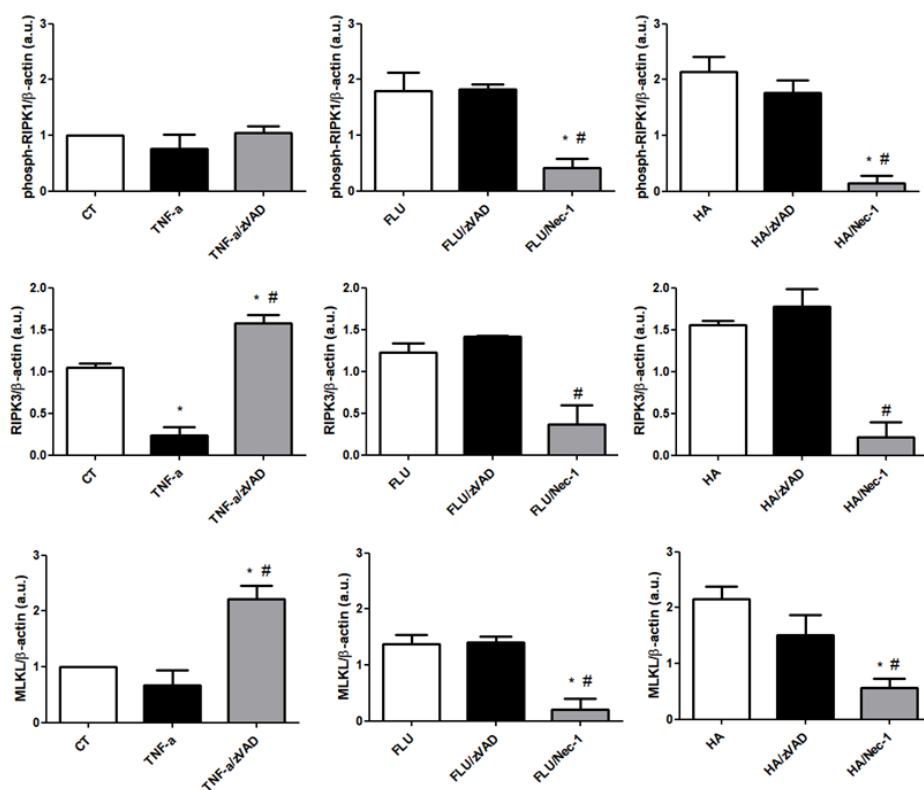
D



E



F

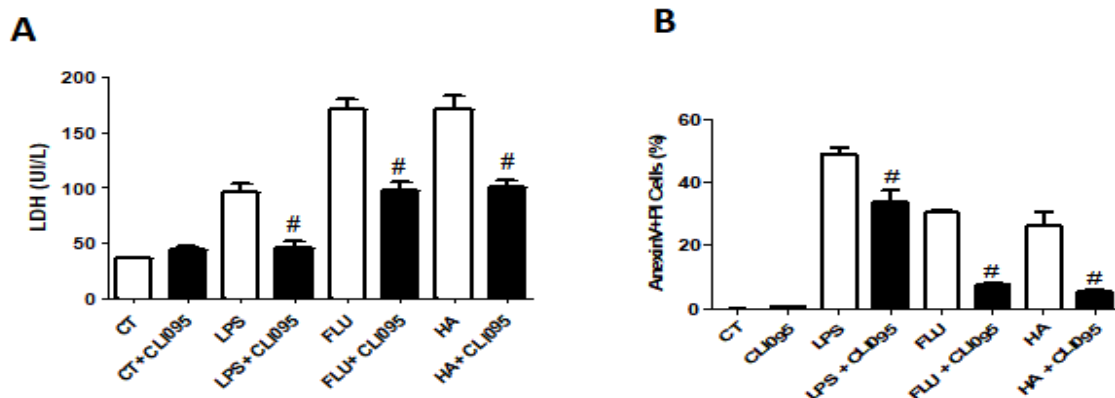


**Fig. 5.1 - FLU e HA induzem o processo de necroptose em macrófagos.** (A) Avaliação da viabilidade celular por citotoxicidade através da quantificação de LDH em sobrenadantes de macrófagos humanos e (B) macrófagos murinos infectados com FLU ou tratados com HA ou TNF- $\alpha$ , que foram pré-tratados ou não com zVAD ou Nec-1. (C) Análise da morte celular por citometria de fluxo, marcação de macrófagos murinos com Anexina V e PI. (D) Western blots do lisado celular. (E) A quantificação dos níveis de fosfo-RIPK1, RIPK3 e MLKL, normalizado por  $\beta$ -actina em cada gel é mostrada. \* P <0,05 em relação ao grupo controle. # P <0,05 em relação aos seus respectivos estímulos sem pré-tratamento. Gráficos e imunoblots representativos de três experimentos.

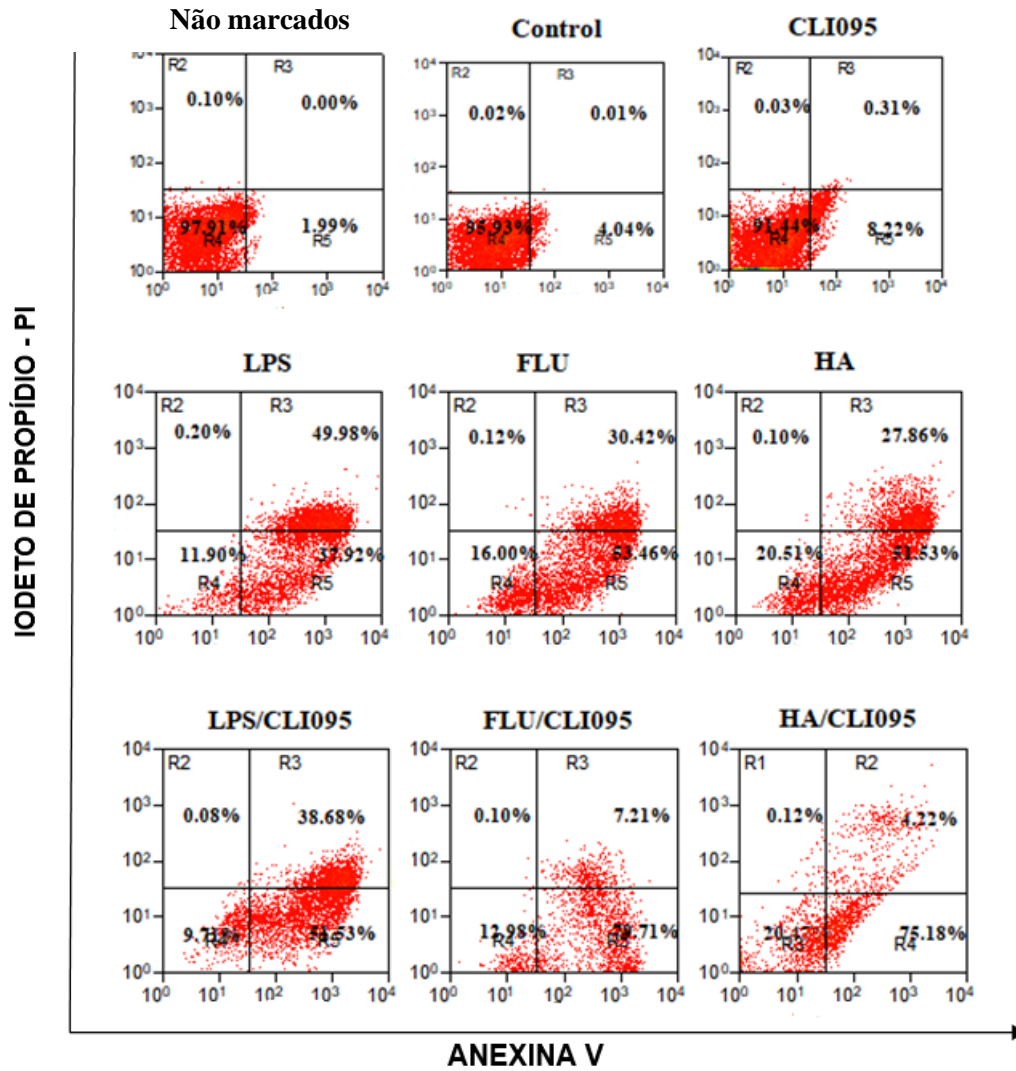
## 5.2 FLU e HA ativam a necroptose de maneira dependente da ativação do TLR4

A via da necroptose pode ser desencadeada pela ativação de TLR's (Ou et al., 2017). Então, avaliamos a capacidade do vírus da FLU e HA para induzir esse fenômeno de morte através da ativação do TLR4. Para isso, utilizamos o inibidor farmacológico de TLR4 (CLI095), que foi capaz de reverter o efeito citotóxico nessas células, conforme determinado pela liberação de LDH nos sobrenadantes das células (Fig. 5.2A) e confirmado pela técnica de citometria de fluxo (Fig. 5.2B e 5.2C). HA foi capaz de induzir uma produção significativa de TNF- $\alpha$  (Fig. 5.2D), que foi dependente da ativação do TLR4, uma vez que o tratamento com CLI095 reduziu drasticamente a produção de TNF- $\alpha$  em todas as nossas condições experimentais (Fig. 5.2E). Além disso, o pré-tratamento CLI095 foi capaz de inibir a expressão de fosfo-RIPK1 (Fig. 5.2F e 5.2G).

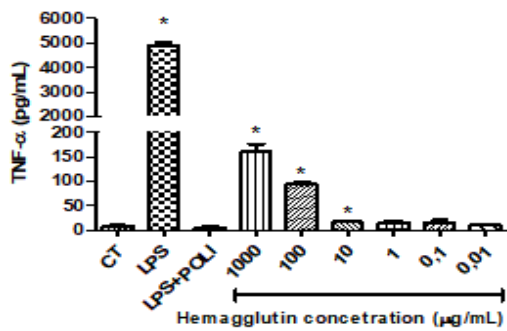
Para corroborar esses dados, utilizamos macrófagos diferenciados da medula óssea de camundongos WT, *tlr4*<sup>-/-</sup> e *tlr2*<sup>-/-</sup>. As análises citotóxicas demonstram que FLU e HA induzem o extravasamento da LDH nos animais WT (Fig. 5.2H) e *tlr2*<sup>-/-</sup> macrófagos (Fig. 5.2I), e esse fenômeno não ocorre nas células *tlr4*<sup>-/-</sup> (Fig. 5.2H) . Confirmamos esses resultados através da técnica de citometria de fluxo (Fig. 5.2J e 5.2K). Além disso, FLU e HA foram capazes de aumentar os níveis de RIPK1, RIPK3 e MLKL em WT e *tlr2*<sup>-/-</sup> - macrófagos, o que não ocorre nos *tlr4*<sup>-/-</sup> macrófagos (Fig. 5.2L e 5.2M).



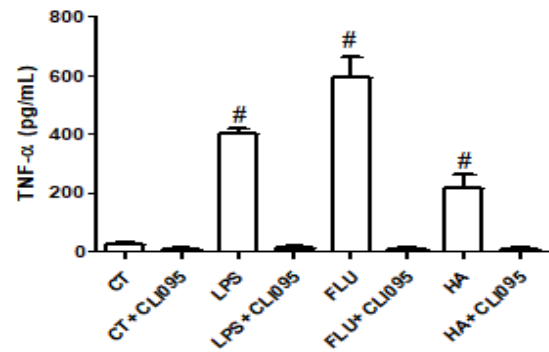
**C**

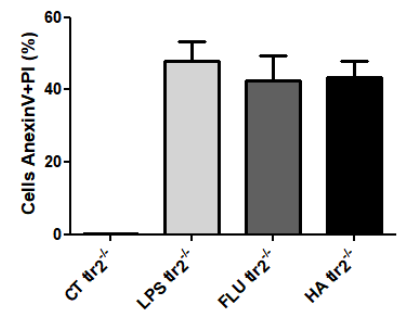
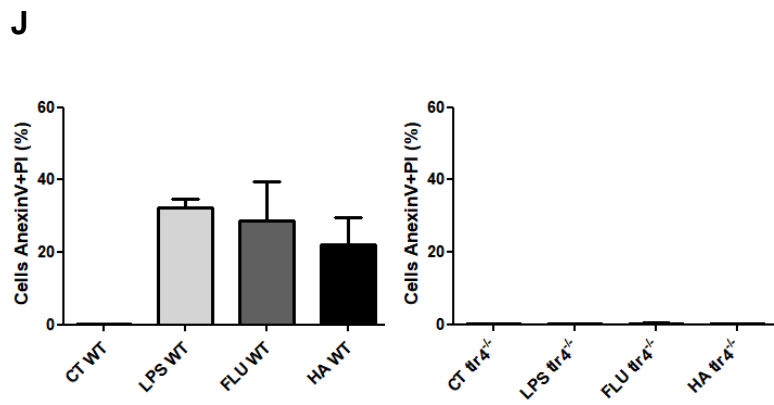
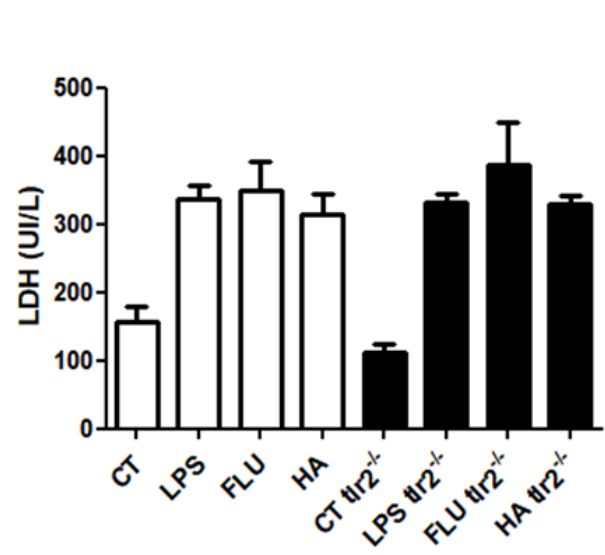
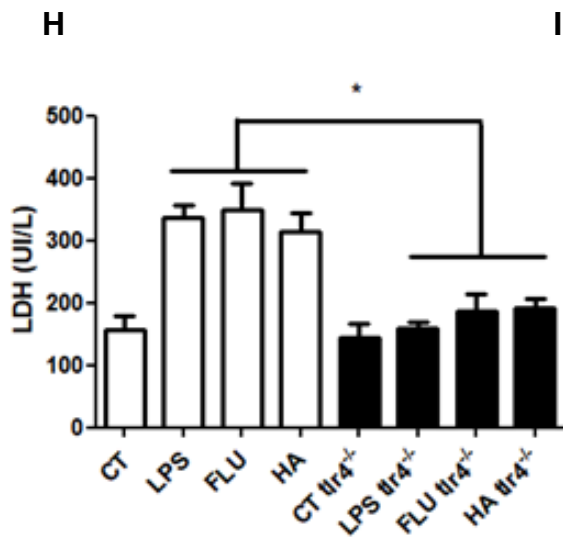
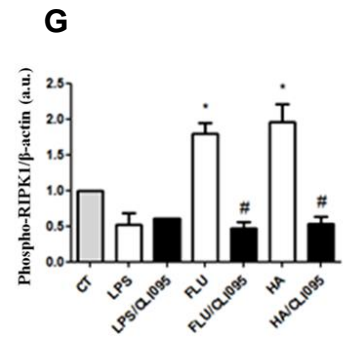
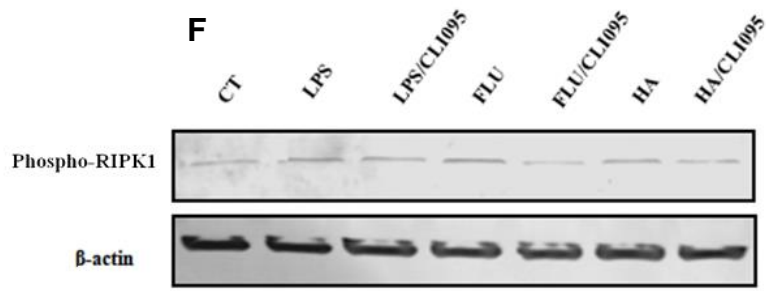


**D**

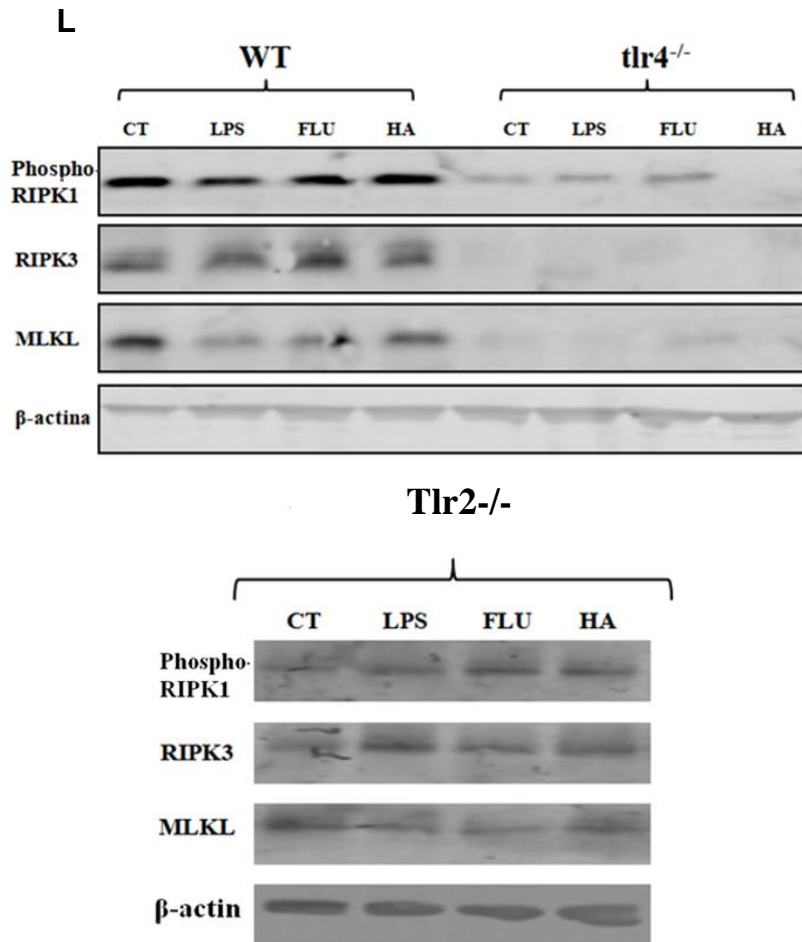
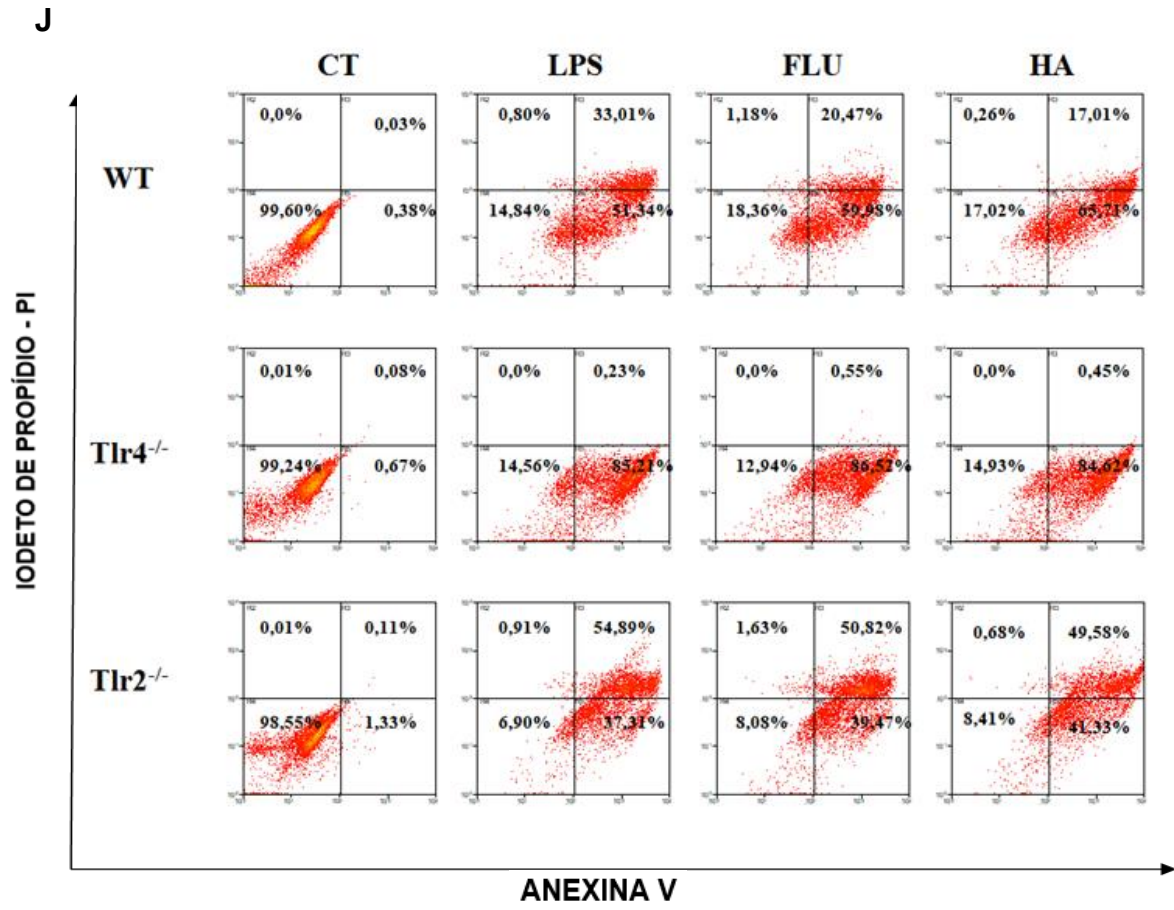


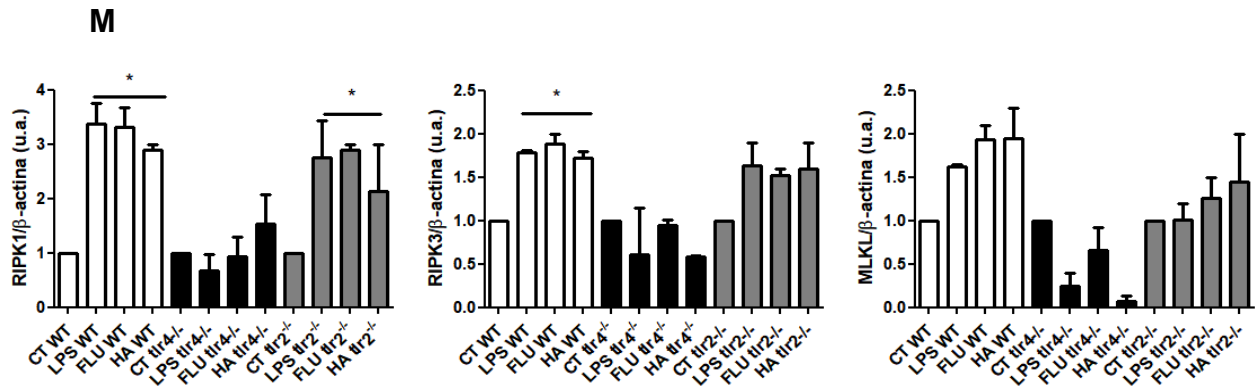
**E**









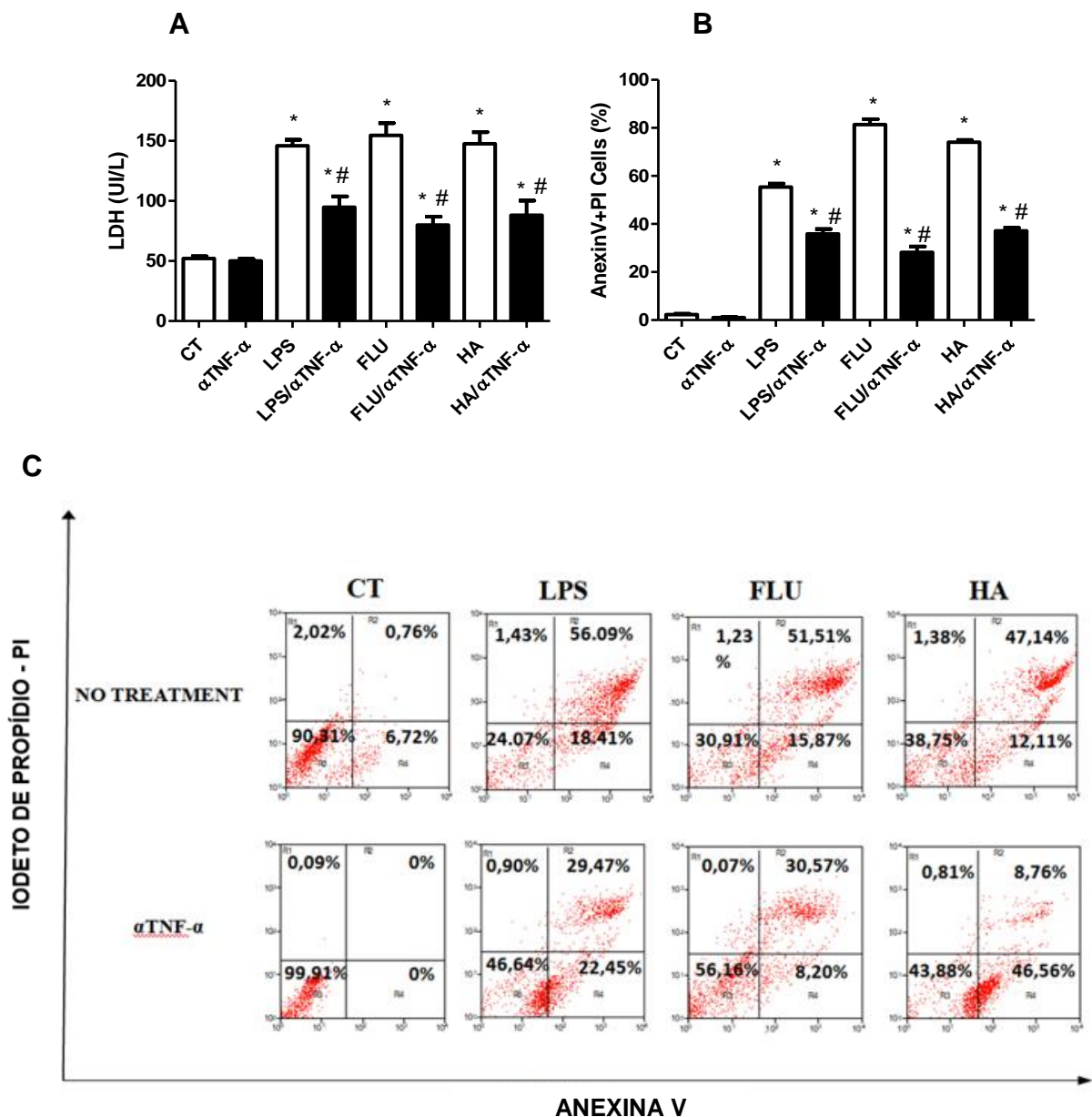


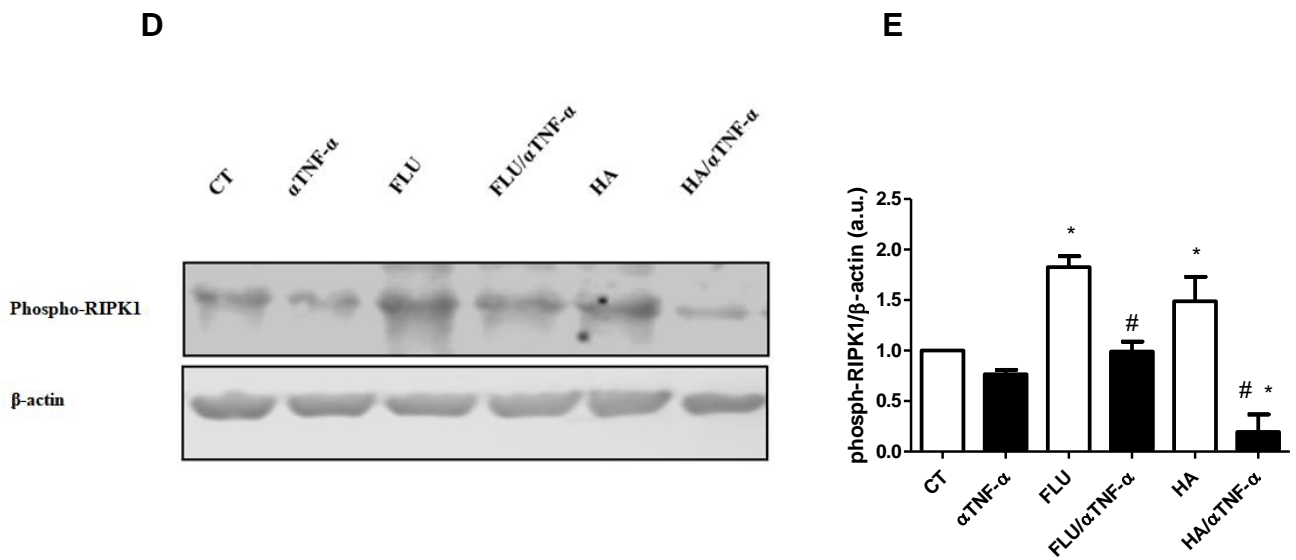
**Fig. 5.2 - FLU e HA ativam a via da necroptose de maneira dependente de TLR4.**

(A) Avaliação da viabilidade celular por citotoxicidade através da medição de LDH em macrófagos murinos infectados com vírus influenza ou tratados com HA, que foram pré-tratados ou não com CLI095. (B e C) Análise da morte celular por citometria de fluxo, através da marcação com Anexina V e PI. (D e E) Quantificação da produção de TNF- $\alpha$  em sobrenadantes de cultura. (F) Western blots do lisado celular. (F e G) A quantificação dos níveis de RIPK1, normalizada por  $\beta$ -actina em cada gel é mostrada. (H e I) Avaliação da viabilidade celular por citotoxicidade através da medição de LDH em macrófagos murinos *tlr4*<sup>-/-</sup> e *tlr2*<sup>-/-</sup>, respectivamente, infectados com vírus influenza ou tratados com HA. (J e K) Análise da morte celular por citometria de fluxo em macrófagos *tlr4*<sup>-/-</sup> e *tlr2*<sup>-/-</sup>, respectivamente, marcados com anexina V e PI. (L) Western blots do lisado celular. (M) A quantificação dos níveis de fosfo-RIPK1, RIPK3 e MLKL, normalizada por  $\beta$ -actina em cada gel é mostrada. \* P < 0,05 em relação ao grupo controle e # P < 0,05 em relação aos seus respectivos estímulos sem pré-tratamento. Gráficos e imunoblots representativos de três experimentos.

### 5.3 A indução da produção de TNF- $\alpha$ por FLU e HA contribui para a ativação da necroptose

Para avaliar se TNF- $\alpha$  também contribui para a ativação da via de necroptose, realizaram-se experimentos usando anticorpo anti-TNF- $\alpha$ . O bloqueio de TNF- $\alpha$  foi capaz de reverter parcialmente o efeito citotóxico nestas células, conforme determinado pela liberação de LDH nos sobrenadantes das células (Fig. 5.3A) e confirmado por citometria de fluxo (Fig. 5.3B e 5.3C). Além disso, análises por Western Blot demonstraram que a neutralização de TNF- $\alpha$  foi capaz de diminuir os níveis de RIPK1 em macrófagos infectados com FLU e estimulados com HA (Fig. 3D e 3E).

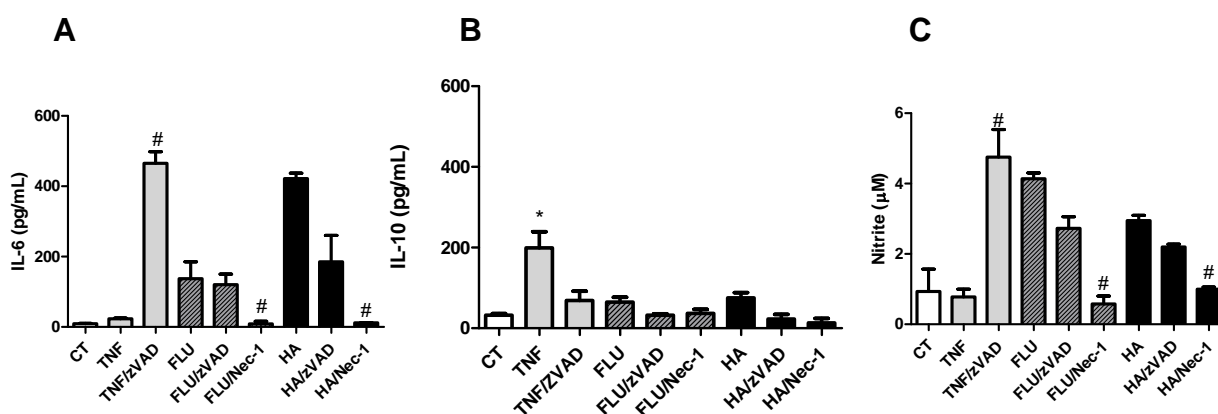




**Fig. 5.3 - A indução da produção de TNF- $\alpha$  por vírus da Influenza e HA contribui para o estabelecimento da necroptose.** (A) Avaliação da viabilidade celular por citotoxicidade através da medição de LDH em macrófagos murinos infectados com FLU ou tratados com HA, que foram pré-tratados ou não com  $\alpha$ TNF- $\alpha$ . (B e C) Análise da morte celular por citometria de fluxo, através da marcação com anexina V e PI. (D) Western blots do lisado celular. (E) A quantificação dos níveis de fosfo-RIPK1, normalizada por  $\beta$ -actina em cada gel é mostrada. # P <0,05 em relação aos seus respectivos estímulos sem pré-tratamento. Gráficos e imunotransferência representativos de três experimentos.

## 5.4 Necroptose induzida por FLU e HA promove um perfil de resposta inflamatória exacerbado

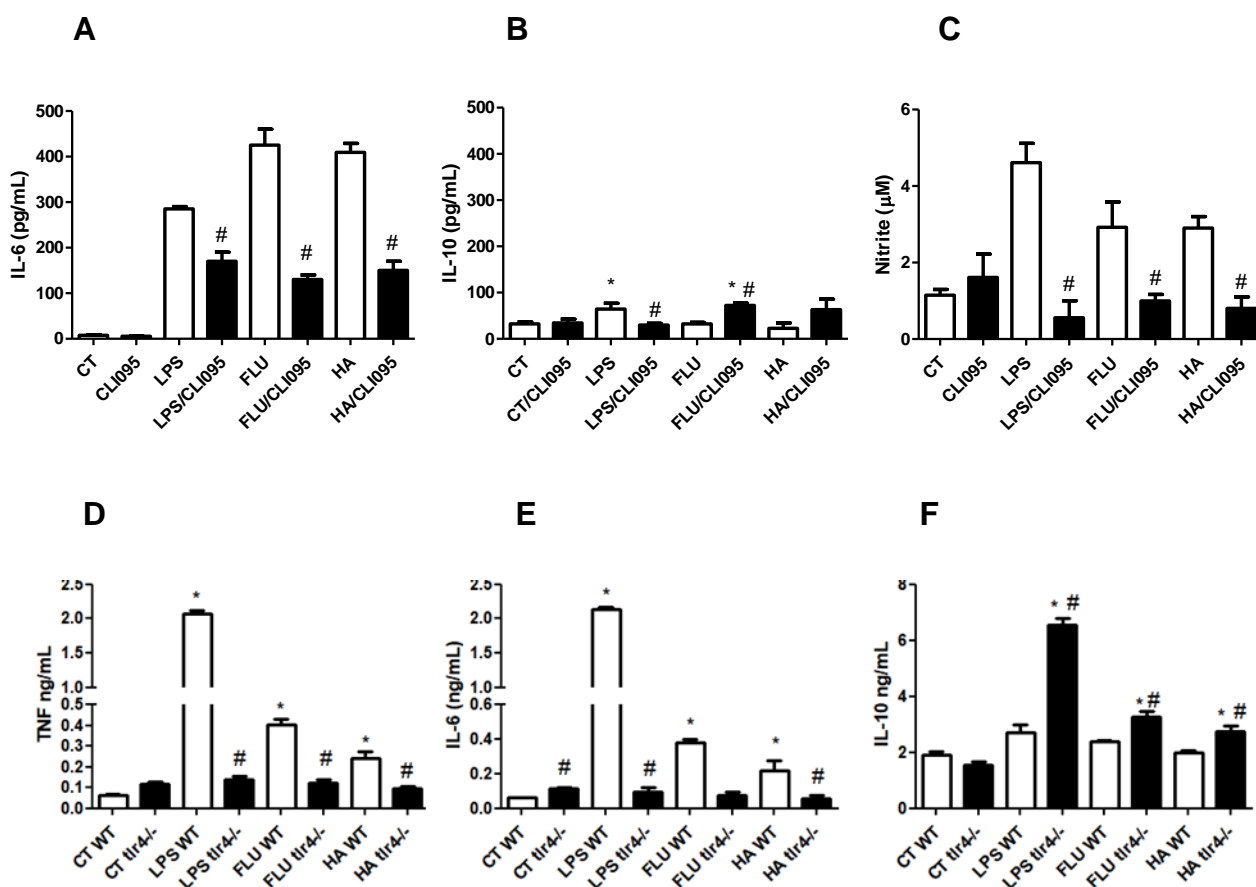
Para explorar o efeito da necroptose induzida por FLU e HA na resposta inflamatória dos macrófagos, investigamos o perfil inflamatório das citocinas produzidas por essas células. A produção de IL-6 de macrófagos infectados com FLU ou tratados HA foi drasticamente prevenida nos grupos pré-tratados com Nec-1 (Fig. 5.4A). Entretanto, a produção de IL-10 não foi aumentada nos grupos pré-tratados com Nec-1 (Fig. 5.4B). Para confirmar esses dados, medimos a produção de nitrito e observamos que também foram reduzidos nos grupos pré-tratados com Nec-1 (Fig. 5.4C).

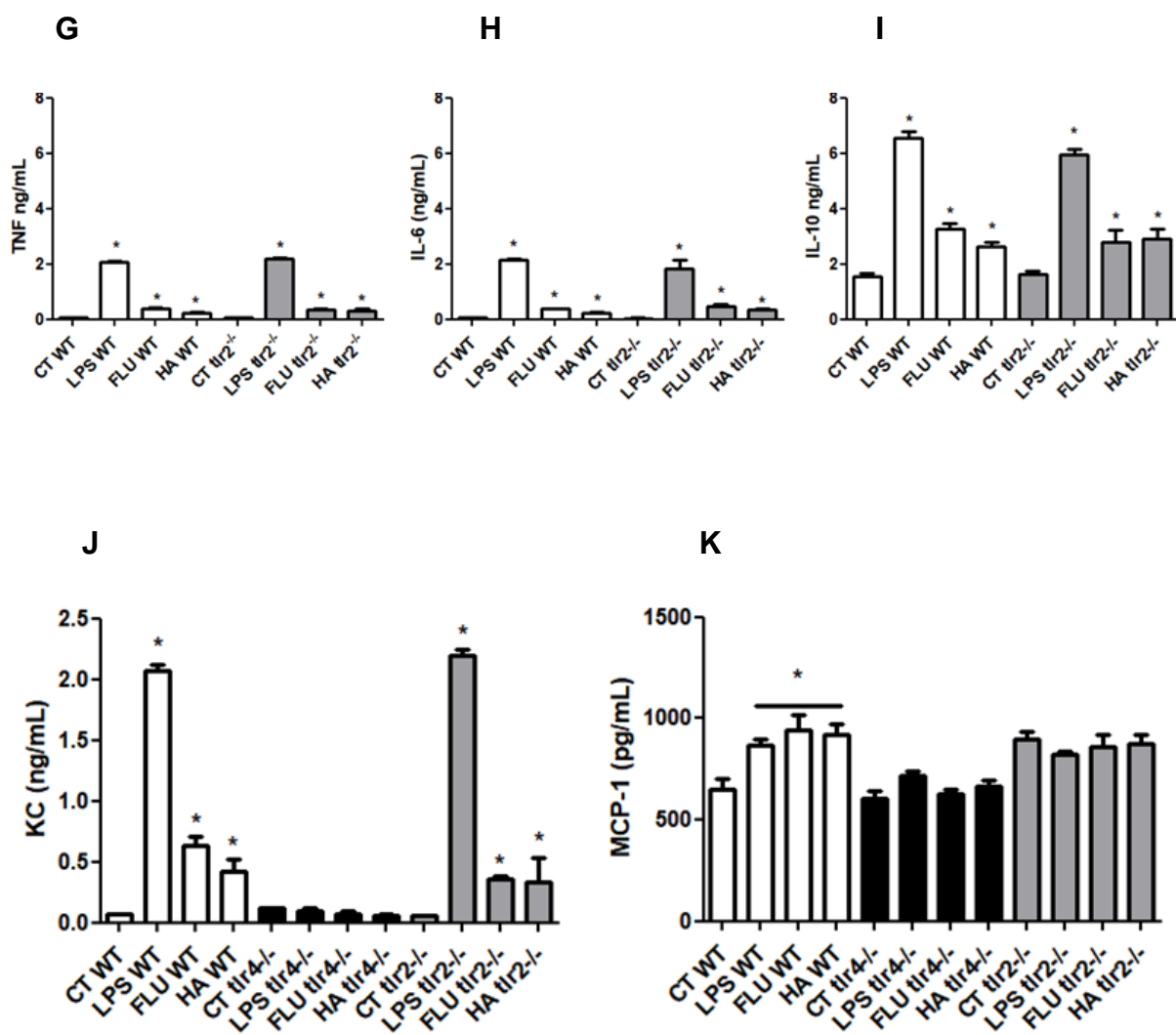


**Fig. 5.4 - Necroptose induzida por vírus da FLU e HA promove um perfil de resposta inflamatória exacerbado.** (A) Quantificação da produção de IL-6, (B) IL-10 e nitrito (C) em sobrenadantes de cultura infectados com FLU ou tratados com HA ou TNF- $\alpha$ , que foram pré-tratados ou não com zVAD ou Nec-1. \* P < 0,05 em relação ao grupo controle. # P < 0,05 em relação aos seus respectivos estímulos sem pré-tratamentos. Gráficos representativos de três experimentos.

## 5.5 A ativação de TLR4 por FLU e HA contribuem para uma resposta inflamatória exacerbada

Para avaliar o papel do TLR4 no perfil de resposta inflamatória induzida pelo processo de necroptose, bloqueamos este receptor e medimos a produção de citocinas após o tratamento com FLU/HA. O pré-tratamento com CLI095 foi capaz de prevenir a produção de IL-6 (Fig. 5.5A). Além disso, os níveis de IL-10 foram significativamente maiores nos grupos pré-tratados com CLI095 e infectados com FLU, porém não houve diferença no grupo tratado com HA (Fig. 5.5B). Para confirmar esses dados, o pré-tratamento com CLI095 foi capaz de reverter a produção de nitrito (Fig. 5.5C). Corroborando com os dados acima, macrófagos *tlr4*<sup>-/-</sup> produzem quantidades significativamente mais baixas de TNF- $\alpha$  e IL-6 (Fig. 5.5D e 5.5E, respectivamente) e quantidades mais elevadas de IL-10 (Fig. 5.5F), enquanto que não se observou alterações significativas nas quantidades de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 nos macrófagos *tlr2*<sup>-/-</sup> em relação aos macrófagos WT (Fig. 5.5G, 5.5H e 5.5I, respectivamente). Além disso, a produção de quimiocinas MCP-1 e KC foi reduzida nos *tlr4*<sup>-/-</sup> macrófagos (Fig. 5.5J e 5.5K, respectivamente).

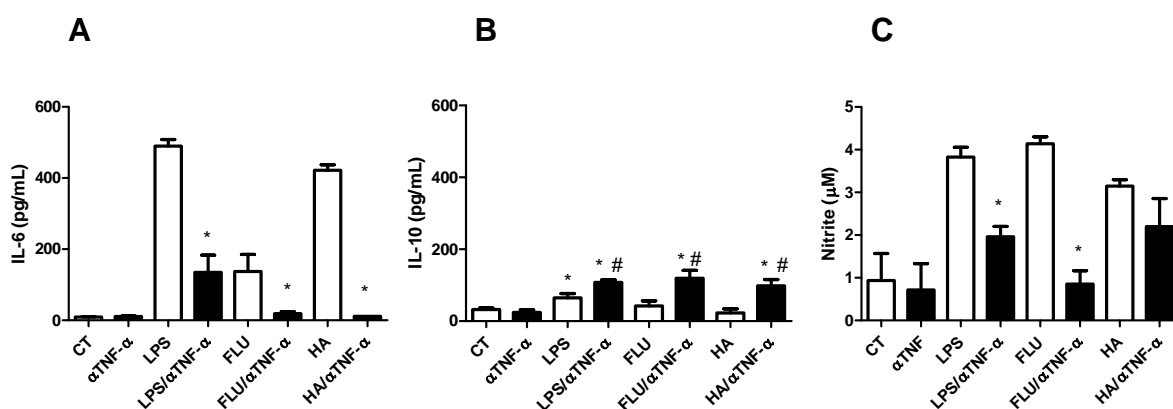




**Fig. 5.5 - A ativação de TLR4 contribui para uma resposta inflamatória exacerbada.** (A) Quantificação de IL-6, (B) IL-10 e (C) nitrito em sobrenadantes de macrófagos infectados com FLU ou tratados com HA, que foram pré-tratados ou não com CLI095. (D, E e F, respectivamente) quantificação da produção de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-10 em macrófagos WT ou *tlr4*<sup>-/-</sup> e (G, H e I, respectivamente) em macrófagos de animais *tlr2*<sup>-/-</sup>. (J e K, respectivamente) quantificação da produção de KC e MCP-1 em macrófagos de animais *tlr4*<sup>-/-</sup> e *tlr2*<sup>-/-</sup>. \* P <0,05 em relação ao grupo controle. # P <0,05 em relação aos seus respectivos estímulos sem pré-tratamento. Gráficos representativos de três experimentos.

## 5.6 A inflamação da necroptose promovida pela FLU e HA depende da produção de TNF- $\alpha$

Para confirmar a importância da produção de TNF- $\alpha$  na resposta inflamatória promovida pela necroptose, bloqueamos o TNF- $\alpha$  nas culturas de macrófagos. A produção de IL-6 foi drasticamente prevenida nos grupos pré-tratados com  $\alpha$ TNF- $\alpha$  (Fig. 5.6A). Além disso, a concentração de IL-10 foi significativamente maior nos grupos pré-tratados com  $\alpha$ TNF- $\alpha$  (Fig. 5.6B). Para confirmar esses resultados, a produção de nitrito foi medida, e a produção desse mediador inflamatório foi revertida nos grupos pré-tratados com  $\alpha$ TNF- $\alpha$  (Fig.5.6C).

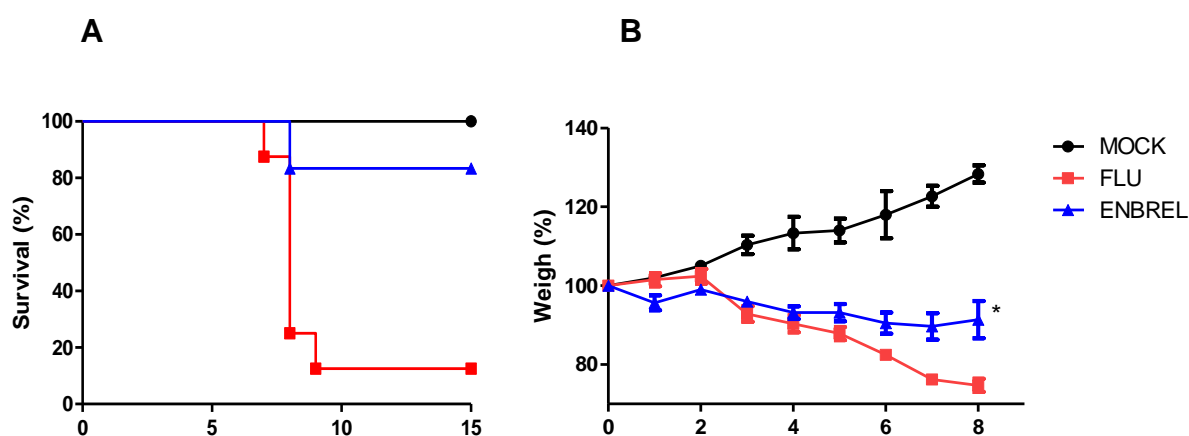


**Fig. 5.6 - O perfil de resposta inflamatória da necroptose depende da produção de TNF- $\alpha$ .** (A) Quantificação de IL-6, (B) IL-10 e (C) nitrito em sobrenadantes de culturas de macrófagos infectados com FLU ou tratados com HA, que foram pré-tratados ou não com  $\alpha$ TNF- $\alpha$ . \* P <0,05 em relação ao grupo controle. # P <0,05 em relação aos seus respectivos estímulos sem pré-tratamento. Gráficos representativos de três experimentos.



## 5.7 Tratamento anti-TNF- $\alpha$ tem efeito protetor em animais infectados com vírus da FLU

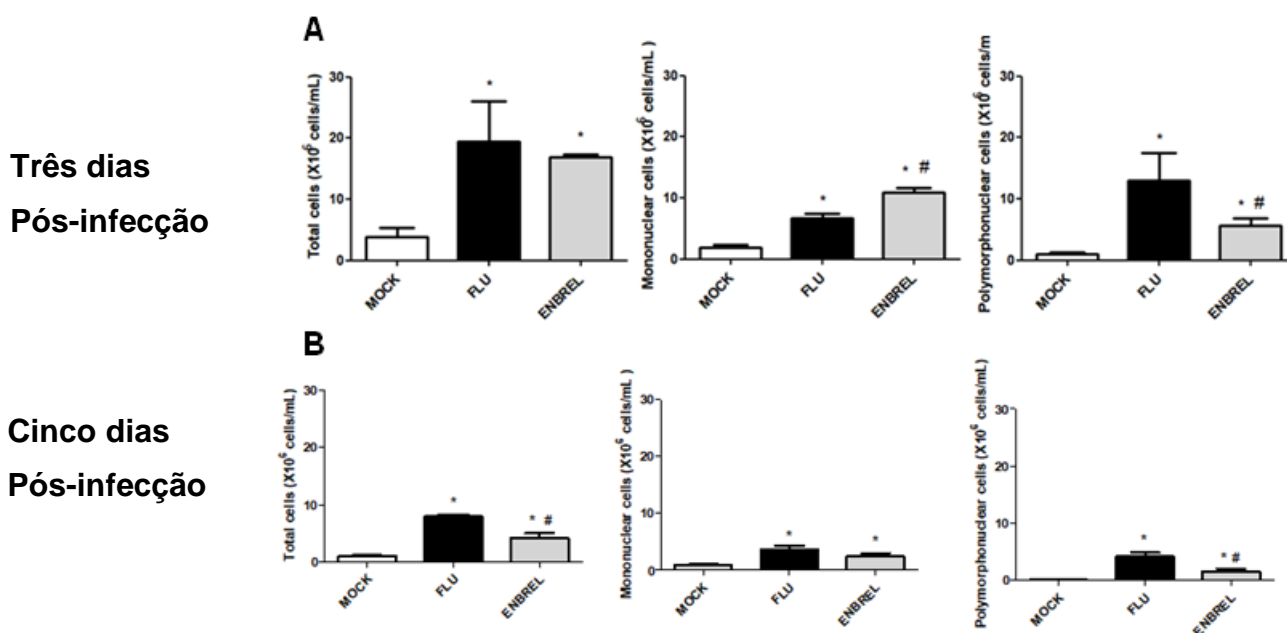
Uma vez que nossos resultados demonstram que a indução de necroptosis por FLU e HA é dependente da produção de TNF- $\alpha$  através da ativação de TLR4, investigamos o potencial terapêutico de Etanercept em um modelo de infecção por FLU in vivo. Nossos resultados demonstram que o tratamento com Etanercept é capaz de aumentar significativamente a sobrevivência de animais infectados com FLU em relação a animais infectados e não tratados (Fig. 5.7A). Além disso, os animais tratados com Etanercept tiveram uma manutenção do peso corporal, enquanto os animais não tratados perdem peso gradualmente durante a infecção (5.7B).



**Fig. 5.7 - O tratamento anti-TNF- $\alpha$  tem efeito protetor em animais infectados com vírus influenza.** (A) Os camundongos foram monitorados quanto à sobrevivência e (B) perda de peso corporal. Os dados foram derivados de dois experimentos separados, com um total de 20 camundongos por grupo (10 camundongos por grupo a cada vez). As curvas de sobrevivência mostram dados até o dia 15 após a infecção. #  $P < 0,05$  em relação aos seus respectivos estímulos sem pré-tratamento. Gráficos representativos de dois experimentos.

## 5.8 Tratamento anti-TNF- $\alpha$ previne a formação de infiltrado inflamatório pulmonar

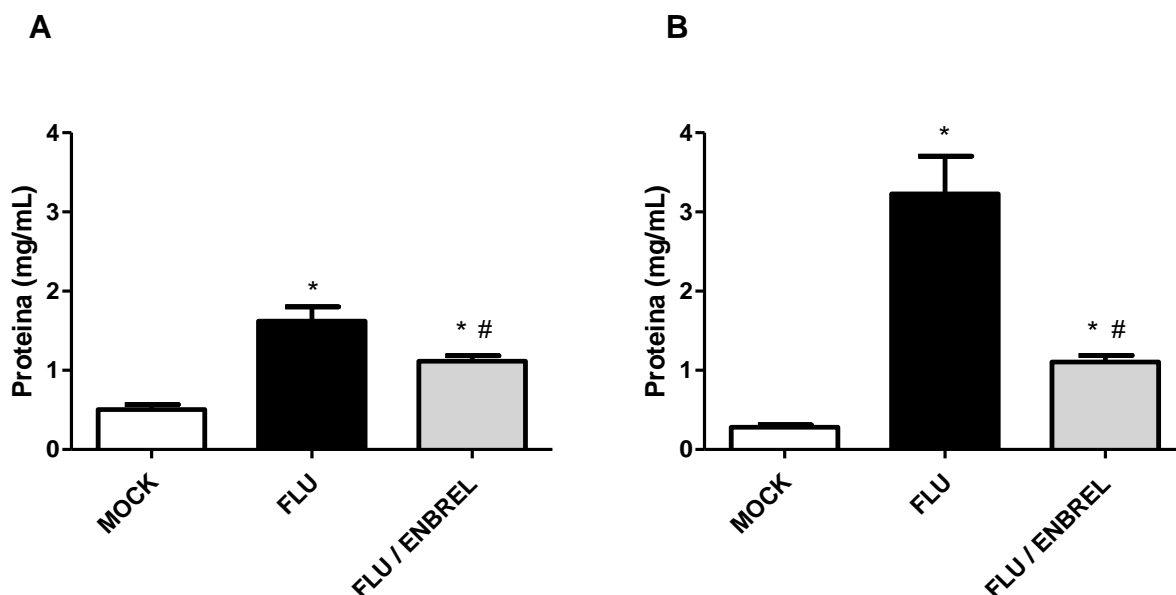
O tratamento com ENBREL aumentou o número de células mononucleares na lavagem broncoalveolar (BAL) dos animais no terceiro dia, mas não interferiu com o número total de células presentes no BAL (Fig. 5.8A). No quinto dia pós-infecção, o tratamento com ENBREL, apesar de não interferir no número de células mononucleares presentes no BAL, diminuiu significativamente o número de células totais presentes no pulmão (Fig. 5.8B).



**Fig. 5.8 - O tratamento anti-TNF- $\alpha$  previne o processo inflamatório pulmonar.** Quantificação da infiltração de células inflamatórias no BAL de camundongos infectados com FLU. (A) No terceiro dia e (B) cinco dias após a infecção. \*  $P < 0,05$  em relação ao grupo controle. #  $P < 0,05$  em relação aos seus respectivos estímulos sem pré-tratamento. Gráficos representativos de dois experimentos.

## 5.9 Tratamento anti-TNF- $\alpha$ previne a formação de edema pulmonar

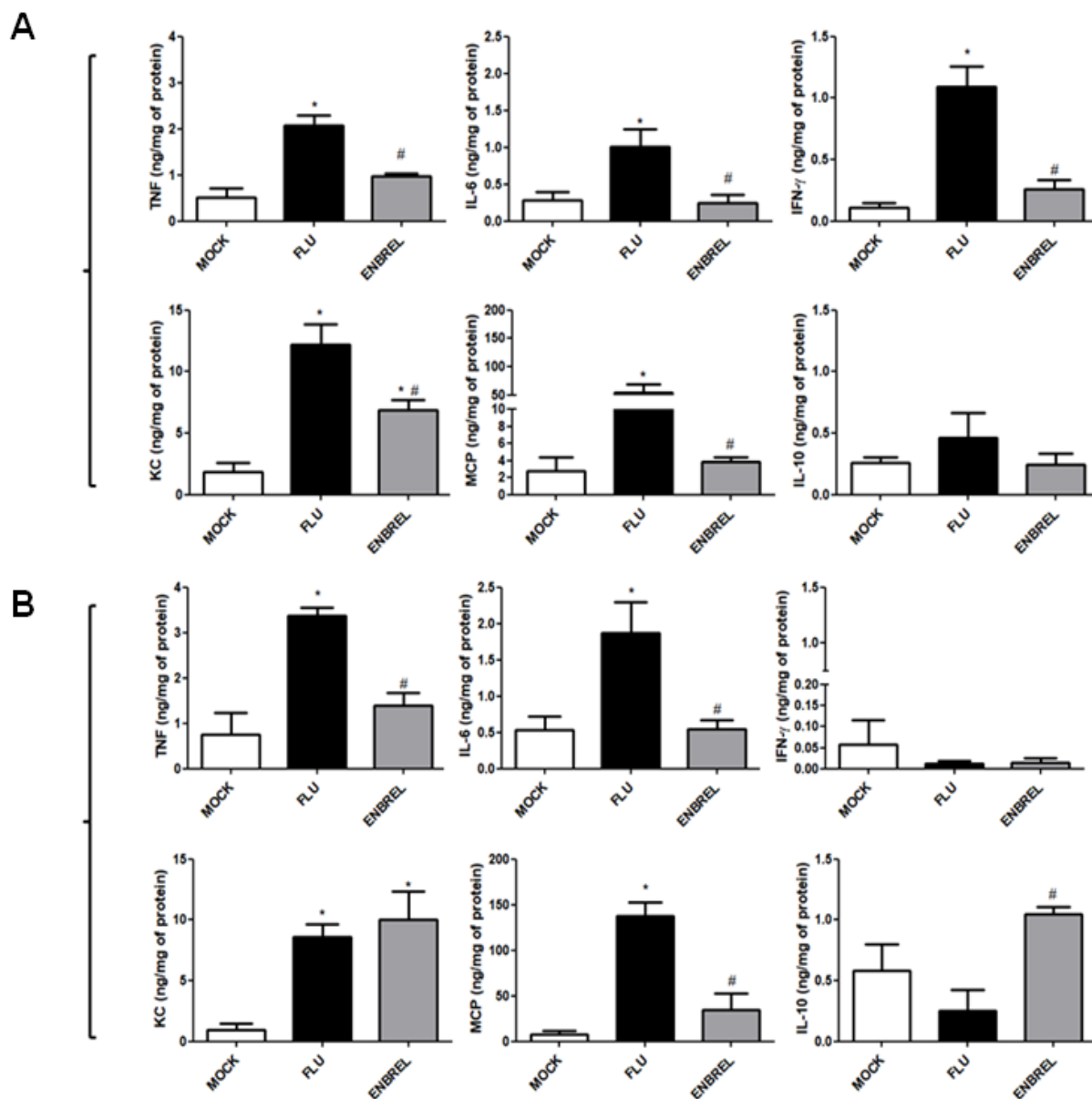
Para provar a eficácia do nosso modelo in vivo, foram realizadas outras avaliações inflamatórias. A quantificação de proteínas presentes no BAL demonstrou que o tratamento com ENBREL preveniu a formação de edema pulmonar tanto no terceiro quanto no quinto dia pós-infecção (Fig. 5.9A e 5.9B, respectivamente).



**Fig. 5.9 - O tratamento anti-TNF- $\alpha$  previne a formação de edema pulmonar.** Avaliação do edema pulmonar no BAL de camundongos infectados com FLU. (A) No terceiro dia e (B) cinco dias após a infecção. \*  $P < 0,05$  em relação ao grupo controle. #  $P < 0,05$  em relação aos seus respectivos estímulos sem pré-tratamento. Gráficos representativos de dois experimentos.

## 5.10 Tratamento anti-TNF- $\alpha$ previne a formação de um intenso processo inflamatório pulmonar

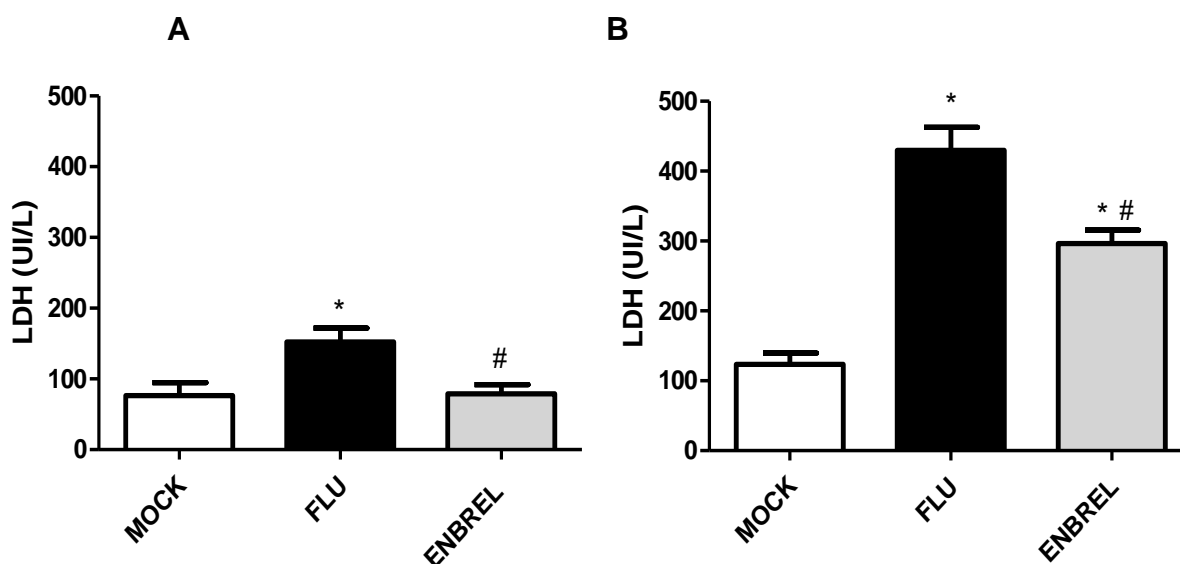
Corroborando com nossos dados anteriores, o tratamento anti-TNF- $\alpha$  foi capaz de inibir a produção de TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , MCP-1 e KC e aumento da produção de IL-10 no BAL desses animais tanto no terceiro quanto no quinto dia pós-infecção (Fig. 5.10A e 5.10B, respectivamente).

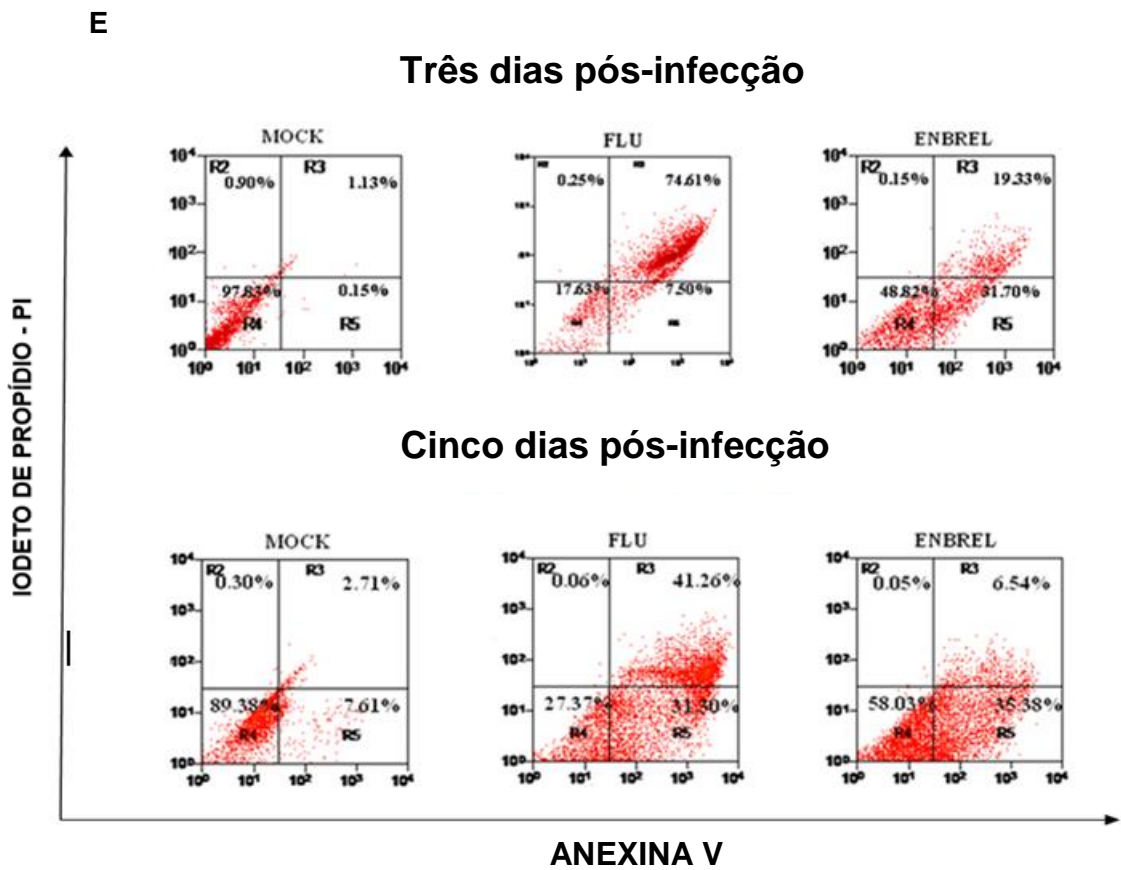
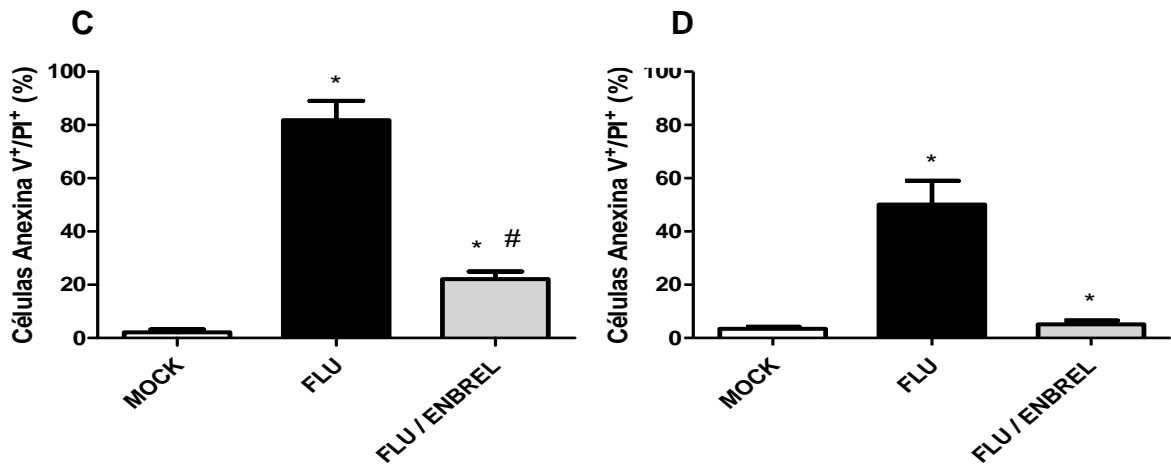


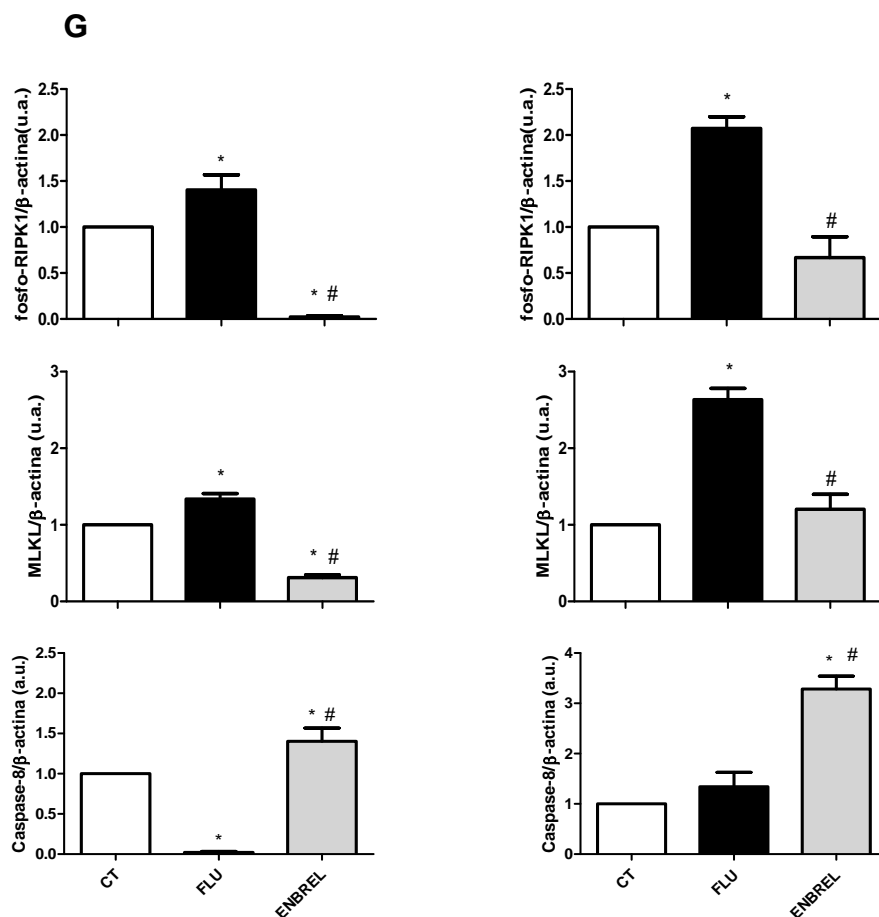
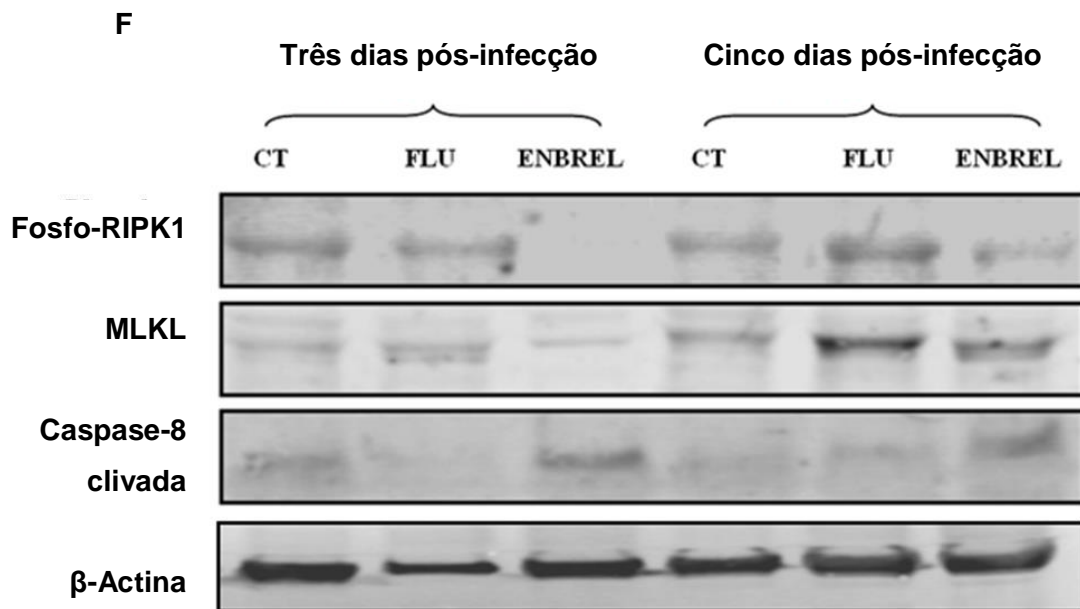
**Fig. 5.10 - O tratamento anti-TNF- $\alpha$  previne o processo inflamatório intenso pulmonar.** Quantificação da produção de TNF- $\alpha$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , KC, MCP-1 e IL-10 em camundongos infectados com FLU. (A) Três e (B) cinco dias após a infecção. \*  $P < 0,05$  em relação ao grupo controle. #  $P < 0,05$  em relação ao grupo controle. Gráficos representativos de três experimentos.

## 5.11 O tratamento anti-TNF- $\alpha$ previne o processo de necroptose em animais infectados com FLU

Finalmente, avaliamos a indução da necroptose em relação ao efeito do tratamento anti-TNF- $\alpha$  em animais infectados com o vírus da FLU. O teste de citotoxicidade demonstrou que o tratamento com ENBREL foi capaz de diminuir significativamente as quantidades de LDH presentes no BAL dos animais infectados no terceiro e quinto dia pós infecção (Fig. 5.11A e 5.11B, respectivamente). Estes resultados foram confirmados através da técnica de citometria de fluxo, também no terceiro e quinto dia pós-infecção (Fig. 5.11C e 5.11D, respectivamente e fig. 5.11E). A análise Western Blot demonstrou que o tratamento anti-TNF- $\alpha$  é capaz de diminuir os níveis de fosfo-RIPK1, MLKL e aumentar os níveis de Caspase-8 no tecido pulmonar dos animais infectados (Fig. 5.11F e 5.11G).







**Fig. 5.11 - O tratamento anti-TNF inibe a necroptose.** (A e B) Avaliação da viabilidade celular por citotoxicidade através da medição de LDH no BAL dos camundongos. (C, D e E) Análise da morte celular por citometria de fluxo, por rotulagem em células apresenta em BAL dos camundongos. (F) Western blot do lisado pulmonar. (G) Quantificação dos níveis de fosfo-RIPK1, MLKL e Caspase-8 clivada, normalizados por β-actina em cada gel. \* P <0,05 em relação ao grupo CT. # P <0,05 em relação ao grupo FLU. Gráficos e imunoblots representativos de três experimentos.

## 6 DISCUSSÃO

Atualmente é bem definido que a infecção pelo vírus influenza na maioria dos casos, é caracterizada por um quadro clínico relativamente brando e auto-resolutivo, onde as células imunes inatas possuem papéis específicos no combate, no entanto, esses papéis de proteção podem ser comprometidos na patogênese viral associada a uma resposta imunológica descontrolada levando a pior resultado. A mortalidade pode ser causada por danos no tecido do hospedeiro, aumento da replicação viral ou ambos. Estes efeitos podem ser induzidos pelo vírus ou por fatores genéticos do hospedeiro, como maior sensibilidade das respostas de células inatas as partículas virais (Cole & Ho, 2017). Grande parte de nossos saberes em relação a esses mecanismos imunes efetores foram estabelecidos em modelos animais, uma vez que estudos em humanos, particularmente nos pulmões, são difíceis de serem estabelecidos e escassos. O conhecimento da relação entre as células da imunidade inata e a ação patogênica do vírus pode ser a chave para o estabelecimento de estratégias para o gerenciamento da gripe.

Além disso, a gripe tem um grande impacto na saúde pública, uma vez que é uma das principais causas de morbidade na população mundial (Damjanovic *et al.*, 2012), sendo a sua ocorrência uma espécie de porta de entrada para várias coinfeções secundárias (Cawcutt & Kalil, 2017), o que ficou ainda mais patente durante a pandemia pelo vírus influenza A H1N1 em 2009, quando uma etiologia viral e bacteriana combinada foi detectada em cerca de 30% dos pacientes hospitalizados com Influenza (CDC, 2009).

Devido a esses fatos, se torna cada vez mais urgente a compreensão, não apenas dos mecanismos de ação do vírus influenza no processo infeccioso, mas também como a resposta imune inata pode provocar ainda mais danos ao hospedeiro, visto que essa resposta descontrolada está associada aos casos mais graves da doença.

Já é conhecido que tanto os macrófagos alveolares quanto monócitos presentes na circulação pulmonar (Herold *et al.*, 2006), em conjunto com outras células imune, são capazes de orquestrar a resposta imune local de forma eficiente



para o controle da infecção do vírus influenza (Schneider *et al.*, 2014; Pawelek *et al.*, 2016). Porém, apesar dos macrófagos, de uma forma geral, conseguirem controlar a infecção e gerar uma resposta protetora ao hospedeiro, vários estudos demonstram que nos casos mais graves da doença, os macrófagos estão associados a vários fatores de danos produzidos no trato respiratório (Woo *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2018).

Sakabe e colaboradores (2011) demonstram que a ativação descontrolada de macrófagos contribui para o estabelecimento da fisiopatologia da gripe através da produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias. Além disso, uma infecção pelo vírus da gripe induz um grande infiltrado de células inflamatórias não pulmonares, principalmente monócitos que se diferenciam em macrófagos, contribuindo para amplificar a resposta imune, gerando o fenômeno de cytokine storm, o que serve como um prognóstico para um resultado mais grave da patologia (Perrone *et al.*, 2008). Esses dados demonstram que o entendimento dessa dualidade de possíveis resposta dos macrófagos na influenza (PROTEÇÃO X DANO) pode ser crucial para o estabelecimento de novas estratégias terapêuticas para a doença.

Duas das grandes características da fisiopatologia da influenza é a intensa morte celular no sítio infeccioso, tanto de células epiteliais pulmonares, quanto de macrófagos (Armstrong *et al.*, 2012; Zeng *et al.*, 2012) e a intensa produção de citocinas pró-inflamatórias produzidas no microambiente pulmonar (Tisoncik *et al.*, 2012). No entanto, apesar de nenhum trabalho, até o momento, conseguir relacionar claramente como a morte de macrófagos junto com a cytokine storm, podem contribuir para a piora do quadro clínico da gripe, já foi demonstrado que esse fenômeno de morte dos macrófagos e a produção exacerbada de citocinas estão associadas e contribuem para o estabelecimento das formas mais graves da doença (Aldridge *et al.*, 2009; Chang *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016).

Alguns estudos mostraram que a apoptose dos macrófagos alveolares pode contribuir para o controle da infecção, que é o resultado da inibição dos fenômenos de replicação viral e da produção de citocinas pró-inflamatórias (Chang *et al.*, 2015). Mas se torna difícil entender como a apoptose de macrófagos poderia desencadear o processo de produção descontrolada de citocinas pró-inflamatórias, uma vez que a apoptose é classicamente descrita como um mecanismo de morte celular de perfil

anti-inflamatório, o que nos leva a crer que um outro tipo de morte celular está envolvido nesse processo, a necroptose (Wang *et al.*, 2016).

Nossos dados demonstraram que tanto a FLU como a HA são capazes de induzir o processo de morte celular, no entanto, em nossos experimentos, confirmamos que o tipo de morte celular predominante em nosso modelo de influenza grave, não foi a apoptose clássica, mas a necroptose.

Nossos resultados demonstram, através da inibição farmacológica da ativação de RIPK1, que o processo de morte celular foi prevenido em macrófagos estimulados por HA e infectados por FLU. Esse dado é extremamente relevante pois demonstra que não apenas o vírus induz a esse processo de morte, mas que apenas uma proteína do capsídeo viral, a HA, é capaz de desencadear esse fenômeno. Esse resultado torna ainda mais urgente o estudo da função da hemaglutinina na doença, pois a HA é o principal componente da vacina anual para influenza, e as estratégias de vacinação custeadas pelos governos são muito focadas em grupos de pacientes com maior risco de desenvolver infecções mais graves, como crianças, idosos, mulheres grávidas e indivíduos imunossuprimidos. Logo, entender o papel da HA, principalmente nesses grupos de risco, é primordial.

Além disso, nossos resultados confirmam o fato que este fenômeno de morte celular pode estar envolvido em um piora do quadro clínico na infecção pelo vírus da gripe, uma vez que desencadeia vários eventos inflamatórios do tecido não-pulmonar, promovendo infiltração inflamatória, ativação de outras células imunes através da ativação de receptores de padrão (Wang *et al.*, 2016).

Entretanto, não se sabe exatamente quais seriam os mecanismos de ativação da necroptose na gripe, mas o que se sabe é que as células que sofrem esse processo de morte celular, além de ter seus conteúdos citoplasmáticos liberados para o ambiente extracelular, que desempenham o papel de fatores associados ao dano, eles também podem liberar produtos virais que ativam outros macrófagos, ampliando assim a resposta inflamatória. O que nos levou a considerar a importância dos receptores de imunidade inata nesse processo (Wang *et al.*, 2016), especialmente o papel do TLR4 na necroptose.

Nossos dados demonstraram, em nosso modelo *in vitro*, que a promoção de necroptose por FLU e HA é dependente da ativação do TLR4, o que observamos não apenas através de ensaios de inibição farmacológica de TLR4 em macrófagos murinos, mas também através de macrófagos derivados de animais *tlr4<sup>-/-</sup>* desafiados com FLU e HA. Além disso, para confirmar que nossos dados não foram artefatos ou que outro TLR de superfície importante na gripe pudesse estar interferindo no processo, nossos experimentos com macrófagos de animais *tlr2<sup>-/-</sup>* sugerem que TLR2 não participa do processo de necroptose em infecções pelo vírus influenza. Porém, apesar de podermos afirmar se a HA ativa direta ou indiretamente TLR4, nossos resultados são corroborados com os dados na literatura, que já demonstram o potencial imunogênico do HA (Liu et al., 2010).

Nosso trabalho demonstra que essa ativação de TLR4 pode ser a chave para o desencadeamento de diversos outros fatores de amplificação da resposta inflamatória no tecido pulmonar, pois a morte celular intensa promovida pela ativação desses receptores pode gerar uma onda de produção de diversos mediadores inflamatórios. Entretanto, a resposta imune gerada por FLU e HA é complexa, e além disso, TLR4 também pode induzir a apoptose (Ermolaeva *et al.*, 2008), o que nos levou a investigar quais outros fatores poderiam estar associados a TLR4 na geração do processo de necroptose.

Como o fenômeno de cytokine storm é um dos processos mais importantes nos casos graves de gripe e que uma das citocinas mais importantes e centrais nesse processo é o TNF- $\alpha$ , ou seja, a ação dessa citocina nesse fenômeno de necroptose é dependente da ativação de TLR4. Nossos dados sugerem que a ativação de TLR4 induz a produção acentuada de TNF- $\alpha$ , que atua parácrina e autocrinamente sobre os macrófagos, ampliando o sinal de necroptose. Nossos dados de inibição de TNF- $\alpha$  mostraram uma prevenção parcial da necroptose, o que pode ser explicado pelo fato de termos usado anticorpos de detecção de kit de ELISA (R&D System) em uma concentração que pode estar subestimando o real potencial de nossos experimentos. Ainda assim, nossos dados demonstram que TNF- $\alpha$  participa de forma ativa de processo de indução de necroptose.

Além disso, esse processo ativação de TLR4 mais a produção subsequente de TNF- $\alpha$ , não apenas induz a necroptose, como a uma resposta inflamatória

extremamente agressiva, uma vez que nossos ensaios de inibição farmacológica de necroptose, TLR4 e TNF- $\alpha$  mostraram uma prevenção significativa da produção de diversos mediadores inflamatórios como IL-6 e óxido nítrico. Também avaliamos a produção da citocina anti-inflamatória IL-10, e em nossos dados de inibição de necroptose não vimos diferenças significativas, o que pode ser explicado pelo fato dessa citocina ser produzida em uma segunda onda da cytokine storm, e por outras células que migram para o pulmão na infecção.

Porém, nossos dados sugerem que TLR4 pode ser de importância chave na regulação da resposta inflamatória na patologia da influenza tanto no controle da necroptose, quanto na inibição de TNF- $\alpha$ , uma vez que a produção de IL-10 foi significativamente aumentada em nossos ensaios de inibição farmacológica de TLR4 e em nossos ensaios utilizando macrófagos de animais *tlr4<sup>-/-</sup>*. Nesses dados, observamos uma relação inversamente proporcional na relação TNF- $\alpha$ /IL-10, onde o aumento da produção de IL-10 foi acompanhado pela diminuição de TNF- $\alpha$ . Uma vez que, como já comentamos anteriormente nesse trabalho, a IL-10 não é uma citocina produzida no início da cytokine storm e que TNF- $\alpha$  é a citocina central desencadeadora desse fenômeno, podemos observar em nossos dados uma possível forma de controle dos fenômenos de morte celular e cytokine storm, onde a inibição da produção de TNF- $\alpha$  pode ser um potencial alvo terapêutico no controle das formas graves de influenza.

Nessa linha de pensamento, a busca de novos tratamentos se tornou ainda mais urgente, pois, apesar dos medicamentos antivirais poderem ser usados para tratar ou prevenir a infecção por influenza, durante as últimas estações de gripe, foram identificadas altas taxas de resistência aos antivirais existentes, principalmente nos períodos de surtos em ambientes de saúde, como hospitais e instituições residenciais (Boktor & Hafner, 2017). Além disso, resistência a antivirais clássicos como Oseltamivir, zanamivir e peramivir que pertencem à família de inibidores da neuraminidase têm sido baixos nas estações de gripe recentes, mas o vírus pode mutar e desenvolver resistência a qualquer momento. Devido a isso, a descobertas de novos tratamentos que também tenham como alvo a regulação e controle da resposta inflamatória na infecção por influenza pode ser a melhor estratégia tanto como tratamento principal, como terapia adjuvante.

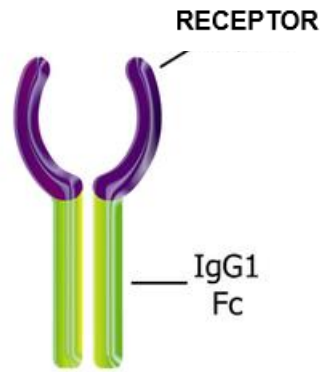
Bloqueadores de TNF- $\alpha$ , como infliximab, adalimumab, golimumab e etanercept, foram aprovados para o tratamento da artrite reumatóide e outras doenças imunomediadas. Assim, existe um grande interesse em investigar o uso de inibidores de TNF- $\alpha$  no tratamento de doenças infecciosas (Campbell *et al.*, 2011). Além disso, nossos dados em concordância com evidências recentes também identificaram um papel imunorregulador para esta citocina (Suresh *et al.*, 2005; Damjanovic *et al.*, 2011).

Uma estratégia terapêutica que tem surgido com força nos últimos anos é o uso de anticorpos monoclonais (mAbs) quiméricos, que funcionam como receptores solúveis, impedindo que as moléculas alvo se liguem aos seus receptores naturais presentes nas células destino (Martin & Bugelski, 2012). Esses anticorpos quiméricos, também chamados de produtos biofarmacêuticos são proteínas humanas que são fabricadas em células através de engenharia genética.

Tradicionalmente, os produtos biofarmacêuticos consistem em formas recombinantes de proteínas humanas endógenas para terapia de reposição ou anticorpos monoclonais e receptores solúveis de "iscas" que inibem as ações farmacológicas de proteínas ou patógenos humanos endógenos (Walsh, 2010). Já no caso de biofármacos inibidores de receptores como PAMPs, os sítios ativos de ligação desses receptores são frequentemente fundidos com o fragmento Fc de uma IgG humana (proteínas de fusão) para melhorar a sua disposição, tornando-os "semelhantes aos anticorpos" (Rojko *et al.*, 2008).

Etanercept (ENBREL<sup>®</sup>) (Figura 1.9), um agente anti-TNF- $\alpha$ , é uma proteína dimérica resultante da fusão do receptor de TNF- $\alpha$  humano p75 ligado à porção Fc de IgG1 humana (FDA, 2018), produzida por tecnologia de DNA recombinante num sistema de expressão de mamífero, o ovário de hamster chinês. O etanercept é constituído por 934 aminoácidos e tem um peso molecular aparente de aproximadamente 150 kilodaltons. Esse biofármaco é utilizado no tratamento de artrite reumatóide, artrite psoriásica, espondilite anquilosante e psoríase (Europa EU, 2017).

## Etanercept



### Proteína recombinante receptor de TNF p75/porção fc de IgG humana

**Figura 6.1 – Representação diagramática da estrutura do Etanercept.**

Representação do anticorpo monoclonal resultante da fusão da porção p75 do receptor de TNF- $\alpha$  (A) com a porção fc de IgG humana (B). Fonte: Adaptado de Poter *et al.*, 2016.

Apesar de ser utilizado classicamente na clínica no tratamento artrite reumatoide, seus efeitos anti-inflamatórios, imunorreguladores e de proteção celular levaram vários grupos de pesquisa a estudar o potencial uso desse biofármaco como tratamento de outras patologias e doenças como doença de Chagas (Barreto-de-Albuquerque *et al.*, 2015) e câncer (Yang *et al.*, 2017). Corroborando com esses dados, alguns trabalhos demonstram que esse biofármaco além de controlar além de seu potencial papel no controle da cytokine storm, também inibe o processo de necroptose em modelos *in vitro* de células mielóides leucêmicas (Chromik *et al.*, 2014; Safferthal *et al.*, 2017).

Safferthal e colaboradores (2017) identificaram que a secreção do TNF $\alpha$  contribui para um loop sinalização autócrina/parácrina como mediadores críticos da necroptose em seus modelos *in vivo*, e que a utilização de etanercept contribuiu significativamente para inibir o processo de necroptose. Esses dados indicam o potencial papel de etanercept tanto no controle do processo inflamatório quanto no controle da necroptose.

Uma vez que esse tratamento já é utilizado em tratamentos clínicos, seus efeitos adversos já são conhecidos. Enbrel é contraindicado em pacientes com septicemia ou em risco de desenvolver uma septicemia. O tratamento não deve ser iniciado em pacientes com infecções ativas sérias, incluindo infecções crônicas ou localizadas. Este medicamento é contraindicado para menores de 4 anos de idade.

Baseado nesse racional, e tendo em vista os nossos resultados demonstrando que FLU e HA ativam TLR4 induzindo a produção descontrolada de TNF- $\alpha$  o que culmina com a morte celular por necroptose dos macrófagos, e que esse fenômeno contribui para o estabelecimento de manifestações mais graves da doença, nosso trabalho explorou essa vertente emergente, utilizando uma terapia anti-TNF- $\alpha$  já utilizada na clínica atualmente, em um modelo de infecção *in vivo*.

Em nosso modelo murino de infecção grave por vírus influenza, o tratamento foi capaz de aumentar a sobrevivência dos animais durante o curso da doença e também conseguiu manter o peso corporal dos camundongos, comprovando que nosso modelo experimental de tratamento anti-TNF- $\alpha$  está de acordo com os dados publicados de Shi e colaboradores (2013), que também demonstram o potencial uso de etanercept no tratamento da gripe. Além disso, esse mesmo grupo demonstrou nesse trabalho que o tratamento com etanercept induziu a uma maior expressão de RNA mensageiro de TLR4, o que reforça ainda mais os nossos dados *in vitro* da importância de TLR4 na gripe.

Além disso, em nosso trabalho, observamos que o tratamento anti-TNF- $\alpha$  foi capaz de aumentar o número de células mononucleares no pulmão desses animais após três dias de infecção, o que pode ser um indicativo de uma menor morte celular dessas células, entretanto não observamos esse mesmo fenômeno no quinto dia pós infecção, o que sugere um efeito mais agudo desse tipo de tratamento, ou seja, agindo justamente no início do estabelecimento do processo inflamatório da doença.

Como este processo de morte celular, além de provocar uma resposta inflamatória robusta no tecido pulmonar, também é capaz de desencadear uma resposta imune descontrolada, avaliamos mais parâmetros inflamatórios em nosso modelo que demonstrou que o tratamento anti-TNF- $\alpha$  diminuiu a formação de edema pulmonar e afetou diretamente a cytokine storm, pois o tratamento preveniu a

produção de todas as citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias e induziu um aumento da produção de IL-10 presentes no BAL desses animais. Esses dados em conjunto com o trabalho de Shi e colaboradores (2013) demonstram o potencial imunorregulador de TNF- $\alpha$ , entretanto nenhum trabalho ainda foi publicado relacionando o tratamento anti-TNF- $\alpha$  com a necroptose de macrófagos na infecção por influenza.

Devido a isso, e uma vez que a morte maciça de macrófagos neste microambiente, juntamente com a produção de vários fatores inflamatórios principalmente o TNF- $\alpha$ , causam sinergismo deletério ao hospedeiro, realizamos todas as avaliações de morte celular já demonstradas anteriormente em nosso modelo *in vivo*. Em nossos dados observamos uma menor quantidade de LDH no BAL desses animais, tanto no terceiro quanto no quinto dia pós-infecção, o que indica uma amenização do efeito citotóxico no microambiente pulmonar.

Esses dados de LDH, classicamente indicam um processo de necrose, pois a enzima lactato desidrogenase é uma molécula citoplasmática e a presença dela no lavado indica um intenso colapso das membranas plasmática das células presentes em um determinado local. Para comprovarmos que esse fenômeno é a necroptose, avaliamos a morte celular também por citometria de fluxo onde confirmamos que o tipo de morte mais proeminente em nosso modelo não é a apoptose, e que o tratamento anti-TNF- $\alpha$  foi capaz de promover uma espécie de reversão do tipo de morte celular de necroptose para apoptose, o que está coerente em relação aos nossos dados de produção de citocinas, pois a apoptose é um tipo de morte celular mais relacionada a processos anti-inflamatórios e de regulação, e além disso, na necroptose, temos o extravasamento do conteúdo celular que podem funcionar como DAMPs e produtos virais que podem agir como PAMPs, o que acontece na apoptose, ou seja, o tratamento anti-TNF- $\alpha$  diminui significativamente a morte celular dos macrófagos, polariza a morte celular de necroptose para apoptose, que por sua vez impede que vários fatores de amplificação da resposta inflamatória sejam lançados no microambiente pulmonar.

Para confirmar que a morte celular que estamos observamos em nosso modelo experimental *in vivo* é a necroptose, avaliamos a presença das moléculas envolvidas na via de ativação dessa morte celular, onde observamos que os níveis de RIPK1 e MLKL estavam aumentados no pulmão desses animais infectados com



o vírus influenza além disso, confirmamos que níveis de caspase-8 estavam reduzidos em nosso modelo, o que demonstra o processo de necroptose no pulmão desses animais. E corroborando com nossos dados *in vitro* e *in vivo*, que TNF- $\alpha$  é uma molécula chave no processo de necroptose, o tratamento anti-TNF- $\alpha$  foi capaz de diminuir os níveis de RIPK-1 e MLKL e aumentar os níveis de caspase-8 no pulmão desses animais.

Nossos achados *in vitro* do bloqueio da TNF- $\alpha$ , juntamente com nossos resultados *in vivo* utilizando Etanercept demonstraram que o tratamento anti-TNF- $\alpha$  pode ser uma poderosa arma no controle da fisiopatologia da, bem como na prevenção da intensa morte celular na doença. A proteção conferida aos animais tratados com Etanercept reflete um melhor quadro inflamatório demonstrado pelo presente trabalho. Além disso, nossos dados, junto com relatos da literatura demonstram a importância do eixo TLR4/TNF- $\alpha$ /Necroptose na fisiopatologia da influenza, uma vez que nossos dados mostram que o fenômeno de necroptose é prevenido em nosso modelo experimental e que o tratamento com Etanercept é capaz de diminuir significativamente a expressão de RNAm de TLR4 nos pulmões de animais tratados com Etanercept (Chi *et al.*, 2013).

Acreditamos que o presente trabalho possui uma grande significância no campo da saúde pública, pois uma vez que a variabilidade genética do vírus da influenza (o que contribui para o aparecimento de cepas resistentes), e seu amplo espectro de hospedeiros dificulta o controle das infecções, o que torna cada vez mais urgente a compreensão dos mecanismos que regem a fisiopatologia dessa infecção, e com esse conhecimento, a proposição de terapias alternativas para a saúde da população, mas acreditamos que novos estudos devem ser realizados para uma melhor compreensão desses processos que gerem os casos mais graves da doença.

## 7 CONCLUSÕES

Podemos concluir que o vírus influenza e a hemaglutinina são capazes de ativar o receptor TLR4, apesar de não podermos afirmar se esse processo é de forma direta ou indireta. Essa ativação induz a produção exacerbada de TNF- $\alpha$  que funciona como o estopim para desencadear o processo de necroptose nos macrófagos, e que esse processo contribui para o estabelecimento da cytokine storm.

Além disso, podemos concluir que o tratamento anti-TNF- $\alpha$  é capaz de prevenir a necroptose promovida pelo vírus influenza e que esse tipo de abordagem é um potencial tratamento para o controle dos principais eventos imunopatológicos oriundos dessa infecção, como a cytokine storm e a necroptose, ou seja, pode ser um tratamento que aliando a uma intervenção antiviral, pode contribuir para um desfecho mais benéfico para o hospedeiro.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas AK, Lichtman AH. Cellular and Molecular Immunology. 2008. 6th edition Londres: Elsevier.

Adachi M, Matsukura S, Tokunaga H, Kokubu F. Expression of cytokines on human bronchial epithelial cells induced by influenza virus A. *Int Arch Allergy Immunol*. 1997, v. 113, n. 1-3, p. 307-11.

Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat. Rev. Immunol*. 2003;3:745–756.

Aldridge JR Jr., Moseley CE, Boltz DA, Negovetich NJ, Reynolds C, Franks J. TNF/iNOS-producing dendritic cells are the necessary evil of lethal influenza virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2009;106(13):5306–11.

Andrick BJ, Schwab AI, Cauley B, O'Donnell LA, Meng WS. Predicting Hemagglutinin MHC-II Ligand Analogues in Anti-TNF $\alpha$  Biologics: Implications for Immunogenicity of Pharmaceutical Proteins. *Plos One*. 2015;13;10(8):e0135451.

Armstrong SM, Wang C, Tigdi J, Si X, Dumpit C, Charles S, Gamage A, Moraes TJ, Lee WL. Influenza infects lung microvascular endothelium leading to microvascular leak: role of apoptosis and claudin-5. *PLoS One*. 2012;7(10):e47323.

Auffray C, Sieweke MH, Geissmann F. Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:669-92.

Beigel JH, Farrar J, Han AM, Hayden FG, Hyer R, de Jong MD, Lochindarat S, Nguyen TK, Nguyen TH, Tran TH, Nicoll A, Touch S, Yuen KY. Avian influenza A (H5N1) infection in humans. *N Engl J Med*. 2005, v. 353, n. 13, p. 1374-85.

Belshe RB. Implications of the emergence of a novel H1 influenza virus. *N Engl J Med*. 2009. v. 360, n. 25, p. 2667-8.

Bermejo-Martin JF, Ortiz de Lejarazu R, Pumarola T, Rello J, Almansa R, Ramírez P, et al. Th1 and Th17 hypercytokinemia as early host response signature in severe pandemic influenza. *Crit Care*. 2009. v. 13, n. 6, p. R201.

Blachere FM, Lindsley WG, Slaven JE, Green BJ, Anderson SE, Chen BT, Beezhold DH. Bioaerosol sampling for the detection of aerosolized influenza virus. 2007. *Influenza Other Respir Viruses*, v. 1, n. 3, p. 113-20.

Bloch O, Von Wartburg W. Dictionnaire étymologique de la langue française 7.ed. Paris, Presses Universitaires de France, 1986.

- Boktor SW & Hafner JW. Influenza. StatPearls [Internet]. 2017. Acesso em: 14 de Fev. 2018. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459363/>>
- Bouvier NM, Palese P. The biology of influenza viruses. *Vaccine*. 2008. 26 Suppl 4:D49-53.
- Brun-Buisson C, Richard JC, Mercat A, Thiébaud AC, Brochard L. Early Corticosteroids in Severe Influenza A/H1N1 Pneumonia and Acute Respiratory Distress Syndrome. *J Respir Crit Care Med*. 2011. v. 183, p. 1200–1206.
- Cailhier JF, Partolina M, Vuthoori S, Wu S, Ko K, Watson S, Savill J, Hughes J, Lang RA. Conditional macrophage ablation demonstrates that resident macrophages initiate acute peritoneal inflammation. *Immunol*. 2005; 174(4):2336-42.
- Campbell J, Lowe D, Sleeman MA. Developing the next generation of monoclonal antibodies for the treatment of rheumatoid arthritis. *Br J Pharmacol* 2011;162:1470–1485.
- Cardona CJ, Xing Z, Sandrock CE, Davis CE. Avian influenza in birds and mammals. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2009 v. 32, n. 4, p. 255-73.
- Carrat F & Flahault A. Influenza vaccine: the challenge of antigenic drift. *Vaccine*. 2007. v. 25, n. 39-40, p. 6852-62.
- Casper C, Englund J, Boeckh M. How I treat influenza in patients with hematologic malignancies. *Blood*. 2010. v. 115, n. 7, p. 1331-42.
- Cawcutt K, Kalil AC. Pneumonia with bacterial and viral coinfection. *Curr Opin Crit Care*. 2017 Oct;23(5):385-390.
- CDC. The 2009 H1N1 Pandemic: Summary Highlights. 2010. Acesso em: 22 de Jan. 2018. Disponível em: <http://www.cdc.gov/h1n1flu/cdcresponse.htm>
- CDC CfDCaP-. Types of Influenza Viruses | Seasonal Influenza (Flu) | CDC. 2017. Acesso em 02 de Fev. Disponível em: <https://www.cdc.gov/flu/about/viruses/types.htm>
- CDC. Weekly U.S. Influenza Surveillance Report. 2018. Acesso em 12 de Abril de 2018. Disponível em: <https://www.cdc.gov/flu/weekly/>
- Chan MC, Cheung CY, Chui WH, Tsao SW, Nicholls JM, Chan YO, Chan RW, Long HT, Poon LL, Guan Y, Peiris JS.. Proinflammatory cytokine responses induced by influenza a (H5N1) viruses in primary human alveolar and bronchial epithelial cells. *Respir Res*. 2005; 6:135.
- Chang P, Kuchipudi SV, Mellits KH, Sebastian S, James SJ, Liu J, Shelton H, Chang KC. Early apoptosis of porcine alveolar macrophages limits avian influenza virus replication and pro-inflammatory dysregulation. *Sci Rep*. 2015; 5:17999.
- Chen YJ, Wang SF, Weng IC, Hong MH, Lo TH, Jan JT, Hsu LC, Chen HY, Liu FT. Galectin-3 enhances avian H5N1 influenza A virus-induced pulmonary inflammation by promoting NLRP3 inflammasome activation. *Am J Pathol*. 2018. pii: S0002-9440(17)30866-0.

Cheung CY, Poon LL, Lau AS, Luk W, Lau YL, Shortridge KF, Gordon S, Guan Y, Peiris JS. Induction of proinflammatory cytokines in human macrophages by influenza A (H5N1) viruses: a mechanism for the unusual severity of human disease? *Lancet*. 2002; 360:1831–1837

Cho YS, Challa S, Moquin D, Genga R, Ray TD, Guildford M. Phosphorylation-driven assembly of the RIP1-RIP3 complex regulates programmed necrosis and virus-induced inflammation. *Cell*. 2009; 137:1112–1123.

Clancy DM & Martin SJ. Getting a gRIP on Flu by Casting the DAI. *Cell Host Microbe*. 2016;20(5):552-555.

Clark IA. The advent of the cytokine storm. *Immunol Cell Biol*. 2007; 85:271–273.

Cline TD, Beck D, Bianchini E. Influenza virus replication in macrophages: balancing protection and pathogenesis. *J Gen Virol*. 2017;98(10):2401-2412.

Cole SL & Ho LP. Contribution of innate immune cells to pathogenesis of severe influenza virus infection. *Clinical Science*. 2017. 131, 269–283.

Corominas J. Breve diccionario etimológico de la lengua castellana. 3.ed., Madrid, Ed. Gredos, 1980.

Damjanovic D, Divangahi M, Kugathasan K, Small CL, Zganiacz A, Brown EG, Hogaboam CM, Gauldie J, Xing Z. Negative regulation of lung inflammation and immunopathology by TNF- $\alpha$  during acute influenza infection. *Am J Pathol* 2011; 179:2963–2976

Damjanovic D, Small CL, Jeyanathan M, McCormick S, Xing Z. Immunopathology in influenza virus infection: uncoupling the friend from foe. *Clin Immunol*. 2012;144: 57–69.

Das K, Aramini JM, Ma LC, Krug RM, Arnold E.. Structures of influenza A proteins and insights into antiviral drug targets. *Nat Struct Mol Biol*. 2010; v. 17, n. 5, p. 530-8.

Dawood FS, Jain S, Finelli L, Shaw MW, Lindstrom S, Garten RJ, et al. Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *N Engl J Med*. 2009;360(25):2605-15.

Degterev A, Huang Z, Boyce M, Li Y, Jagtap P, Mizushima N. Chemical inhibitor of non apoptotic cell death with therapeutic potential for ischemic brain injury. *Nat Chem Biol*. 2005; 1: 112–119.

Ermolaeva MA, Michallet MC, Papadopoulou N, Utermöhlen O, Kranidioti K, Kollias G, Tschopp J, Pasparakis M. Function of TRADD in tumor necrosis factor receptor 1 signaling and in TRIF-dependent inflammatory responses. *Nat Immunol*. 2008;9(9):1037-46.

Europa EU. Enbrel INN-Etanercept. Acesso em: 11 de Fev. 2018. Disponível em:  
[http://ec.europa.eu/health/documents/communityregister/2017/20171218139734/anx\\_139734\\_pt.pdf](http://ec.europa.eu/health/documents/communityregister/2017/20171218139734/anx_139734_pt.pdf).

Fage C, Pizzorno A, Rhéaume C, Abed Y, Boivin G. The combination of oseltamivir with azithromycin does not show additional benefits over oseltamivir monotherapy in mice infected with influenza A(H1N1)pdm2009 virus. *J Med Virol.* 2017;89(12):2239-2243.

FDA: Etanercept (Enbrel). Acesso em: 11 Fev. 2018. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/DevelopmentApprovalProcess/HowDrugsareDevelopedandApproved/ApprovalApplications/TherapeuticBiologicApplications/ucm088697.pdf>>

FLU.GOV. Pandemic Flu History. 2011. Acesso em: 22 de Jan. 2018. Disponível em: <http://www.flu.gov/pandemic/history/>

Fodor E. The RNA polymerase of influenza A virus: mechanisms of viral transcription and replication. *Acta Virol.* 2013;57(2):113-22.

Fricker M, Vilalta A, Tolkovsky AM, Brown GC. Caspase Inhibitors Protect Neurons by Enabling Selective Necroptosis of Inflamed Microglia. *J Biol Chem.* 2013; 288(13): 9145–9152.

Fritz RS, Hayden FG, Calfee DP, Cass LM, Peng AW, Alvord WG, Strober W, Straus SE. Nasal cytokine and chemokine responses in experimental influenza A virus infection: results of a placebo-controlled trial of intravenous zanamivir treatment. *J Infect Dis.* 1999;180: 586–593

Gamblin SJ, Skehel JJ. Influenza hemagglutinin and neuraminidase membrane glycoproteins. *J Biol Chem.* 2010;285(37):28403-9.

Galluzzi L, Vitale I, Abrams JM, Alnemri ES, Baehrecke EH, Blagosklonny MV. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Cell Death Differ* 2012; 19: 107–120.

Gao R, Cao B, Hu Y, Feng Z, Wang D, Hu W, Chen J, Jie Z, Qiu H, et al. Human infection with a novel avian-origin influenza A (H7N9) virus. *N Engl J Med.* 2013. v. 368, n. 20, p. 1888-97.

Gautam M. Endothelial cells as regulators of cytokine storms during influenza infection. *Thorax.* 2011; 22169362.

Geissman F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages and dendritic cells. *Science.* 2010;327(5966):656-61.

Ghoneim HE, Thomas PG, Mccullers JA. Depletion of alveolar macrophages during influenza infection facilitates bacterial superinfections. *J Immunol* 2013;191:1250–1259.

Gomez-Puertas P, Albo C, Perez-Pastrana E, Vivo A, Portela A. Influenza virus matrix protein is the major driving force in virus budding. *J Virol.* 2000;74(24):11538-47.

Gordon S. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell.* 2002;111(7):927-30.

Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol.* 2005. 5(12):953-65.

Guo XJ, Thomas PG. New fronts emerge in the influenza cytokine storm. *Semin Immunopathol.* 2017;39(5):541-550.

Ha JW, Schwahn AB, Downard KM. Proteotyping to establish gene origin within reassortant influenza viruses. 2011. *PLoS One*, v. 6, n. 1, p. e15771.

He S, Wang L, Miao L, Wang T, Du F, Zhao L. Receptor interacting protein kinase-3 determines cellular necrotic response to TNF- $\alpha$ . *Cell.* 2009; 137:1100–1111.

He S, Liang Y, Shao F, Wang X. Toll-like receptors activate programmed necrosis in macrophages through a receptor-interacting kinase-3-mediated pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2011;108, 20054–20059.

Herold S, von Wulffen W, Steinmueller M, Pleschka S, Kuziel WA, Mack M, Srivastava M, Seeger W, Maus UA, Lohmeyer J. Alveolar epithelial cells direct monocyte transepithelial migration upon influenza virus infection: impact of chemokines and adhesion molecules. *J Immunol.* 2006;177: 1817–1825.

Högner K, Wolff T, Pleschka S, Plog S, Gruber AD et al. Macrophage-expressed IFN- $\beta$  contributes to apoptotic alveolar epithelial cell injury in severe influenza virus pneumonia. *PLoS Pathog* 2013; 9:e1003188.

Holler N, Zaru R, Micheau O, Thome M, Attinger A, Valitutti S, Bodmer JL, Schneider P, Seed B, Tschopp J. Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat. Immunol.* 2000;1, 489–495.

Huang Z, Wu SQ, Liang Y, Zhou X, Chen W, Li L, Wu J, Zhuang Q, Chen C, Li J, Zhong CQ, Xia W, Zhou R, Zheng C, Han J. RIP1/RIP3 binding to HSV-1 ICP6 initiates necroptosis to restrict virus propagation in mice. *Cell Host Microbe.* 2015;17(2):229-42.

Hussell T, Pennycook A, Openshaw PJM. Inhibition of tumor necrosis factor reduces the severity of virus-specific lung immunopathology. *Eur J Immunol.* 2001;31:2566–2573.

Jones MR, Simms BT, Lupa MM, Kogan MS, Mizgerd JP. Lung NF- $\kappa$ B activation and neutrophil recruitment require IL-1 and TNF receptor signaling during pneumococcal pneumonia. *J Immunol.* 2005;175(11):7530-5.

Kaczmarek A, Vandenabeele P, Krysko DV. Necroptosis: the release of damage associated molecular patterns and its physiological relevance. *Immunity.* 2013;38, 209–223.

Kaiser WJ, Sridharan H, Huang C, Mandal P, Upton JW, Gough PJ, Sehon CA, Marquis RW, Bertin J, Mocarski ES. Toll-like receptor 3-mediated necrosis via TRIF, RIP3, and MLKL. *J Biol Chem.* 2013;288, 31268–31279.

Karlsson Hedestam GB, Fouchier RA, Phogat S, Burton DR, Sodroski J, Wyatt RT. The challenges of eliciting neutralizing antibodies to HIV-1 and to influenza virus. *Nat Rev Microbiol.* 2008;6(2):143-55.

Kato H, Sato S, Yoneyama M, Yamamoto M, Uematsu S, Matsui K, Tsujimura T, Takeda K, Fujita T, Takeuchi O, Akira S.. Cell type-specific involvement of RIG-I in antiviral response. *Immunity.* 2005;23:19–28.

Kelliher MA, Grimm S, Ishida Y, Kuo F, Stanger BZ, Leder P. The death domain kinase RIP mediates the TNF-induced NF-kappaB signal. *Immunity.* 1998; 8:297–303.

Kelly C, Klenerman P, Barnes E. Interferon lambdas: the next cytokine storm. *Gut.* 2011. v. 60, n. 9, p. 1284-93.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972; 26: 239–257.

Kim B, Ahn KK, Ha Y, Lee YH, Kim D, Lim JH, Kim SH, Kim MY, Cho KD, Lee BH, Chae C. Association of tumor necrosis factor-alpha with fever and pulmonary lesion score in pigs experimentally infected with swine influenza virus subtype H1N2. *J Vet Med Sci.* 2009; 71: 611–616

Kim JI, Park MS. N-linked glycosylation in the hemagglutinin of influenza A viruses. *Yonsei Med J.* 2012. 53(5):886-93.

Knipe DM, Howley PM. *Orthomyxoviridae: The viruses and their replication.* Lippincott Williams and Wilkins. 2007.

Kollerova E, Betakova T. Influenza viruses and their ion channels. *Acta Virol.* 2006;50(1):7-16.

Kobasa D, Jones SM, Shinya K, Kash JC, Copps J et al. Aberrant innate immune response in lethal infection of macaques with the 1918 influenza virus. *Nature* 2007;445:319–323.

Kuriakose T, Man SM, Malireddi RK, Karki R, Kesavardhana S, Place DE, Neale G, Vogel P, Kanneganti TD. ZBP1/DAI is an innate sensor of influenza virus triggering the NLRP3 inflammasome and programmed cell death pathways. *Sci Immunol.* 2016;1(2).

Kzhyshkowska J, Gudima A, Moganti K, Gratchev A, Orekhov A. Perspectives for Monocyte/Macrophage-Based Diagnostics of Chronic Inflammation. *Transfus Med Hemother.* 2016;43(2):66-77.

Laursen NS & Wilson IA. Broadly neutralizing antibodies against influenza viruses. *Antiviral Res.* 2013. v. 98, n. 3, p. 476-83.

Laver WG, Bischofberger N, Webster RG. The origin and control of pandemic influenza. *Perspect Biol Med.* 2000. Winter;43(2):173-92.

Lee KY. Pneumonia, Acute Respiratory Distress Syndrome, and Early Immune-Modulator Therapy. *Int J Mol Sci.* 2017;v. 18, n. 2.



Leekha S, Zitterkopf NL, Espy MJ, Smith TF, Thompson RL, Sampathkumar P. Duration of influenza A virus shedding in hospitalized patients and implications for infection control. *Infect Control Hosp Epidemiol.* 2007;28(9):1071-6.

Lemaitre B, Nicolas E, Michaut L, Reichhart JM, Hoffmann JA. The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell.* 1996;86:973–983.

Lester SN, Li K. Toll-like receptors in antiviral innate immunity. *J Mol Biol.* 2014;426(6):1246-65.

Liddiard K, Rosas M, Davies LC, Jones SA, Taylor PR. Macrophage heterogeneity and acute inflammation. *Eur J Immunol.* 2011;41(9):2503-8.

Lietzén N, Ohman T, Rintahaka J, Julkunen I, Aittokallio T, Matikainen S, Nyman TA. Quantitative subcellular proteome and secretome profiling of influenza A virus-infected human primary macrophages. *PLoS Pathog* 2011;7:e1001340.

Linkermann A, Brasen JH, De Zen F, Weinlich R, Schwendener RA, Green DR. Dichotomy between RIP1- and RIP3-mediated necroptosis in tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced shock. *Mol Med.* 2012; 18:577–586.

Liu Y, Childs RA, Matrosovich T, Wharton S, Palma AS, Chai W, Daniels R, Gregory V, Uhlenendorff J, Kiso M, Klenk HD, Hay A, Feizi T, Matrosovich M.. Altered receptor specificity and cell tropism of D222G hemagglutinin mutants isolated from fatal cases of pandemic A(H1N1) 2009 influenza virus. *J Virol.* 2010; v. 84, n. 22, p. 12069-75.

Liu WC, Lin SC, Yu YL, Liang C. Dendritic cell activation by recombinant hemagglutinin proteins of H1N1 and H5N1 influenza A viruses. *J. Virol.* 2010; 84:22.

Marcovecchio E. *Dizionario etimologico storico dei termini medici.* Firenze: Festina Lente, 1993.

Marsolais D, Hahm B, Walsh KB, Edelmann KH, McGavern D, Hatta Y, Kawaoka Y, Rosen H, Oldstone MB. A critical role for the sphingosine analog AAL-R in dampening the cytokine response during influenza virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2009;106:1560 –1565.

Martin PL, Bugelski PJ. Concordance of preclinical and clinical pharmacology and toxicology of monoclonal antibodies and fusion proteins: soluble targets. *Br J Pharmacol.* 2012;166(3):806-22.

McKinstry KK, Strutt TM, Buck A, Curtis JD, Dibble JP, Huston G, Tighe M, Hamada H, Sell S, Dutton RW, Swain SL. IL-10 deficiency unleashes an influenza-specific Th17 response and enhances survival against high-dose challenge. *J Immunol.* 2009; 182:7353–7363.

McHardy AC, Adams B. The role of genomics in tracking the evolution of influenza A virus. *PLoS Pathog.* 2009. 5(10):e1000566.

Medina RA, Garcia-Sastre A. Influenza A viruses: new research developments. *Nat Rev Microbiol.* 2011. 9(8):590-603.

Memoli MJ, Athota R, Reed S, Czajkowski L, Bristol T, Proudfoot K, Hagey R, Voell J, Fiorentino C, Ademposi A, Shoham S, Taubenberger JK. The natural history of influenza infection in the severely immunocompromised vs nonimmunocompromised hosts. *Clin Infect Dis*. 2015. v. 58, n. 2, p. 214-25.

Mesquita M, Fintelman-Rodrigues N, Sacramento CQ, Abrantes JL, Costa E, Temerozo JR, Siqueira MM, Bou-Habib DC, Souza TM. HIV-1 and its gp120 inhibits the influenza A(H1N1)pdm09 life cycle in an IFITM3-dependent fashion. *PLoS One*. 2014;9(6):e10105.

Mikulášová A, Verecková E, Fondor E. Transcription and replication of the influenza A viruses genome. *Acta. Virologica*. 2000. v. 44, p. 273-282.

Ministério da Saúde. Protocolo de tratamento de influenza 2015. Biblioteca Virtual em Saúde 83 do Ministério da Saúde: [www.saude.gov.br/bvs](http://www.saude.gov.br/bvs): Ministério da Saúde 2015.

Ministério da Saúde. Informe Epidemiológico Influenza: Monitoramento até a Semana Epidemiológica 52 de 2016., 2017a. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/janeiro/05/Informe-Epidemiologico-Influenza-2016-SE-52.pdf>

Ministério da Saúde. Nota informativa e recomendações sobre a sazonalidade da influenza 2017., 2017b. Acesso em 03 de Fev. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/414-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/influenza/22873-informacoes-sobre-gripe>

Mikulasova A, Vareckova E, Fodor E. Transcription and replication of the influenza a virus genome. *Acta Virol*. 2000;44(5):273-82.

Mocarski ES, Guo H, Kaiser WJ. Necroptosis: the Trojan horse in cell autonomous antiviral host defense. *Virology*. 2015;479/480, 160–166.

Mogensen TH, Paludan SR. Molecular pathways in virus-induced cytokine production. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2001;65:131–150.

Moriwaki K. & Chan FKM. Necrosis-Dependent and Independent Signaling of the RIP kinases in Inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2014; 25(2): 167–175.

Murphy BR, Webster RG. Orthomyxoviruses. 1996. 3rd. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers.

Murray PJ & Wynn TA. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(11):723-37.

Nayak DP, Hui EK, Barman S. Assembly and budding of influenza virus. *Virus Res*. 2004;106(2):147-65.

Nicholson KG. Human influenza. London: Blackwell Science, 1998.

Nie Z, Scott GD, Weis PD, Itakura A, Fryer AD, Jacoby DB. Role of TNF- $\alpha$  in virus-induced airway hyperresponsiveness and neuronal M<sub>2</sub> muscarinic receptor dysfunction. *Br J Pharmacol*. 2011;164(2b):444-52.

Nogusa S, Thapa RJ, Dillon CP, Liedmann S, Oguin TH 3rd, Ingram JP, Rodriguez DA, Kosoff R, Sharma S, Sturm O, Verbist K, Gough PJ, Bertin J, Hartmann BM, Sealton SC, Kaiser WJ, Mocarski ES, López CB, Thomas PG, Oberst A, Green DR, Balachandran S. RIPK3 Activates Parallel Pathways of MLKL-Driven Necroptosis and FADD-Mediated Apoptosis to Protect against Influenza A Virus. *Cell Host Microbe*. 2016;13;20(1):13-25.

Orzalli MH and Kagan JC. Apoptosis and Necroptosis as Host Defense Strategies to Prevent Viral Infection. *Trends Cell Biol*. 2017;27(11):800-809.

Ou L, Lin S, Song B, Liu J, Lai R, Shao L. The mechanisms of graphene-based materials-induced programmed cell death: a review of apoptosis, autophagy, and programmed necrosis. *Int J Nanomedicine*. 2017 7;12:6633-6646.

Ouyang W, Rutz S, Crellin NK, Valdez PA, Hymowitz SG. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annu Rev Immunol*. 2011; 29:71–109.

Palese P, Shaw ML. *Orthomyxoviridae: The viruses and their replication*. Philadelphia: Lippincott, Williams & Wilkins, 2007.

Pawelek KA, Jr. Dor D, Salmeron C, Handel A. Within-Host Models of High and Low Pathogenic Influenza Virus Infections: The Role of Macrophages. *PLoS One*. 2016;11(2):e0150568.

Peiris JSM, Cheung CY, Leung CYH, Nicholls JM. Innate immune responses to influenza a H5N1: friend or foe? *Trends Immunol*. 2009;30:574–585.

Perrone LA, Plowden JK, Garcia-Sastre A, Katz JM, Tumpey TM. H5N1 and 1918 pandemic influenza virus infection results in early and excessive infiltration of macrophages and neutrophils in the lungs of mice. *PLoS pathogens*. 2008; 4(8):e1000115.

Perrone LA, Szretter KJ, Katz JM, Mizgerd JP, Tumpey TM. Mice lacking both TNF and IL-1 receptors exhibit reduced lung inflammation and delay in onset of death following infection with a highly virulent H5N1 virus. *J Infect Dis*. 2010. v. 202, n. 8, p. 1161-70.

Phung TTB, Suzuki T, Phan PH, Kawachi S, Furuya H, Do HT, Kageyama T, Ta TA, Dao NH, Nuno H, Tran DM, Le HT, Nakajima N. Pathogen screening and prognostic factors in children with severe ARDS of pulmonary origin. *Pediatr Pulmonol*. 2017;52(11):1469-1477.

Porter C, Armstrong-Fisher S, Kopotsha T, Smith B, Baker T, Kevorkian L, Nesbitt A. Certolizumab pegol does not bind the neonatal Fc receptor (FcRn): Consequences for FcRn-mediated in vitro transcytosis and ex vivo human placental transfer. *J Reprod Immunol*. 2016;116:7-12.

Potter CW. A history of influenza. *Journal of Applied Microbiology*. 2001. v. 91, p. 572-579.

Prevention CfDCA. Transmission of Influenza Viruses from Animals to People | Seasonal Influenza (Flu) | CDC 2017. Acesso em: 02 de Fev. Disponível em: <https://www.cdc.gov/flu/about/viruses/transmission.htm>.

Qian C, Cao X. Regulation of Toll-like receptor signaling pathways in innate immune responses. *Ann N Y Acad Sci.* 2013;1283: 67–75.

Ramana CV, Cheng GS, Kumar A, Kwon HJ, Enelow RI. Role of alveolar epithelial early growth response-1 (Egr-1) in CD8+ T cell-mediated lung injury. *Mol Immunol.* 2009. v. 47, n. 2-3, p. 623-31.

Rivera J, Proia RL, Olivera A. The alliance of sphingosine-1-phosphate and its receptors in immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2008;8:753– 763.

Robbins CS, Swirski FK. The multiple roles of monocyte subsets in steady state and inflammation. *Cell Mol Life Sci.* 2010. 67(16):2685-93.

Rodrigue-Gervais IG, Labbé K, Dagenais M, Dupaul-Chicoine J, Champagne C, Morizot A, Skeldon A, Brincks EL, Vidal SM, Griffith TS, Saleh M. Cellular inhibitor of apoptosis protein cIAP2 protects against pulmonary tissue necrosis during influenza virus infection to promote host survival. *Cell Host Microbe.* 2014;15(1):23-35.

Rojko J, Price-Schiavi S. Physiologic IgG biodistribution, transport, and clearance: implication for monoclonal antibody products. In: Cavagnaro J, editor. *Preclinical Safety Evaluation of Biopharmaceuticals.* New York: John Wiley and Sons; 2008. pp. 241–276.

Rossetto EV, Luna EJ. A descriptive study of pandemic influenza a(h1n1)pdm09 in Brazil, 2009 - 2010. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* 2016. 3;58:78.

Sakabe S, Iwatsuki-Horimoto S, Takano K, Nidom CA, Le M, Nagamura-Inoue T. Cytokine production by primary human macrophages infected with highly pathogenic H5N1 or pandemic H1N1 2009 influenza viruses. *The Journal of general virology.* 2011;92(Pt 6):1428–35.

Safferthal C, Rohde K, Fulda S. Therapeutic targeting of necroptosis by Smac mimetic bypasses apoptosis resistance in acute myeloid leukemia cells. *Oncogene.* 2017;36(11):1487-1502.

Schneider C, Nobs SP, Heer AK, Kurrer M, Klinke G, van Rooijen N. Alveolar macrophages are essential for protection from respiratory failure and associated morbidity following influenza virus infection. *PLoS pathogens.* 2014 10(4):e1004053.

Schrauwen EJ, de Graaf M, Herfst S, Rimmelzwaan GF, Osterhaus AD, Fouchier RA. Determinants of virulence of influenza A virus. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2014 v. 33, n. 4, p. 479-90.

Schworer SA, Smirnova II, Kurbatova I, Bagina U, Churova M, Fowler T, Roy AL, Degterev A, Poltorak A. Toll-like receptor-mediated down-regulation of the deubiquitinase cylindromatosis (CYLD) protects macrophages from necroptosis in wild-derived mice. *J BiolChem.* 2014;289(20):14422-33.

Serbina NV, Jia T, Hohl TM, Pamer EG. Monocytes-mediated defense against microbial pathogens. *Annu Rev Immunol.* 2008;26:421-52.

Settembre EC, Dormitzer PR, Rappuoli R. H1N1: can a pandemic cycle be broken? *Sci Transl Med.* 2010;2(24):24ps15.

Shen HH, Hou J, Chen WW, Bai BK, Wang HB, Guo TS, Liu AX, Li YL, Zhao M, Mao PY, Li J, Li BA, Li-Mao Y. Immunologic changes during pandemic (H1N1) China (2009). *Emerg Infect Dis J.* 2011; CDC 17(6).

Shen HQ, Yan ZQ, Zeng FG, Liao CT, Zhou QF, Qin JP, Xie QM, Bi YZ, Chen F. Isolation and phylogenetic analysis of hemagglutinin gene of H9N2 influenza viruses from chickens in South China from 2012 to 2013. *J Vet Sci.* 2015. v. 16, n. 3, p. 317-25.

Shi C, Pamer EG. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2011; 11(11):762-75.

Shi X, Zhou W, Huang H, Zhu H, Zhou P, Zhu H, Ju D. Inhibition of the inflammatory cytokine tumor necrosis factor-alpha with etanercept provides protection against lethal H1N1 influenza infection in mice. *Crit Care.* 2013 Dec 27;17(6):R301.

Smith GJ, Vijaykrishna D, Bahl J, Lycett SJ, Worobey M, Pybus OG, et al. Origins and evolutionary genomics of the 2009 swine-origin H1N1 influenza A epidemic. *Nature.* 2009. 459(7250):1122-5.

Souza TM, Salluh JI, Bozza FA, Mesquita M, Soares M, Motta FC, Pitrowsky MT, de Lourdes Oliveira M, Mishin VP, Gubareva LV, Whitney A, Rocco SA, Gonçalves VM, Marques VP, Velasco E, Siqueira MM. H1N1pdm influenza infection in hospitalized cancer patients: clinical evolution and viral analysis. *PLoS One.* 2010. v. 5, n. 11, p. e14158.

Sridharan H, Upton JW. Programmed necrosis in microbial pathogenesis. *Trends Microbiol.* 2014; 22(4):199-207.

Sriwilajaroen N, Suzuki Y. Molecular basis of the structure and function of H1 hemagglutinin of influenza virus. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci.* 2012. 88(6):226-49.

Suresh M, Singh A, Fischer C. Role of tumor necrosis factor receptors in regulating CD8 T-cell responses during acute lymphocytic choriomeningitis virus infection. *J Virol* 2005; 79:202–213.

SUS SÚdS-. Nota informativa e recomendações sobre a sazonalidade da Influenza em 2017. Acesso em 05 de Fev. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/414-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/influenza/22873-informacoes-sobre-gripe> .

Szretter KJ, Balish AL, Katz JM. Influenza: propagation, quantification, and storage. *Curr Protoc Microbiol.* 2006;Chapter 15:Unit 15G.1.

Szretter KJ, Gangappa S, Lu X, Smith C, Shieh WJ, Zaki SR, Sambhara S, Tumpey TM, Katz JM. Role of host cytokine responses in the pathogenesis of avian H5N1 influenza viruses in mice. *J Virol.* 2007; 81:2736–2745.

Su L, Quade B, Wang H, Sun G, Wang X, Rizo J. A plug release mechanism for membrane permeation by MLKL. *Structure*. 2014; 22 (10): 1489–500.

Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol*. 2003;21:335–376.

Taubenberger JK, Morens DM. The pathology of influenza virus infections. *Annu Rev Pathol*. 2008. 3:499-522.

Teijaro JR, Walsh KB, Cahalan S, Fremgen DM, Roberts E, Scott F, Martinborough E, Peach R, Oldstone MB, Rosen H. Endothelial cells are central orchestrators of cytokine amplification during influenza virus infection. *Cell*. 2011;146:980 – 991.

Teijaro JR. The role of cytokine responses during influenza virus pathogenesis and potential therapeutic options. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2015; v. 386, p. 3-22.

Thangavel RR, Bouvier NM. Animal models for influenza virus pathogenesis, transmission, and immunology. *J Immunol Methods*. 2015. 410:60-79.

Thapa RJ, Ingram JP, Ragan KB, Nogusa S, Boyd DF, Benitez AA, Sridharan H, Kosoff R, Shubina M, Landsteiner VJ, Andrade M, Vogel P, Sigal LJ, tenOever BR, Thomas PG, Upton JW, Balachandran S. DAI Senses Influenza A Virus Genomic RNA and Activates RIPK3-Dependent Cell Death. *Cell Host Microbe*. 2016;20(5):674-681.

Tisoncik JR, Korth MJ, Simmons CP, Farrar J, Martin TR, Katze MG.. Into the eye of the cytokine storm. *Microbiol Mol Biol Ver*. 2012;76:16–32.

Trinchieri, G and Sher A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol*.2007;7, 179-190.

Tripp RA, Tompkins SM. Animal models for evaluation of influenza vaccines. *Current topics in microbiology and immunology*. 2009. 333:397–412.

Upham JP, Pickett D, Irimura T, Anders EM, Reading PC. Macrophage receptors for influenza A virus: role of the macrophage galactose-type lectin and mannose receptor in viral entry. *J Virol*. 2010;84: 3730–3737.

Upton JW, Kaiser WJ, Mocarski ES. Virus inhibition of RIP3-dependent necrosis. *Cell Host Microbe*. 2010; 7:302–313.

Upton JW, Sridharan H. InFLUencing host survival: cIAP2 tips the scales. *Cell Host Microbe*. 2014;15;15(1):3-5.

VandenBerghe T, Linkermann A, Jouan-Lanhouet S, Walczak H, Vandenabeele P. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014;15(2):135-47.

Vandenabeele, P; Galluzzi, G; VandenBerghe, T; Kroemer, G. Molecular mechanisms of necroptosis: an ordered cellular explosion. *Nature reviews a Molecular cell biology*. 2010; 11 (10): 700–15.

Vercammen D, Beyaert R, Denecker G, Goossens V, van LG, Declercq W. Inhibition of caspases increases the sensitivity of L929 cells to necrosis mediated by tumor necrosis factor. *J ExpMed* 1998; 187: 1477–1485.

Von Itzstein M. The war against influenza: discovery and development of sialidase inhibitors. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2007. v. 6, n. 12, p. 967-75.

Walsh G. Biopharmaceutical benchmarks. *Nat Biotechnol.* 2010;28:917–924

Wang G, Deng G, Shi J, Luo W, Zhang G, Zhang Q, Liu L, Jiang Y, Li C, Sriwilajaroen N, Hiramatsu H, Suzuki Y, Kawaoka Y, Chen H. H6 influenza viruses pose a potential threat to human health. *J Virol.* 2015. v. 88, n. 8, p. 3953-65.

Wang, H; Sun, G; Su, L; Rizo, J; Liu, L; Wang, LF; Wang, FS; Wang, X. Mixed lineage kinase domain-like protein MLKL causes necrotic membrane disruption upon phosphorylation by RIP3. *Molecular Cell.* 2014; 54 (1): 133–46.

Wang W, Wang WH, Azadzi KM, Su N, Dai P, Sun J, Wang Q, Liang P, Zhang W, Lei X, Yan Z, Yang JH. Activation of innate antiviral immune response via double-stranded RNA-dependent RLR receptor-mediated necroptosis. *Sci Rep.* 2016;3;6:22550.

Webster RG, Govorkova EA. Continuing challenges in influenza. *Ann N Y Acad Sci.* 2014 v. 1323, n. 1, p. 115-39.

White SK, Ma W, McDaniel CJ, Gray GC, Lednicky JA. Serologic evidence of exposure to influenza D virus among persons with occupational contact with cattle. 2016. *J Clin Virol.* 81:31-3.

WHO. Influenza Pandemic Plan. The Role of WHO and Guidelines for National and Regional Planning. Geneva, Switzerland., 1999. Acesso em: 18 de jan. Disponível em: <http://www.WHO.int/csr/resources/publications/influenza/WHOcdscsredc991.pdf>

WHO. Strengthening Response to Pandemics and Other Public-Health Emergencies. Report of the Review Committee on the Functioning of the International Health Regulations (2005) and on Pandemic Influenza (H1N1) 2009. França, 2011. Acesso em: 18 de jan. Disponível em: [http://apps.WHO.int/iris/bitstream/10665/75235/1/9789241564335\\_eng.pdf?ua=1](http://apps.WHO.int/iris/bitstream/10665/75235/1/9789241564335_eng.pdf?ua=1)

WHO. Influenza. Fact sheet v. 211, 2003.

WHO. Pandemic (H1N1) 2009 briefing note 1 Viruses resistant to oseltamivir (Tamiflu) identified. *Wkly. Epidemiol. Rec.*, v. 84, n. 29, p. 299-399, 2009a.

WHO. Pandemic influenza preparedness and response. A WHO guidance document. 2009b

WHO. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2010 influenza season (southern hemisphere winter). *Wkly Epidemiol Rec.*, v. 84, p. 421-31, 2009a.

WHO. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2009-2010 influenza season (northern hemisphere winter). *Wkly Epidemiol Rec.*, v. 84, p. 65-72, 2009b.

WHO. Recommended viruses for influenza vaccines for use in the 2011 southern

hemisphere influenza season., 2010a. Acesso em 22 de Jan. Disponível em: [http://www.WHO.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/201009\\_Recommendation.pdf](http://www.WHO.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/201009_Recommendation.pdf)

WHO. WHO recommendations for the post-pandemic period 2010b. Acesso em: 22 de Jan. Disponível em: [http://www.WHO.int/csr/disease/swineflu/notes/briefing\\_20100810/en](http://www.WHO.int/csr/disease/swineflu/notes/briefing_20100810/en)

WHO. Weekly update on oseltamivir resistance to pandemic influenza A (H1N1) 2009 viruses 2010a. Acesso em 22 de Jan. Disponível em: <http://www.WHO.int/csr/disease/influenza/weeklyupdateoseltamivirresistant20101108.pdf>

WHO. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2012 southern hemisphere influenza season, 2011. Acesso em 22 de Jan. Disponível em: [http://www.WHO.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/2011\\_09\\_recommendation.pdf](http://www.WHO.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/2011_09_recommendation.pdf)

WHO. Standardization of terminology of the pandemic A(H1N1)2009 virus. 2011a. Acesso em 22 de Jan. Disponível em: [http://www.WHO.int/influenza/gisrs\\_laboratory/terminology\\_ah1n1pdm09/en/](http://www.WHO.int/influenza/gisrs_laboratory/terminology_ah1n1pdm09/en/)

WHO. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2013 southern hemisphere influenza season, 2012a. Acesso em 22 de Jan. Disponível em: [http://www.WHO.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/201209\\_recommendation.pdf](http://www.WHO.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/201209_recommendation.pdf)

WHO. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2014 southern hemisphere influenza season 2013a. Acesso em 22 de Jan. Disponível em: [http://www.WHO.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/2014\\_south/en/](http://www.WHO.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/2014_south/en/)

WHO. WHO Risk Assessment: Human infections with avian influenza A(H7N9) virus, 2013b. Acesso em 22 de Jan. Disponível em: [http://www.WHO.int/influenza/human\\_animal\\_interface/influenza\\_h7n9/RiskAssessment\\_H7N9\\_07Jun13.pdf](http://www.WHO.int/influenza/human_animal_interface/influenza_h7n9/RiskAssessment_H7N9_07Jun13.pdf)

WHO. Influenza (seasonal) Fact Sheet N°211. <http://www.WHO.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/>: World Health Organization [online] 2014a.

WHO. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2015 southern hemisphere influenza season 2014b.



WHO. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2015 southern hemisphere influenza season. 2014c. Acesso em 22 de Jan. Disponível em: [http://www.WHO.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/2015\\_south/en/](http://www.WHO.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/2015_south/en/)

WHO. Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2016 southern hemisphere influenza season. 2015a. Acesso em 23 de Jan. Disponível em: [http://www.WHO.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/201509\\_recommendation.pdf](http://www.WHO.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/201509_recommendation.pdf)

WHO. Warning signals from the volatile world of influenza viruses., 2015b. Acesso em 23 de Jan. Disponível em: <http://www.WHO.int/influenza/publications/warningsignals201502/en/>

WHO. Influenza at the human-animal interface. Summary and assessment, 21 April to 16 May 2017., 2017a. Acesso em 23 de Jan. Disponível em: [http://www.WHO.int/influenza/human\\_animal\\_interface/Influenza\\_Summary\\_IRA\\_HA\\_interface\\_05\\_16\\_2017.pdf?ua=1](http://www.WHO.int/influenza/human_animal_interface/Influenza_Summary_IRA_HA_interface_05_16_2017.pdf?ua=1)

WHO. Influenza virus detections. FluNet - Charts., 2017b. Acesso em 23 de Jan. Disponível em: [http://www.WHO.int/influenza/gisrs\\_laboratory/flunet/charts/en](http://www.WHO.int/influenza/gisrs_laboratory/flunet/charts/en)

Wiley DC & Skehel JJ. The structure and function of the hemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus. *Annu Rev Biochem.* 1987. v. 56, p. 365-95.

Williams AE, Humphreys IR, Cornere M, Edwards L, Rae A, Hussell T. TGF-beta prevents eosinophilic lung disease but impairs pathogen clearance. *Microbes Infect.* 2005;7:365–375.

Wright PF, Neumann G, Kawaoka Y. *Orthomyxoviruses*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007.

Ws, H. *Medical Meanings: a Glossary of Word Origins*. Philadelphia, Pennsylvania: American College of Physicians, 1997.

Yang Y, Zhang J, Gao Q, Bo J, Ma Z. Etanercept attenuates thermal and mechanical hyperalgesia induced by bone cancer. *Exp Ther Med.* 2017;13(5):2565-2569.

Yokota S. Influenza-associated encephalopathy– pathophysiology and disease mechanisms. *Nihon Rinsho Jpn J Clin Med.* 2003; 61:1953–1958 5.

Zeng H, Pappas C, Belser JA, Houser KV, Zhong W, Wadford DA, Stevens T, Balczon R, Katz JM, Tumpey TM. Human pulmonary microvascular endothelial cells support productive replication of highly pathogenic avian influenza viruses: possible involvement in the pathogenesis of human H5N1 virus infection. *J Virol.* 2012;86(2):667-78.

Zhang DW, Shao J, Lin J, Zhang N, Lu BJ, Lin SC. RIP3, an energy metabolism regulator that switches TNF-induced cell death from apoptosis to necrosis. *Science.* 2009; 325:332–336.

Ziegler-Heitbrock L. The CD14+ CD16+ blood monocytes: their role in infection and inflammation. *J Leukoc Biol.* 2007;81(3):584-92.

## 9 ANEXO

