

Ministério da Saúde

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

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

### **Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular**

*THAUANE DOS SANTOS CORREIA DA SILVA*

Inibição da replicação do influenza através da modulação de fatores restritivos pelos ligantes dos receptores CCR5 e CXCR4

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências pela pós graduação em Biologia Celular e Molecular.

**Orientador (es):** Dra. Milene Dias Miranda

Prof. Dr. Thiago Moreno Lopes Souza

**RIO DE JANEIRO**

2019

ii

## FICHA CATALOGRÁFICA

Silva, Thauane dos Santos Correia da.

Inibição da replicação do influenza através da modulação de fatores restritivos pelos ligantes dos receptores CCR5 e CXCR4 / Thauane dos Santos Correia da Silva. - Rio de Janeiro, 2019.

xviii, 97 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2019.

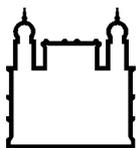
Orientadora: Milene Dias Miranda.

Co-orientador: Thiago Moreno Lopes Souza.

Bibliografia: f. 86-97

1. Influenza. 2. antiviral. 3. fatores de restrição. 4. CCR5. 5. CXCR4. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).



Ministério da Saúde

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

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

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

***AUTORA: THAUANE DOS SANTOS CORREIA DA SILVA***

### **INIBIÇÃO DA REPLICAÇÃO DO INFLUENZA ATRAVÉS DA MODULAÇÃO DE FATORES RESTRITIVOS PELOS LIGANTES DOS RECEPTORES CCR5 E CXCR4**

**ORIENTADOR (ES): Dra. Milene Dias Miranda**

**Prof. Dr. Thiago Moreno Lopes Souza**

**Aprovada em: \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_**

#### **EXAMINADORES:**

**Prof. Dr.** Elzinandes Leal de Azeredo – **Presidente** (IOC)  
**Prof. Dr.** Daniella Arêas Mendes da Cruz (IOC)  
**Prof. Dr.** Izabel Christina Nunes de Palmer Paixão (UFF)  
**Prof. Dr.** Carmen Penido Monteiro (Suplente-CDTS)  
**Prof. Dr.** Luciane Almeida Amado Leon (Revisora/Suplente-IOC)

Rio de Janeiro, 15 de agosto de 2019

*Dedico este trabalho a minha avó Cleonice Maria dos Santos (in memoriam),  
que estaria radiante de felicidade por ver mais uma etapa da minha vida  
sendo concluída e compartilharia esse momento em  
todas as redes sociais possíveis. Te amo vó.  
Meu coração sempre estará com você.*

## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a minha orientadora Milene Miranda pelo apoio, dedicação, ensinamentos e confiança em mim, durante todo o desenvolvimento deste projeto. Dei o meu melhor em cada etapa desse trabalho mesmo muitas vezes desconfiando da minha capacidade de lidar com as situações adversas que apareciam. Foi um prazer ser sua primeira aluna de pós-graduação e espero ter correspondido as expectativas.

Ao meu co-orientador Thiago Moreno Lopes pelo conselhos acadêmicos e profissionais durante toda essa jornada.

A todo grupo do Thiago que me recebeu gentilmente e me auxiliou por diversas vezes. Obrigado André pelo ensinamento de western blot. Se hoje consigo fazer um ensaio bom é porque você me ensinou bem. A Carol Sacramento por todo auxílio em encontrar reagentes para eu poder usar nesta dissertação. A Carol Freitas e Mayara pelos meus desabafos demorados já no final dessa trajetória.

Ao Laboratório de Imunofarmacologia e aos alunos que por diversas vezes tiravam as minhas dúvidas mesmo sem saber quem eu era, enquanto eu fazia meus westerns.

A Dr. Marilda Siqueira pela oportunidade de trabalhar em uma excelente equipe de trabalho, que é o Laboratório de Vírus Respiratórios e Sarampo (LVRS). Agradeço muito a este time que me recebeu super bem desde o primeiro dia. Não poderia ter escolhido um laboratório melhor!

Ao programa de pos-graduação em Biologia Celular e Molecular que junto dos coordenadores, funcionários e docentes fazem desse programa um lugar de excelência. É muito gratificante poder fazer parte de uma pós-graduação tão boa.

Ao Prof. Dr. Dumith Bou-Habib e Laboratório de Pesquisas do Timo por ceder as quimiocinas usadas neste trabalho.

Ao Laboratório de Neuroquímica do Prof. Dr. Ricardo Reis da UFRJ pelas imagens de imunofluorescência. Em especial, a mestranda do laboratório e amiga que a UFRJ me deu, Gabriela Sardella pelo auxílio nos ensaios de imuno e pela amizade durante esses anos. Sem você essas imagens não ficariam tão boas!

As agencias de fomento, CAPES e CNPq, pelo auxílio financeiro a este projeto.

A todos os colegas de trabalho do LVRS pelas risadas e almoços compartilhados. A Thayssa pela ajuda nos experimentos de ensaio de placa. A Jéssica por todas as trocas de conhecimento sobre CCR5 e IFITM3. Em especial ao grupo da Milene, Aline, Gabi e Carlos. Vocês foram os meus ICs emprestados que eu tive oportunidade de ensinar o pouco que eu sei. Aprendi a ter a paciência e conheci a responsabilidade da hierarquia. Obrigado pelo companheirismo diário e ajuda.

Aos meus pais, Veridiana e Ailton, pelo suporte, amor, carinho, orações e principalmente esperança no meu futuro. O título de mestre também é de vocês.

A minha grande amiga e mestranda Jéssica Sodré. Desde a UFRJ unidas e agora a prova dessa amizade sendo celebrada comigo sendo madrinha do seu casamento. Que possamos compartilhar mais vitórias juntas.

Aos meus grandes amigos do ensino médio, Ana, Barbara, Luis e Raphael por esses 9 anos de amizade. Estão mais uma vez acompanhando essa etapa difícil na minha vida, mas muito recompensadora. Perdoem a minha ausência, é por um bom motivo. Sei que as minhas alegrias e conquistas também são as de vocês.

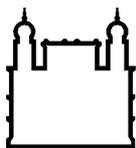
Agradeço ao meu amor, Diego Sandôra, por todo o companheirismo, amizade, amor, carinho, suporte e apoio em todos os momentos durante esses oito anos juntos. Sem você, provavelmente não estaria concluindo esta etapa agora. Você sempre foi um porto seguro para mim e um grande incentivador da minha carreira. Espero compartilhar muito mais conquistas ao seu lado.

Continuo sempre buscando o meu lugar ao sol, mas deixo aqui meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para este trabalho e para o meu crescimento profissional e pessoal.

Muito obrigado a todos!

*“O medo fere mais do que espadas”*

Game of Thrones



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

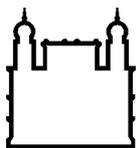
### Inibição da replicação do influenza através da modulação de fatores restritivos pelos ligantes dos receptores CCR5 e CXCR4

#### RESUMO

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Thauane dos Santos Correia da Silva

Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) mostram que a gripe é uma doença que afeta com gravidade de 3 a 5 milhões de pessoas em todo o mundo promovendo, anualmente, de 290 a 650 mil mortes. A gravidade da doença pode ser ainda maior quando surgem cepas pandêmicas, para as quais a população tem pouca ou nenhuma imunidade. Portanto, os vírus influenza são considerados os principais agentes virais causadores de infecções respiratórias agudas e tem grande importância epidemiológica. Durante a infecção por influenza, o interferon liberado na resposta imune inata induz cascatas de sinalizações intracelulares, levando a expressão de diferentes genes. Muitos desses genes codificam proteínas nas células, incluindo os fatores de restrição (FRs). É largamente descrito na literatura que os FRs presentes nas células do hospedeiro são proteínas antivirais, que atuam sobre a replicação de diversos vírus, prejudicando o ciclo infeccioso desses patógenos. Nosso grupo já observou que uma proteína do HIV-1, gp120, é capaz de inibir a replicação do vírus influenza A(H1N1)pdm09. Sendo assim, visamos investigar se ligantes dos receptores CCR5 (R5) e CXCR4 (X4) poderiam modular fatores restritivos de forma a inibir a replicação do vírus influenza. Para isso, células A549 foram expostas aos ligantes endógenos dos receptores R5 e X4, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL12 ou exógenos, gp120 R5-trópicos e gp120 X4-trópicos. Então, as células foram infectadas com o vírus A/H3N2 com MOI 2 por 1h. Após 24 h, o título viral foi avaliado por RT-PCR em tempo real. A monocamada celular foi exposta aos ligantes de R5 e lisada para avaliação dos níveis de RNAm de diferentes FRs, utilizando um painel. Em seguida, as células A549 foram expostas aos ligantes de R5 e lisadas para a quantificação do nível proteico do FR SAMHD1 por *immunoblotting*. Realizamos também um ensaio funcional no qual células A549 sofreram *knockdown* para SAMHD1 e foram infectadas com o A/H3N2. Adicionalmente, as células foram tratadas com guanosina para avaliar o papel regulatório de dNTPs por SAMHD1. Nossos resultados mostraram que a exposição aos ligantes endógenos e exógenos inibiram a replicação do vírus influenza em torno de 50%, em células A549. Através do painel de RNAm para FRs, observamos aumento de 4X dos transcritos para o FR SAMHD1. Observamos também que os ligantes de R5 aumentaram o conteúdo proteico de SAMHD1 em até 3X. Com o experimento funcional de *knockdown*, observamos que a diminuição dos níveis proteicos de SAMHD1 leva ao aumento da replicação viral, no modelo utilizado. O tratamento com guanosina em células expostas aos ligantes de R5 inibiu ainda mais a replicação do vírus influenza, sugerindo que o mecanismo inibitório possa ser mediado pela ativação da atividade de desoxinucleotídeo trifosfohidrolase de SAMHD1. Sendo assim, nossos dados mostram pela primeira vez uma relação direta de SAMHD1 com inibição da replicação do influenza, além disso, traz perspectivas para novos estudos sobre a modulação de sinalizações, através de receptores celulares, para induzir proteínas de grande importância no controle de infecções virais relevantes para a saúde pública.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

### **Inhibition of influenza replication through the restrictive factors modulation by CCR5 and CXCR4 receptor ligands**

#### **ABSTRACT**

#### **MASTER DISSERTATION IN CELULAR AND MOLECULAR BIOLOGY**

**Thauane dos Santos Correia da Silva**

Data published by the World Health Organization (WHO) shows that influenza is a disease that infects 3 to 5 million people worldwide annually, reaching 290 to 650 thousand deaths. The disease severity can be even greater when pandemic strains, against which the population has little or no immunity, emerge. Therefore, influenza viruses are the main viral agents causing acute respiratory tract infections and are of great epidemiological importance. During influenza infection, the interferon released during the innate immune response induces cascades of intracellular signaling, leading to the expression of different genes, including several encoding restriction factors (RFs). Previous studies from literature show that a variety of RFs have antiviral activity, and are able to interfere with the replication and impair the infectious cycle of different types of viruses. Our group showed that the HIV-1 protein gp120 is able to inhibit the replication of influenza A(H1N1)pdm09 virus. Thus, in the present study, we aimed to investigate whether ligands of the CCR5 (R5) and CXCR4 (X4) receptors could modulate RFs, in order to inhibit the replication of the influenza virus. For this purpose, A549 cells were treated with R5 and X4 endogenous or exogenous ligands, such as CCL3, CCL4, CCL5, CXCL12, gp120 R5-tropic and gp120 X4-tropic. Then, we infected the treated cells with the A/H3N2 virus at multiplicity of infection (MOI) of two for one hour. After 24 hours, the viral titre was evaluated by qRT-PCR. We lysed R5 ligand-treated cells for evaluation of RF mRNA using a quantification panel. Next, R5 ligand-treated cells were lysed for evaluation of FR SAMHD1 protein levels by immunoblotting. We also performed a functional assay in which SAMHD1-knocked-down A549 cells were infected with A(H3N2). In addition, the cells were treated with guanosine to assess the regulatory role of dNTPs by SAMHD1. Our results show that exposure to endogenous and exogenous ligands inhibits influenza virus replication by 50% in A549 cells. Using a RF mRNA quantification panel, we observed a four-fold increase in SAMHD1 transcripts. We also observed that R5 ligands promoted an increase up to three-fold in the protein content of SAMHD1. In the functional knockdown assay, we observed that the decrease of the protein levels of SAMHD1 leads to the increase of viral replication, in A549 cells. Guanosine treatment in cells exposed to R5 ligands further inhibited influenza virus replication, suggesting that the inhibitory mechanism may involve the activation of the SAMHD1 deoxynucleotide triphosphohydrolase activity. Thus, our data show for the first time a direct relationship of SAMHD1 and inhibition of influenza replication and provides perspectives for new studies on the signaling modulation, through cellular receptors, to induce proteins of great importance in the control of infections relevant for public health.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	ix
ABSTRACT .....	x
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Vírus influenza .....</b>	<b>1</b>
1.1.1. Transmissão e sintomas .....	1
1.1.2. Classificação e nomenclatura.....	3
1.1.3. Estrutura genômica e proteínas do vírus influenza A.....	4
1.1.4. Ciclo replicativo viral.....	8
1.1.5. Mecanismos evolutivos do vírus influenza A .....	11
1.1.6. Pandemias do vírus influenza.....	13
1.1.7. Epidemiologia do vírus influenza A no Brasil .....	16
1.1.8. Tratamento e prevenção anti-influenza .....	19
1.1.8.1. Antivirais.....	19
1.1.8.2. Vacinas .....	22
<b>1.2. Imunidade inata na infecção por influenza .....</b>	<b>24</b>
1.2.1. Resposta imune inata em infecções por influenza .....	24
1.2.2. Fatores de restrição.....	27
1.2.2.1. SAMHD1 .....	28
1.2.2.2. IFITM3 .....	31
1.2.3. Receptores de quimiocinas .....	32
<b>1.3. Justificativa.....</b>	<b>34</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>35</b>
2.1. Objetivo geral .....	35
2.2. Objetivos específicos.....	35
<b>3 Metodologia .....</b>	<b>36</b>
3.1 Cultivo celular .....	36
3.2 Crescimento e titulação do estoque viral .....	36
3.3 Atividade Neuraminidase .....	37
3.3.1 Ensaio com células MDCK.....	37
3.3.2 Busca pelo melhor modelo de infecção.....	38
3.4 Ensaio de inibição da replicação viral.....	39
3.4.1 qRT-PCR .....	40
3.4.1.1 Extração de RNA viral .....	40
3.4.1.2 RT-PCR em tempo real em única etapa.....	41
3.4.2 Titulação viral por unidade formadora de placa (PFU) .....	42
3.5 Avaliação dos fatores restritivos .....	43

3.5.1	Extração de RNA total e síntese de cDNA .....	44
3.5.2	qPCR .....	45
3.6	Transfecção de RNA de interferência (RNAi) para SAMHD1 .....	45
3.7	Ensaio de imunobloting .....	46
3.8	Ensaio de imunofluorescência .....	47
3.9	Tratamento com guanosina .....	48
3.10	Análise estatística .....	48
4.	Resultados .....	50
4.1.	Escolha do modelo de infecção para o estudo .....	50
4.1.1.	Busca pelo melhor MOI e vírus a ser utilizado para infecção em A549.....	50
4.2.	Avaliação de ligantes de CCR5 e CXCR4 na inibição da replicação do vírus influenza A/H3N2 em células A549 .....	55
4.2.1.	Infectividade viral .....	57
4.3.	Avaliação dos níveis proteicos de IFITM3 após exposição dos ligantes de CCR5 .....	58
4.4.	Níveis transcricionais e proteicos de SAMHD1 após exposição à ligantes de CCR5 .....	61
4.5.	Avaliação do efeito do <i>knockdown</i> de SAMHD1 na replicação do vírus influenza A .....	68
4.6.	Efeito do tratamento com guanosina sobre a replicação do vírus influenza A em A549 .....	74
5.	DISCUSSÃO .....	76
6.	CONCLUSÕES.....	82
7.	PERSPECTIVAS .....	83
8.	OUTRAS PRODUÇÕES DURANTE O MESTRADO .....	84
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86

## INDICE DE FIGURA

Figura 1.1: Principais sintomas da infecção pelo vírus influenza.....	2
Figura 1.2: Micrografia do vírus influenza A.....	5
Figura 1.3: Esquema representativo da estrutura do vírus influenza A.....	6
Figura 1.4: Representação esquemática do genoma dos vírus Influenza A.....	7
Figura 1.5: Esquema da replicação do vírus influenza A.....	10
Figura 1.6 Mecanismos de <i>drift</i> e <i>shift</i> antigênico.....	12
Figura 1.7: Linha do tempo mostrando o histórico das pandemias ocasionadas pelos vírus Influenza A ocorridas nos séculos XX e XXI.....	13
Figura 1.8: Origem dos segmentos gênicos do A(H1N1)pdm09.....	15
Figura 1.9: Perfil da circulação das cepas do vírus influenza no Brasil em casos de SG, identificados pela vigilância epidemiológica até a semana 52 de 2018.....	17
Figura 1.10: Perfil da circulação das cepas do vírus influenza no Brasil em casos de SRAG em UTI, identificados pela vigilância epidemiológica até a semana 52 de 2018.....	18
Figura 1.11: Estrutura principal dos adamantanos.....	19
Figura 1.12: Comparação estrutural entre o ácido siálico e os NAI.....	20
Figura 1.13: Estrutura química do ácido baloxavir (forma ativa) e baloxavir marboxil (forma pró droga) .....	21
Figura 1.14: Estrutura química do favipiravir.....	22
Figura 1.15: Liberação de IFN do tipo I em infecções por influenza.....	26
Figura 1.16: Mecanismo de inibição da replicação de HIV-1 por SAMHD1.....	30
Figura 3.1: Fluxograma geral do ensaio de inibição da replicação viral.....	40
Figura 3.2: Curva padrão do vírus A(H3N2) relacionando Ct e TCID <sub>50</sub> /mL.....	42
Figura 3.3: Exemplo das placas formadas pelo vírus A/H3N2 em células MDCK após 72 h de titulação pelo ensaio de PFU.....	43
Figura 3.4: Fluxograma geral do ensaio de <i>knockdown</i> para SAMHD1.....	46
Figura 4.1: Efeito de ligantes de CCR5 sobre a replicação do vírus influenza A(H1N1)pdm09 em células MDCK.....	51
Figura 4.2: Efeito do tratamento com os ligantes de CCR5 após infecção do vírus influenza A(H1N1)pdm09 em células MDCK.....	52

<b>Figura 4.3: Comparação dos títulos virais de A(H1N1)pdm09 crescidos em células A549 e MDCK.....</b>	<b>53</b>
<b>Figura 4.4: Comparação dos títulos virais de A(H3N2) crescidos em células A549 e MDCK.....</b>	<b>54</b>
<b>Figura 4.5: Avaliação dos ligantes de CCR5 e CXCR4 na inibição da replicação do vírus influenza.....</b>	<b>56</b>
<b>Figura 4.6: Infectividade dos vírus crescidos em células expostas aos ligantes de CCR5.....</b>	<b>57</b>
<b>Figura 4.7: Níveis proteicos de IFITM3 após a exposição dos ligantes de CCR5 em A549.....</b>	<b>60</b>
<b>Figura 4.8: Níveis de RNAm e proteicos de SAMHD1 em A549 após exposição dos ligantes de CCR5.....</b>	<b>62</b>
<b>Figura 4.9: Quantificação do nível de SAMHD1 por imunofluorescência após exposição dos ligantes de CCR5, em A549.....</b>	<b>65</b>
<b>Figura 4.10: Fatores de restrição modulados pelos ligantes de CCR5 em células A549.....</b>	<b>66</b>
<b>Figura 4.11: <i>Knockdown</i> de SAMHD1 em células A549.....</b>	<b>68</b>
<b>Figura 4.12: Quantificação do nível de SAMHD1 por imunofluorescência em A549 após <i>knockdown</i>.....</b>	<b>70</b>
<b>Figura 4.13: Níveis proteicos de SAMHD1 após exposição dos ligantes de CCR5 no modelo de <i>knockdown</i> para SAMHD1 em A549.....</b>	<b>71</b>
<b>Figura 4.14: Efeito do <i>knockdown</i> de SAMHD1 sobre a replicação de vírus influenza A em células A549.....</b>	<b>73</b>
<b>Figura 4.15: Efeito do tratamento com guanosina sobre a replicação de vírus influenza.....</b>	<b>74</b>
<b>Figura 4.16: Efeito do tratamento com guanosina sobre a replicação do vírus influenza em células previamente expostas aos ligantes de CCR5.....</b>	<b>75</b>

## LISTA DE TABELA

Tabela 3.1: Reagentes para a quantificação do gene M do vírus influenza A.....	41
Tabela 3.2: Reagentes para a síntese de cDNA.....	44
Tabela 4.1: Fatores restritivos analisados após exposição ao IFN- $\alpha$ humano em células A549.....	67

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

APOBEC3G	Do inglês “apolipoprotein mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like”
BSA	Albumina bovina sérica
cDNA	DNA complementar
CCL	Do inglês “chemokine (C-C motif) ligand”
CCR	Do inglês “C-C chemokine receptor”
CO <sub>2</sub>	Gás carbônico
CXCL	Do inglês “chemokine (C-X-C motif) ligand”
CXCR	Do inglês “C-X-C chemokine receptor”
DC	Célula dendrítica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DMEM	Do inglês “Dulbecco's Modified Eagle Medium”
dNTP	Desoxinucleotídeos
dsDNA	DNA dupla fita
dsRNA	RNA dupla fita
EDTA	Ácido etilenodiamino tetraacético
ELISA	Ensaio imunoenzimático
eUb	Ubiquitina extracelular
GPCR	Receptores associados a proteína G
HA	Hemaglutinina
HEPES	Ácido Hidroxi-Etil-Piperazina-Etano-Sulfônico
HSV-1	Vírus da herpes simples tipo 1
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
IFITM	Proteína transmembranar induzida por interferon
IFN	Interferon
IFNAR	Receptor de interferon- $\alpha/\beta$
IRF	Fator regulatório do interferon
ISG	Genes induzidos por interferon
MAVS	Proteína de sinalização antiviral mitocondrial
MDCK	Do inglês “Madin-Darby Canine Kidney Cells”
MDM	Macrófago derivado de monócitos
MIF	Do inglês, “macrophage migration inhibitory factor”

MLV	Vírus da leucemia murina
Mx1	Do inglês “myxovirus resistance 1”
MYD88	Do inglês “myeloid differentiation primary response gene 88”
NA	Neuraminidase
NEP	Proteína exportadora nuclear
NK	Células <i>Natural Killers</i>
NP	Nucleoproteína viral
NS	Proteína não-estrutural
OAS	Do inglês “2’-5’-oligoadenylate synthetase”
OMS	Organização Mundial de Saúde
OST-car	Oseltamivir carboxilato
PAMP	Padrão molecular associado a patógeno
PBS	Tampão fosfato salino
PB1	Proteína polimerase básica 1
PB1-F2	Proteína polimerase básica 1-F2
PB2	Proteína polimerase básica 2
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PRR	Receptores de reconhecimento padrão
qPCR	PCR em tempo real quantitativo
RIG-I	Do inglês “retinoic acid-inducible gene 1”
RNA	Ácido ribonucleico
RNAc	RNA complementar
RNAi	RNA de interferência
RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro
RNAv	RNA viral
RNaseL	Ribonuclease L
RNP	Ribonucleoproteína viral
ssRNA	RNA fita simples
SAMHD1	Do inglês “SAM domain and HD domain-containing protein 1”
SG	Síndrome gripal
SIV	Vírus da síndrome da imunodeficiência símia
SRAG	Síndrome respiratória aguda grave
STAT	Transdutor de sinal e ativador da transcrição

TLR	Receptores do tipo Toll
TPCK	Do inglês “tosyl phenylalanyl chloromethyl ketone”
Trim-5 $\alpha$	Do inglês “Tripartite motif-containing protein 5”
TRIM25	Do inglês, “Tripartite motif containing protein 25”
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa

# **1 INTRODUÇÃO**

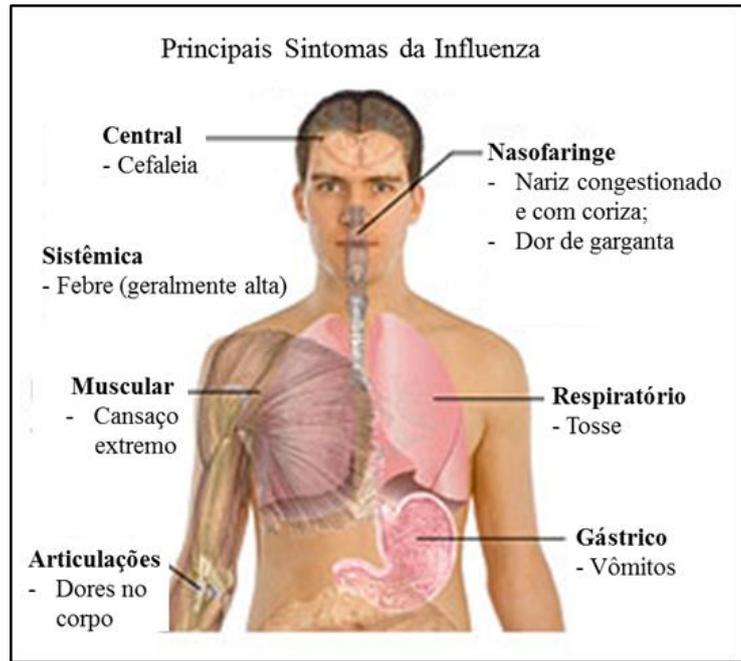
## **1.1. Vírus influenza**

### **1.1.1. Transmissão e sintomas**

O vírus influenza é o agente etiológico da gripe, uma infecção respiratória contagiosa que causa desde infecções brandas a doenças respiratórias graves, como pneumonia e a síndrome respiratória aguda grave (SRAG) (1).

O período de incubação do vírus no hospedeiro é de um a quatro dias dependendo da carga viral e do estado imunológico do hospedeiro e causam manifestações clínicas que são classificadas como síndrome gripal (SG) e SRAG.

A SG se caracteriza pelo aparecimento súbito de febre, cefaleia, dores musculares (mialgia), tosse, dor de garganta e fadiga, sendo a manifestação mais comum (Figura 1.1). A SRAG se caracteriza pela dificuldade respiratória e há necessidade de hospitalização com ventilação mecânica devido a diminuição da saturação de oxigênio (1). Além disso, nos casos mais graves, a infecção pelo vírus influenza pode causar pneumonia, miosite, comprometimento do sistema nervoso central e órbito (2–5).



**Figura 1.1: Principais sintomas da infecção pelo vírus influenza.**

Fonte: Adaptado de Lovelock, 2009.

A forma mais comum de transmissão do vírus influenza é a transmissão direta, de pessoa a pessoa, por meio de pequenas gotículas de aerossol, expelidas por indivíduos infectados com o vírus ao falar, espirrar ou tossir. O modo indireto de transmissão é através do contato com secreções de indivíduos infectados pelo vírus influenza, onde as mãos são o principal veículo levando a introdução de partículas virais diretamente nas mucosas nasal, oral e ocular (3).

Uma das características marcantes nos vírus influenza são os mecanismos evolutivos, que serão abordados mais adiante. As altas taxas de variações genéticas e o rearranjo gênico permitem o surgimento de novos vírus circulantes para o qual a população não tem imunidade. Se os novos vírus possuírem um elevado grau de infectividade e transmissibilidade de humano para humano, isto pode levar a um evento pandêmico (6).

### 1.1.2. Classificação e nomenclatura

Os vírus influenza são pertencentes a família *Orthomyxoviridae*. A principal característica dos vírus pertencentes a essa família é o material genético sob a forma de ácido ribonucléico (RNA) de fita simples segmentados e com polaridade negativa. A família *Orthomyxoviridae* possui atualmente sete gêneros: *Alphainfluenzavirus*, *Betainfluenzavirus*, *Deltainfluenzavirus*, *Gammmainfluenzavirus*, *Isavirus*, *Thogotovirus* e *Quaranjavirus*. Dentre estes gêneros, os vírus influenza estão presentes em: *Alphainfluenzavirus* (espécie: Influenza A), *Betainfluenzavirus* (espécie: Influenza B), *Deltainfluenzavirus* (espécie: Influenza D), *Gammmainfluenzavirus* (espécie: Influenza C) (7–10).

Os *Thogotovirus* foram isolados de carrapatos e são agentes infecciosos capazes de causar meningite e meningoencefalite em seres humanos. Os *Isavirus* estão relacionados a quadros clínicos de anemia infecciosa em salmões. Os *Quaranjavirus* também foram isolados de carrapatos e aves marinhas. Foram considerados arboviroses não classificados, mas hoje estão dentro da família *Orthomyxoviridae* (10).

Os vírus influenza se destacam dentro da família *Orthomyxoviridae* pela notória capacidade de causar doenças respiratórias. A classificação das espécies em A, B, C e D é decorrente das diferenças antigênicas da NP (nucleoproteína viral) e matriz (11). Os vírus influenza de importância clínica são o A e B. Estes vírus possuem um genoma de RNA octa-segmentado enquanto que o influenza C, diferentemente dos outros tipos, possui RNA hepta-segmentado e somente uma proteína de superfície, sendo pouco patogênico (12,13).

As três espécies de vírus influenza (A, B e C) diferem na gama de hospedeiros e na patogenicidade. As espécies B e C são isolados quase exclusivamente de humanos, enquanto a espécie A possui uma ampla variedade de hospedeiros (14). As aves aquáticas selvagens são os reservatórios naturais dos vírus influenza A mais importantes, que então podem ser transmitidos para outros animais vertebrados como cavalos, cachorros, baleias, aves silvestres migratórias, galinhas, porcos, humanos e, mais recentemente, foi encontrado esta espécie em morcegos (15,16).

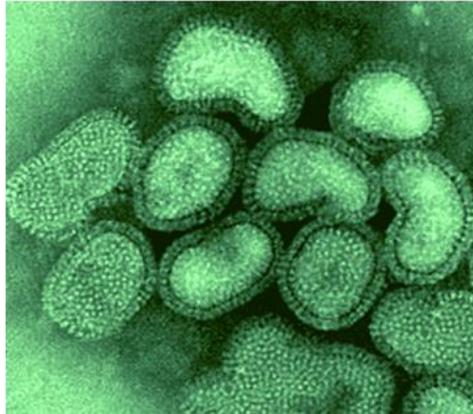
Até o presente momento já foram descritos, para os vírus influenza A, 18 tipos de hemaglutinina (H1 a H18) e nove tipos de neuraminidase (N1 a N11) encontrados em diferentes espécies animais (11). Sendo que os subtipos H17, H18, N10 e N11 foram identificados apenas por metagenômica (16,17).

Atualmente a nomenclatura dos vírus influenza A segue o seguinte padrão: indica-se o gênero viral (A); a espécie de onde o vírus foi isolado (no caso de humanos, esta é omitida); o local onde esta espécie se encontrava (país ou cidade); o número da amostra no laboratório; o ano do isolamento; e, finalmente, o subtipo de HA e NA (entre parênteses) (18). Por exemplo, o vírus influenza A/Switzerland/9715293/2013(H3N2), pertence ao gênero A, foi isolado em humano na Suíça, a amostra recebeu o número 9715293 no laboratório onde o isolamento viral foi realizado, no ano de 2013. Este vírus pertence ao subtipo H3N2.

Diferente do vírus influenza A, não há subtipos de influenza B até o momento. O gênero é constituído por diferentes linhagens (Yamagata e Victoria), que podem sofrer rearranjo entre os segmentos gênicos (19). Embora existam diferenças consideráveis entre as linhagens, seja em termos genéticos ou antigênicos, elas não são suficientes para a designação em diferentes subtipos. Então a nomenclatura adotada para influenza B descreve apenas o gênero, local de detecção, número de origem e ano (exemplo: B/Colorado/06/2017).

### **1.1.3. Estrutura genômica e proteínas do vírus influenza A**

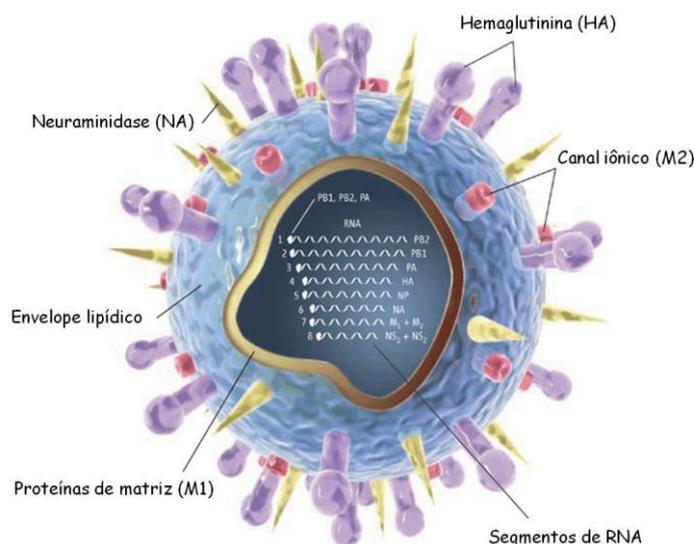
As partículas virais dos Influenza A são estruturas pleomórficas, medindo aproximadamente 100 nanômetros de diâmetro (Figura 1.2). São compostas por 0,8 a 1 % de RNA, 5 a 8 % de carboidratos, 20 % de lipídios e 70 % de proteínas (20).



**Figura 1.2: Micrografia do vírus influenza A.**

Fonte: Stannard, 1995 (20)

A partícula é composta por um envelope de bicamada lipídica, no qual as glicoproteínas de superfície HA, NA e M2 (canal iônico) são inseridas (12). Esse envelope é adquirido da célula hospedeira durante a replicação. Abaixo da bicamada lipídica, encontra-se as proteínas de matriz M1 e no genoma octa-segmentado do vírus influenza A estão as NP. Estas ficam junto dos segmentos genômicos (RNA viral) mais o complexo das polimerases PA, PB1 e PB2 (polimerase A, B1 e B2), formando as ribonucleoproteínas (RNP) (12,13). No total, são 8 RNPs, que codificam para 10 proteínas importantes e estas encontram-se ancoradas internamente ao envelope lipídico através da M1, que servem como proteínas adaptadoras. O vírus influenza A está esquematicamente representado na Figura 1.3.

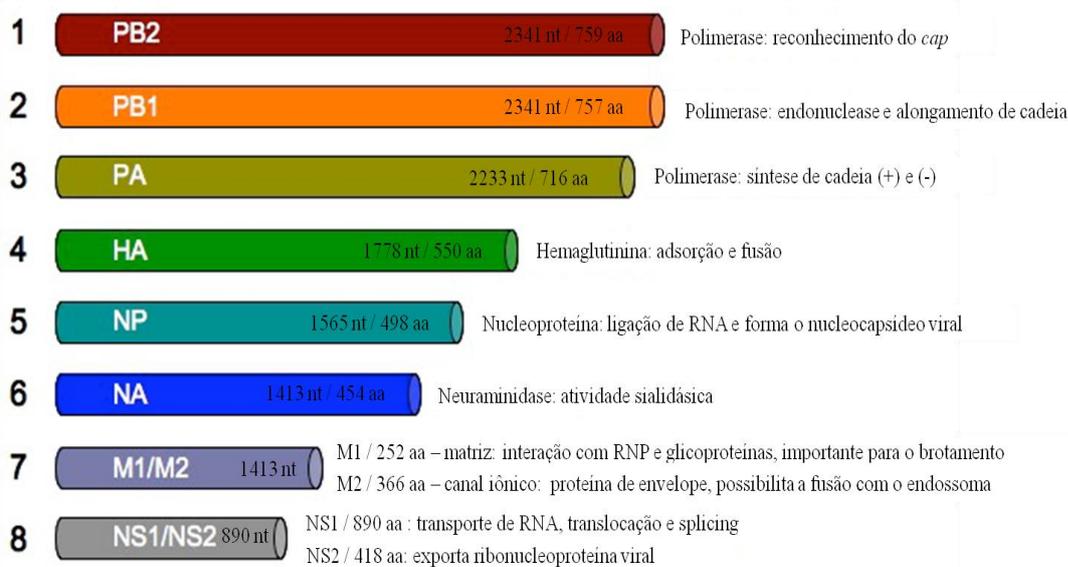


**Figura 1.3: Esquema representativo da estrutura do vírus influenza A.** As glicoproteínas HA e NA encontram-se inseridas no envelope lipídico, assim como a proteína M2, que forma o canal iônico viral. Abaixo do envelope encontra-se a proteína de matriz M1 e, internamente à matriz estão os oito segmentos de RNA viral (RNAv) fita simples polaridade negativa.

Fonte: Adaptado de *Kaiser, J. Science*, 2006 (21).

As proteínas codificadas pelo influenza A são: PA, PB1, PB2, HA, NA, NP, M1 e M2, NS1 e NS2. O gene PB1 pode gerar dois produtos gênicos menores: uma forma truncada da subunidade PB1 originada a partir de um códon de iniciação alternativo e um pequeno peptídeo, PB1-F2 (22).

O genoma tem cerca de 13600 nucleotídeos e os maiores genes do vírus influenza são os que codificam as proteínas componentes da polimerase (PB2, PB1 e PA) seguido da HA, NP e NA. Os menores genes são os M1/M2 e NS1/NS2 (Figura 1.4) (12,13).



**Figura 1.4: Representação esquemática do genoma dos vírus Influenza A.** Os segmentos gênicos estão numerados de 1 a 8. Cada barra indica um segmento gênico com a sigla da proteína por ele codificada, escrita na cor branca. No lado direito de cada barra encontram-se os tamanhos do gene (em nucleotídeos- nt) e da proteína (em aminoácidos- aa). Ao lado de cada barra está escrito o nome da proteína seguido de sua função.

Fonte: Adaptado do NIAID.

O complexo da polimerase viral é formado pelo heterotrímero PA, PB1 e PB2 e apresenta atividade RNA polimerase dependente de RNA. Este complexo é funcional para a transcrição e replicação viral, que participa da clivagem de RNA mensageiro (RNAm) do hospedeiro e transcreve o RNAv (-) em RNAm (+) (23).

O M2 é um canal de íon que permite o influxo de prótons para a partícula viral, promovendo diminuição do pH. O baixo pH faz com que a matriz M1 se “desintegre” e se solte das RNPs, o envelope viral se dissocia e as RNPs vão para o núcleo da célula (23).

A proteína NS1 participa da replicação viral e evasão do sistema imune. Acredita-se que essa proteína direcione a maquinaria celular para que se dê preferência a tradução das proteínas virais ao invés das proteínas do hospedeiro. Além disso, está relacionada a diminuição da resposta do interferon (antagoniza a resposta do interferon na célula), o que facilita a replicação viral (24). Já a proteína NS2 está associada a proteína exportadora nuclear (NEP), que auxilia no transporte das RNPs sintetizados para o citoplasma, acelerando o processo de replicação viral (25).

De todas as 10 proteínas virais, a hemaglutinina (HA) e a neuraminidase (NA) são as mais estudadas, pois possuem os principais sítios antigênicos do influenza. Ficam ancoradas no envelope lipídico, geralmente com uma proporção de 5 moléculas de HA para 1 de NA, e não se encontram, necessariamente, dispostas num arranjo homogêneo. Além disso, já foi visto que nesse envelope pode conter proteínas do hospedeiro (26).

A HA é uma proteína trimérica importante para adsorção viral, pois nela localiza-se o sítio de ligação que interage com resíduos de ácido siálico presentes na membrana citoplasmática do hospedeiro (27). Cada HA é sintetizada como HA0, composta por subunidades HA1 e HA2, que interagem entre si por ligações dissulfeto. A H0 é clivada em HA1 e HA2, no momento da infecção. Essa clivagem é essencial para a infecciosidade, pois expõe um peptídeo hidrofóbico presente na HA2, que é responsável por mediar a fusão do envelope viral com a membrana da célula (28).

A NA é uma proteína tetramérica que apresenta atividade sialidase, removendo a HA do ácido siálico no final da replicação viral, liberando as novas partículas virais (23). A NA é o alvo dos principais medicamentos anti-influenza utilizados na clínica.

#### **1.1.4. Ciclo replicativo viral**

A replicação do vírus influenza ocorre dentro do núcleo celular do hospedeiro. O vírus se adsorve a membrana celular do hospedeiro utilizando a HA, que se liga aos resíduos de ácido siálico presente nos glicoconjugados da superfície da célula (27). Os resíduos de ácido siálico nos humanos ficam associados a resíduos de galactose por ligações  $\alpha$ -2,3 ou  $\alpha$ -2,6, que se encontram preferencialmente no trato respiratório inferior e superior, respectivamente. Acredita-se que o vírus influenza A de aves tem preferência para ligações  $\alpha$ -2,3, enquanto que vírus influenza A de humanos utilizam preferencialmente a ligação  $\alpha$ -2,6 para adsorverem na célula hospedeira (29). Porém, determinadas mutações, como a D222G na HA do A(H1N1)pdm09, podem fazer com o vírus influenza A tenha maior tropismo pelo trato respiratório inferior, ou seja, ligue-se preferencialmente a resíduos  $\alpha$ -2,3 (30,31).

Após a adsorção viral, o vírus entra na célula por meio de endocitose. Uma vez dentro da célula, o vírus é encaminhado para o endossomo celular e neste ambiente fisiologicamente ácido, o canal de íon M2 é aberto. A abertura desse canal, acidifica a partícula viral e leva a dissociação entre a M1 e as RNPs, permitindo que estas sejam liberadas para o citoplasma celular (23). Além disso, a acidificação no interior da partícula viral causa uma mudança conformacional na HA, esta é clivada por proteases celulares em HA1 e HA2. A clivagem leva à exposição de seu domínio hidrofóbico contendo o peptídeo de fusão. Este se insere na membrana do endossomo, possibilitando sua fusão com o envelope viral (Figura 1.5) (23,28).

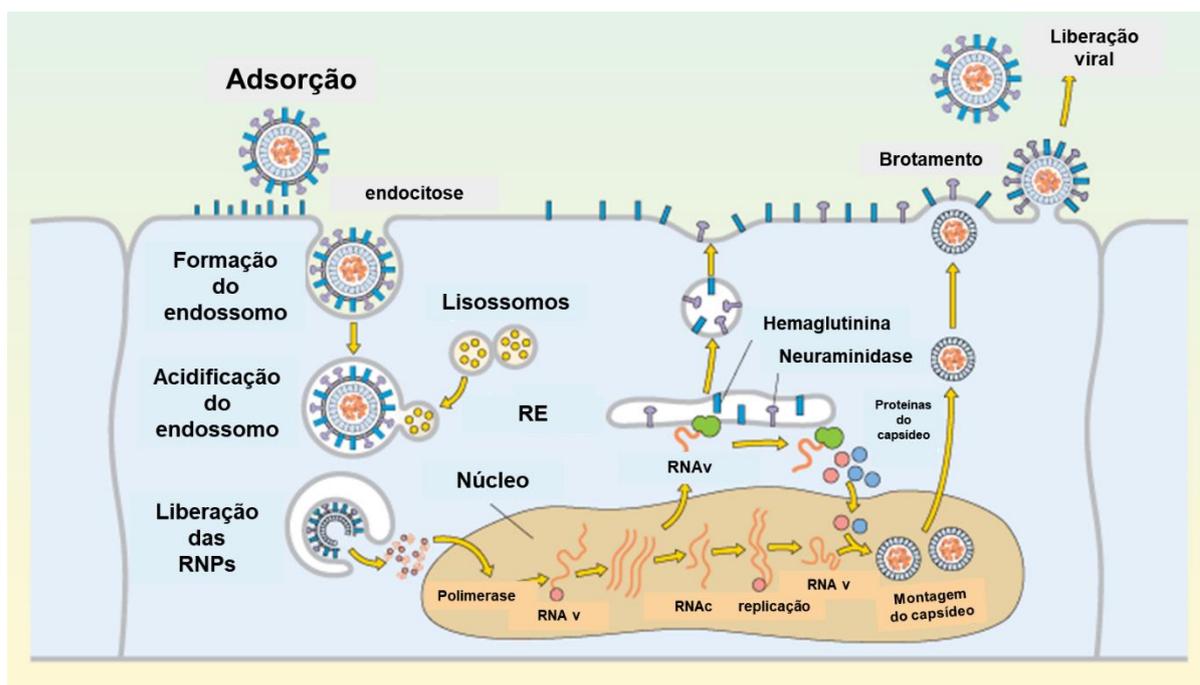
As RNPs liberadas são transportadas ao núcleo celular com auxílio das importinas  $\alpha$  e  $\beta$ , que reconhecem sinais de localização nuclear presentes na proteína viral NP. Já no núcleo, o complexo da polimerase dependente de RNA participa dos processos de transcrição e replicação do genoma viral (Figura 1.5) (23,25).

A transcrição se inicia com a utilização de um pré-RNA celular para adquirir a porção 5' capeados e formar os RNAmv. Os RNAm celulares decapeados são degradados enquanto que os RNAmv formados são transportados para o citoplasma celular com auxílio da proteína NEP/NS2, onde serão traduzidos em proteínas virais utilizando-se da maquinaria celular (32). As proteínas virais de superfície, como a HA, NA e M2, são processadas no retículo endoplasmático (RE) da célula, glicosiladas no complexo de Golgi e são direcionadas para a membrana plasmática celular (Figura 1.5).

A replicação ocorre em duas etapas: transcrição do RNA complementar (RNAc) de polaridade positiva e transcrição dos novos RNAv (polaridade negativa), utilizando o RNAc como molde. Logo após a formação dos novos RNAv, as NP se ligam e dão origem às novas RNPs, que se associam às proteínas M1 e NEP/NS2, previamente sintetizadas (18).

Juntamente com a maquinaria de exportação nuclear da célula, o complexo RNP-M1-NEP/NS2 é exportado do citoplasma celular até a região da membrana plasmática onde estão inseridas as proteínas de superfície virais. A proteína M1 é a responsável por recrutar todos os componentes virais para o sítio de brotamento, além de se associar à membrana plasmática celular (18). Então, as partículas virais são

liberadas por brotamento, e a NA é responsável pela liberação dos vírus recém-sintetizado, pois como citado anteriormente, cliva o ácido siálico da superfície da membrana, impedindo assim a sua aglomeração ou retenção na superfície da célula, devido à interação da HA com os resíduos siálicos (Figura 1.5) (23).



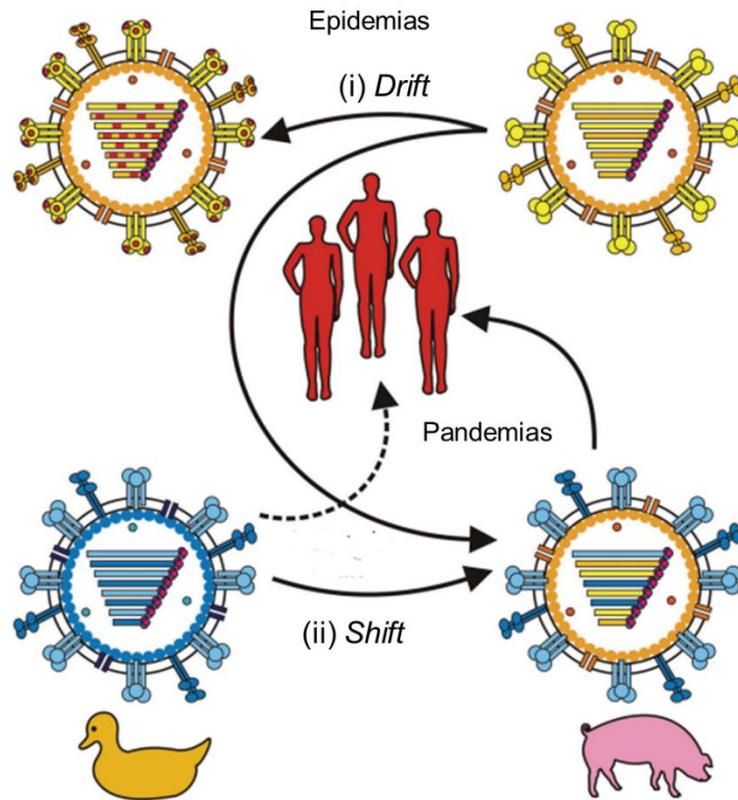
**Figura 1.5: Esquema da replicação do vírus influenza A.** A interação do vírus influenza a célula se dá por resíduos siálicos presentes na superfície celular. Então, ocorre a internalização da partícula viral por endocitose. No endossomo, através do canal M2 ocorre o influxo de prótons para dentro da partícula, o que desencadeia a fusão do envelope viral com a membrana endossomal, liberando as RNPs para o citoplasma. Estas são importadas ao núcleo, onde servem de molde para a transcrição. Novas proteínas são sintetizadas a partir do RNAm viral. O genoma viral é replicado utilizando como molde o RNAc de sentido positivo, feito a partir do próprio genoma viral. 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. Neste local, são recobertas por um envelope lipídico contendo as glicoproteínas da superfície viral (HA e NA) e a proteína M2. A NA é responsável pela liberação dos vírus recém sintetizados, pois cliva o ácido siálico da superfície membrana, impedindo assim sua aglomeração ou retenção na superfície da célula, devido à interação da HA com os resíduos de ácido siálicos. RE- reticulo endoplasmático.

Fonte: Adaptado de <https://www.open.edu/openlearn/science-maths-technology/science/biology/influenza-case-study/content-section-2.4> (2019).

### 1.1.5. Mecanismos evolutivos do vírus influenza A

Existem dois mecanismos de variabilidade genética presentes nos vírus influenza, o “*drift*” e “*shift*” antigênico. O *drift* antigênico são pequenas mudanças nos genes virais, que acontece continuamente durante o processo replicativo, uma vez que a polimerase viral não possui atividade corretiva (12,33,34). Todas as proteínas do vírus estão suscetíveis a mutações (inserções e deleções), e quando ocorrem principalmente nos genes que codificam para HA e NA o sistema imune do hospedeiro falha na contenção desse patógeno. Nesse caso, mudanças pontuais não são suficientes para que os vírus sejam antígenicamente diferentes, e nas análises filogenéticas estes permanecem próximos e relacionados (6,12). Até este ponto, o sistema imune do hospedeiro continua a reconhecer e montar uma resposta antiviral eficiente (6). Porém, o acúmulo das alterações genéticas pontuais pode levar a um vírus antígenicamente diferente e conseqüentemente, afastado nas análises filogenéticas (Figura 1.6). Quando isso ocorre, o sistema imune já não consegue reconhecer a partícula viral e com isso, falha em conter este patógeno (6,12). Portanto, é importante o constante monitoramento dos vírus circulantes e de suas mutações para que ocorra a atualização da vacina anual, pois os anticorpos neutralizantes para um determinado antígeno podem não ser mais eficazes para outro (30,35). Nos vírus influenza circulantes, esse fenômeno acontece de forma contínua e são uma das causas das epidemias sazonais que ocorrem todos os anos (Figura 1.6) (21).

Já o *shift* antigênico é a rearranjo de material genômico entre diferentes cepas de vírus influenza quando estes infectam uma mesma célula hospedeira (Figura 1.6). Este processo pode gerar um novo subtipo viral diferente dos dois iniciais. É uma mudança abrupta e pode causar pandemias, uma vez que a população não possui resposta imune para combater o novo vírus (Figura 1.6) (12,36). Como veremos a seguir, as pandemias de 1918, 1957, 1968 e 2009 foram causadas pelo processo de *shift* antigênico no vírus influenza.

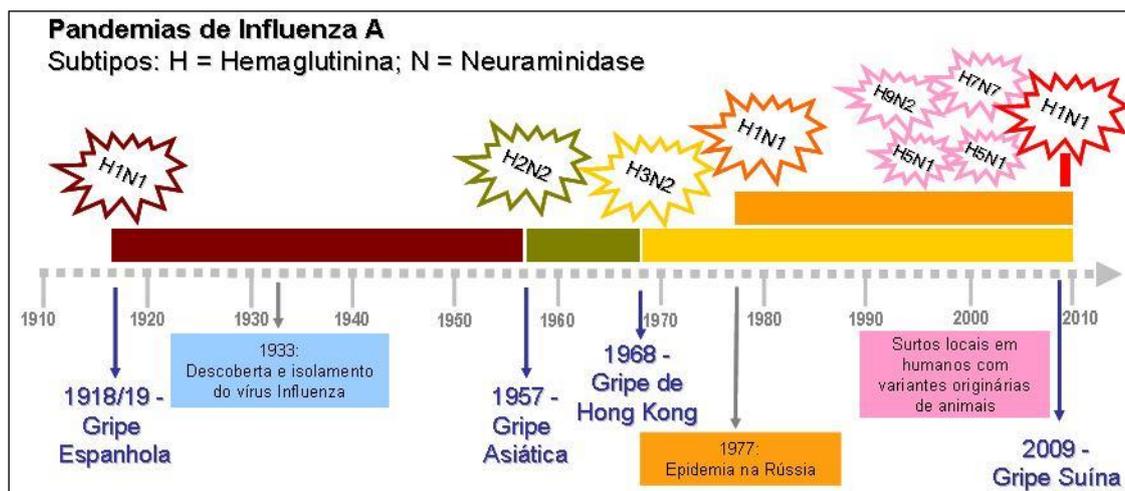


**Figura 1.6: Mecanismos de *drift* e *shift* antigênico.** (i) O acúmulo de mutações, principalmente na hemaglutinina viral leva a modificações importantes na partícula viral. Esse processo é o *drift* antigênico e é fenômeno causador das epidemias anuais de gripe, pois permite o escape do vírus do reconhecimento pelo sistema imune do hospedeiro. (ii) Quando uma mesma célula é infectada por dois ou mais diferentes tipos de vírus influenza, pode ocorrer o rearranjo gênico entre os segmentos gênicos virais. Esse processo é chamado de *shift* antigênico e a introdução deste novo subtipo viral na população humana pode causar pandemias, visto que esta população não tem proteção contra o novo vírus.

Fonte: Adaptado de van de Sandt CE, 2012 (33).

### 1.1.6. Pandemias do vírus influenza

Nos séculos XX e XXI ocorreram pandemias de influenza, além de surtos limitados da doença (37). Essas pandemias foram causadas pelo vírus influenza A e são conhecidas como gripe espanhola (1918/19), gripe asiática (1957), gripe de Hong Kong (1968), gripe russa (1977) e gripe suína (2009) (Figura 1.7) (38).



**Figura 1.7: Linha do tempo mostrando o histórico das pandemias ocasionadas pelos vírus Influenza A ocorridas nos séculos XX e XXI.**

Fonte: Adaptado de Siqueira et al., 2013 (38).

A gripe espanhola foi a primeira pandemia do século XX e ocorreu em 1918. Com uma alta taxa de morbidade e mortalidade, foi causada pelo vírus A(H1N1) e cerca de 50 milhões de óbitos ocorreram em todo o mundo, em decorrência da doença (37). Apesar de não ser totalmente esclarecido, o vírus A(H1N1) de 1918 provavelmente foi originado de um hospedeiro aviário (39,40).

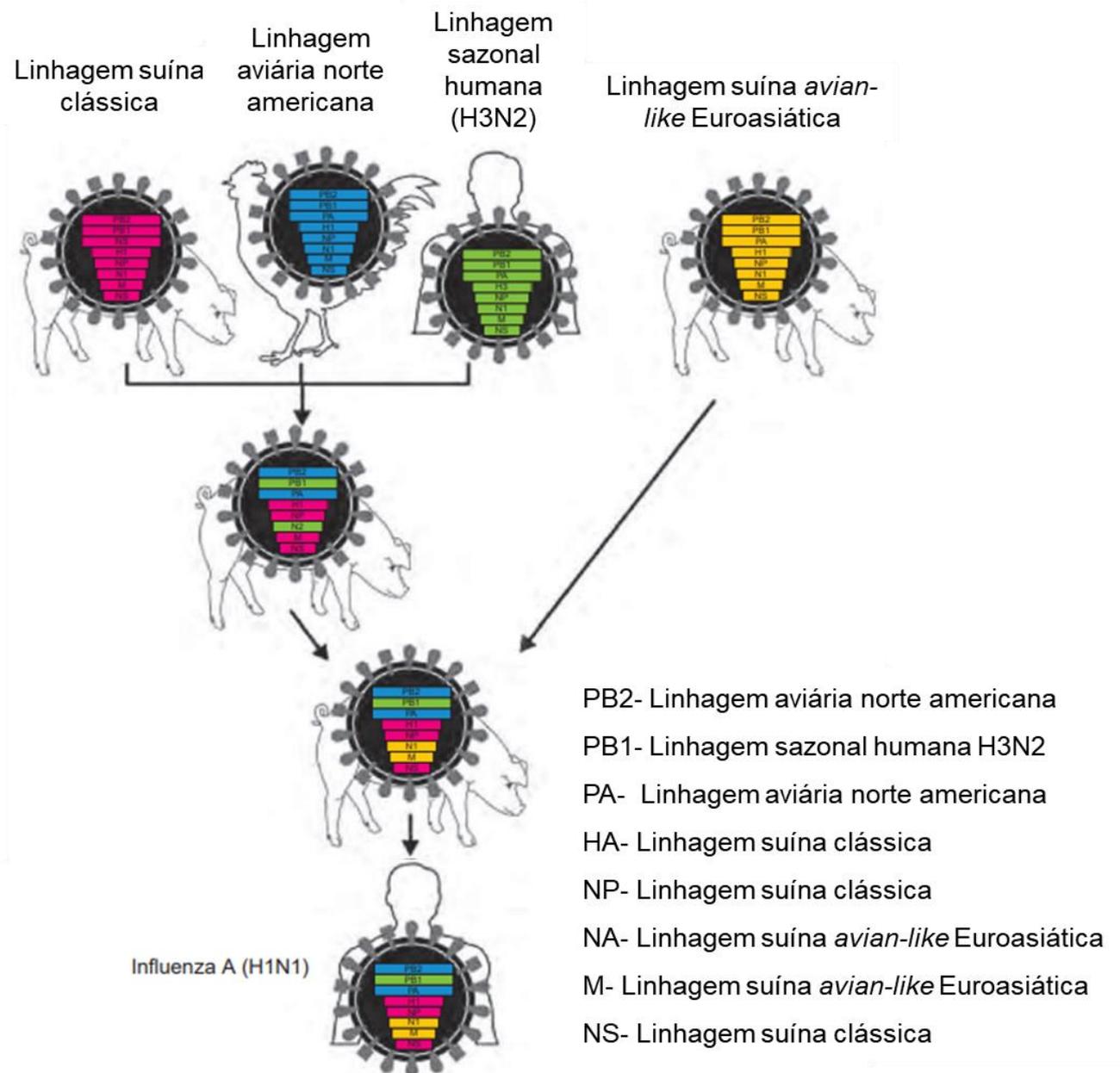
Esse vírus circulou na população até 1957, quando foi substituído por um novo subtipo, o A(H2N2), causador da gripe asiática. A gripe asiática causou mais de um milhão de óbitos ao redor do mundo e ocorreu devido a mutações presentes no novo subtipo viral. O A(H2N2) possuía segmentos gênicos de HA, NA e PB1 derivados de um vírus influenza aviário e o restante do genoma era do vírus já circulante na população (A/H1N1-1918), além de ter uma alta atividade sialidase (15,18,37). A vacinação contra o A(H2N2) foi descontinuada no final dos anos 60 e o vírus não foi

detectado circulando na população humana desde então. No entanto, a ausência de proteção na população mais jovem faz com esse vírus seja um potencial vírus pandêmico (18,41).

A gripe de Hong Kong ocorreu em 1968 e foi causada pelo vírus A(H3N2). Este vírus substituiu o vírus anterior circulante (A/H2N2) e possuía seis segmentos genômicos de A(H2N2) e os segmentos de HA e PB1 eram derivados da linhagem aviária Euroasiática (15,18). O vírus A(H3N2) continua a circular na população humana até hoje (30).

A partir de 1977, o subtipo A(H1N1) reapareceu na Rússia, tornando-se epidêmico. Entretanto, não substituiu o subtipo A(H3N2), passando esses dois subtipos de vírus influenza a circular concomitantemente entre a população mundial. Normalmente um destes vírus sazonais predomina, tornando-se epidêmico em determinado ano (42).

A pandemia de 2009 foi causada pelo vírus A(H1N1), sendo chamada de gripe suína (43,44). O vírus é produto de um rearranjo gênico triplo entre os vírus da linhagem clássica suína (HA, NP e NS), linhagem aviária norte americana (PA e PB2) e linhagem humana de H3N2 (PB1). O rearranjo desses vírus com a linhagem suína *avian-like* Euroasiática (NA, M) levou ao surgimento do vírus A(H1N1)pdm09 (Figura 1.8) (43). De abril de 2009 a agosto de 2010, a Organização Mundial da Saúde (OMS) reportou 18.500 óbitos relacionados a este vírus, porém estudos já mostraram uma taxa de mortalidade ainda maior (45). Após a pandemia de 2009, o vírus A(H1N1)pdm09 passou a circular na população juntamente com o A(H3N2) e influenza B, tornando-se portanto, um influenza sazonal que foi incluído nas vacinas de 2010 a 2019 (46).



**Figura 1.8: Origem dos segmentos gênicos do A(H1N1)pdm09.** Humanos, aves e suínos podem ser infectados simultaneamente por vírus influenza de diferentes linhagens do gênero A. Este fato combinado a segmentação do genoma possibilita o rearranjo gênico e o surgimento de cepas pandêmicas, como o A(H1N1)pdm09.

Fonte: Adaptado de Neumann, 2009 (44).

### **1.1.7. Epidemiologia do vírus influenza A no Brasil**

As infecções agudas do trato respiratório (IRA) são um problema de saúde pública persistente e generalizado, uma vez que constituem uma das principais causas de morbidade e mortalidade, gerando em torno de 4,5 milhões de mortes ao ano. Essas infecções representam o quarto lugar na causa de mortes no mundo (47) e são causadas principalmente pelos vírus respiratórios sincicial humano, rinovírus e também o vírus influenza (48).

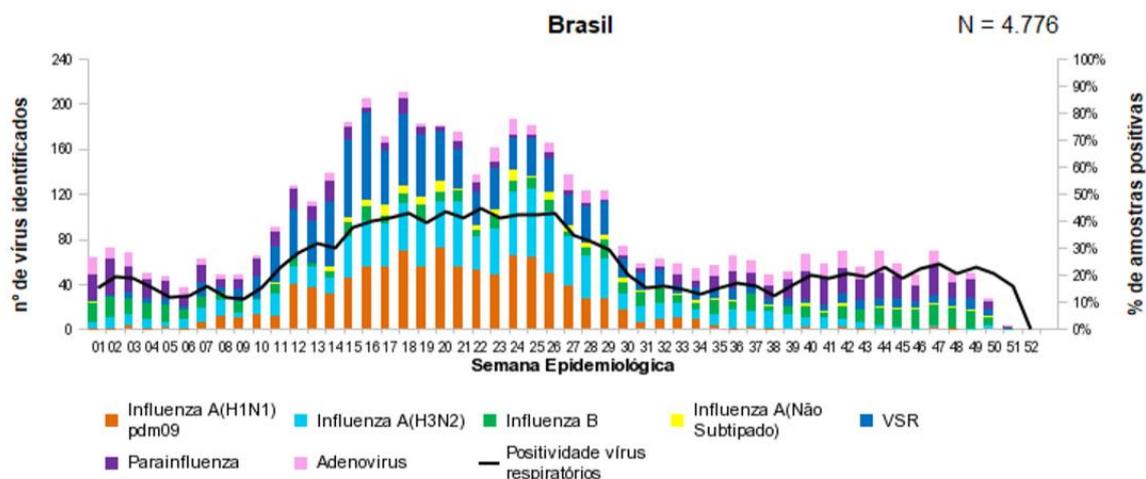
De acordo com a OMS, estima-se que esta doença afete com gravidade de 3 a 5 milhões de pessoas em todo o mundo, promovendo anualmente, de 290 a 650 mil óbitos relacionados a complicações da gripe (49). Os grupos de risco para esta doença são as gestantes, puérperas, crianças de 6 meses a menores de cinco anos, indivíduos com 60 anos ou mais de idade, povos indígenas, portadores de doenças crônicas não transmissíveis, população privada da liberdade, trabalhadores de saúde, funcionários do sistema prisional e professores, sendo estes os grupos prioritários do Ministério da Saúde nas campanhas de vacinação contra a gripe, no Brasil (1).

As infecções pelo vírus influenza apresentam um padrão sazonal. Como estes vírus disseminam-se principalmente durante o período de inverno, os surtos epidêmicos nos hemisférios norte e sul ocorrem em períodos diferentes do ano (50). Nas regiões temperadas a sazonalidade das epidemias são marcadas por flutuações na temperatura, umidade, entre outros. Já nas regiões tropicais, como o Brasil, os períodos de epidemia são mais diversificados (51).

O sistema de vigilância da circulação dos vírus influenza no Brasil é composto pela vigilância sentinela de SG e de SRAG em pacientes internados em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) e pela vigilância universal de SRAG. A vigilância epidemiológica tem objetivo de identificar as cepas de vírus circulantes durante o ano, informação crucial para o planejamento da composição da vacina anual de gripe, além de permitir o monitoramento da demanda de atendimento por essa infecção (52).

Durante os dias 31/12/2017 a 29/12/2018, o que corresponde as semanas epidemiológicas (SE) 01 a 52 de 2018, das 18.478 amostras coletadas e inseridas no sistema, 4.776 casos de SG tiveram resultado positivo para vírus respiratórios, das

quais 55,9% foram positivos para influenza. Dentre as amostras positivas para o vírus influenza, 38,4% foram decorrentes de influenza A(H1N1)pdm09, 19,9% de influenza B, 4,7% de influenza A não subtipado e 37,0% de influenza A(H3N2) (Figura 1.9) (52).

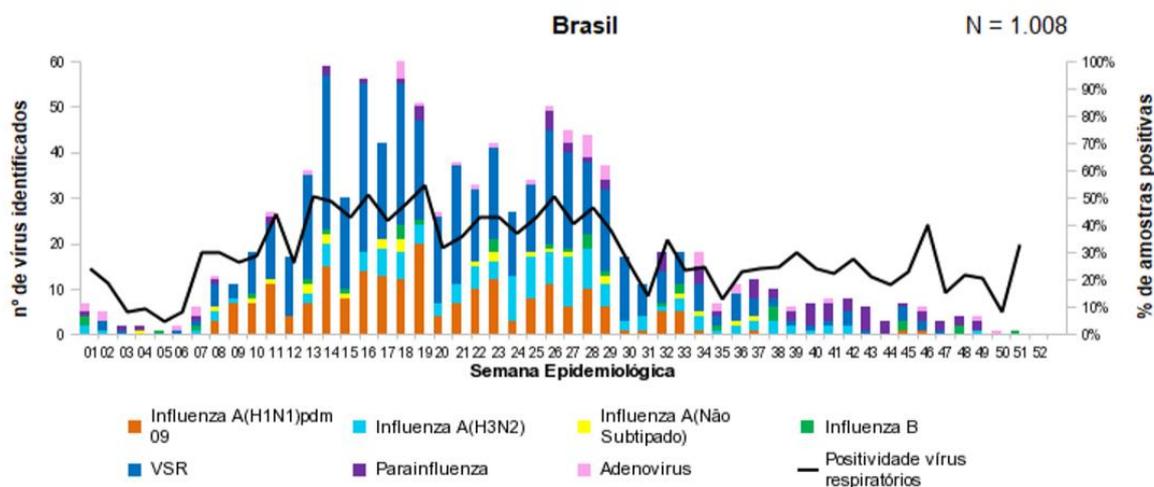


**Figura 1.9: Perfil da circulação das cepas do vírus influenza no Brasil em casos de SG, identificados pela vigilância epidemiológica até a semana 52 de 2018.**

VSR- Vírus Sincicial Respiratório.

Fonte: Ministério da Saúde, 2018 (52).

Para os casos de SRAG em UTI, durante as SE 01 a 52 de 2018, das 2.843 amostras coletadas inseridas no sistema, 1.008 tiveram resultado positivo para vírus respiratórios das quais 39,9% foram positivos para o vírus influenza. Das amostras positivas para influenza foram detectados 53,2% para influenza A(H1N1)pdm09, 6,5% para influenza A não subtipado, 8,2% para influenza B e 32,1% para influenza A(H3N2) (Figura 1.10) (52).



**Figura 1.10: Perfil da circulação das cepas do vírus influenza no Brasil em casos de SRAG em UTI, identificados pela vigilância epidemiológica até a semana 52 de 2018.**

Fonte: Ministério da Saúde, 2018 (52).

Em relação aos óbitos, da SE 01 a 52 de 2018, foram notificados 5.278 óbitos por SRAG. Destes, 26,2% foram confirmados para vírus influenza, sendo 66,4% decorrentes de influenza A(H1N1)pdm09, 9,3% influenza A não subtipado, 5,6% por influenza B e 18,6% influenza A(H3N2). O estado com maior número de óbitos pelo vírus influenza foi São Paulo (52).

Para o ano de 2019, até a SE 17 (27 de abril de 2019) foram inseridas no sistema 4.618 amostras coletadas de SG. Destas amostras, 1.115 foram positivas para vírus respiratórios e dentre estas, 32,4% foram positivos para o vírus influenza. Para SRAG foram notificados 9.406 casos, no qual 6.308 amostras possuem diagnóstico definido, sendo 8,5% classificadas como SRAG por vírus influenza. Logo, até final de abril tivemos 535 casos de SRAG por vírus influenza, com 99 óbitos (53). Até abril de 2019, a região Norte liderava o ranking com o maior número de casos e óbitos por SRAG causadas pelo vírus influenza, seguida da região Sudeste (53). Vale destacar que na região norte a epidemia sazonal por influenza tem iniciado antes do restante do país (54).

### 1.1.8. Tratamento e prevenção anti-influenza

Atualmente, além da vigilância epidemiológica dos vírus influenza, são adotadas mais duas estratégias para o controle da circulação viral no mundo, sendo elas, a utilização de drogas antivirais e a vacinação anual contra o vírus influenza.

#### 1.1.8.1. Antivirais

Existem duas classes de antivirais para utilização no tratamento contra o vírus influenza, os inibidores do canal iônico M2 e inibidores da neuraminidase (NAI). Os derivados de adamantanos, amantadina e rimantadina, são inibidores do canal M2 e foram a primeira classe de anti-influenza usada (Figura 1.11) (55). O efeito destas moléculas ocorre através do bloqueio dos canais M2 e conseqüentemente, o impedimento da fusão do envelope viral com a membrana do endossomo, prevenindo a liberação das RNPs para o núcleo. No entanto, a maior parte dos vírus influenza circulantes são resistentes aos adamantanos (56,57).

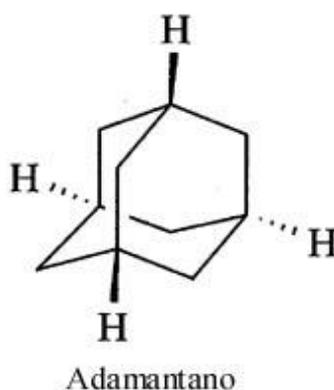
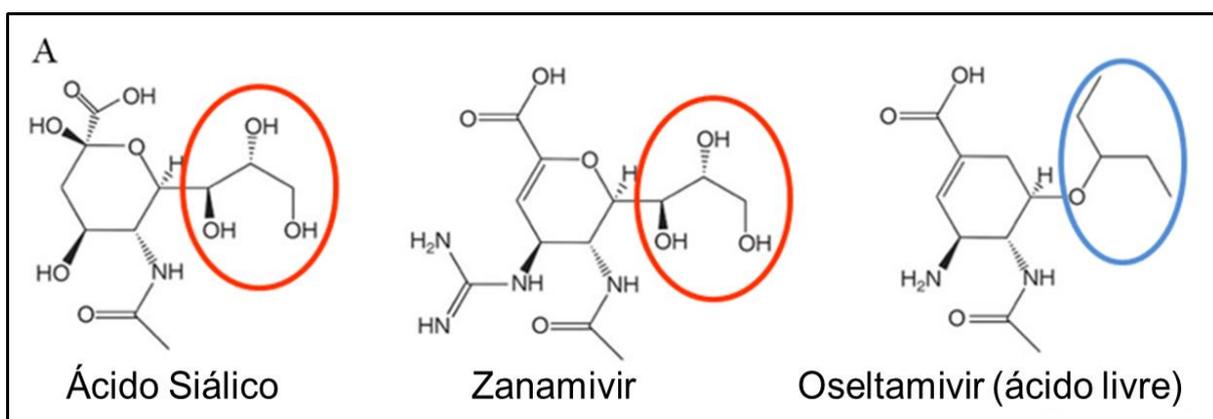


Figura 1.11: Estrutura principal dos adamantanos

Atualmente, a classe de NAI é a mundialmente mais recomendada para o tratamento de infecções por influenza. Essas drogas chegaram ao mercado no final dos anos 90 e existem quatro compostos disponíveis: oseltamivir (Tamiflu®), zanamivir (Relenza®), peramivir (Rapivab®) and laninamivir (Inavir®), que diferem entre si no modo de administração, biodisponibilidade e estrutura química (58). O mecanismo de ação desses compostos é através da ligação de forma competitiva ao sítio ativo da enzima viral neuraminidase, impedindo que ocorra a clivagem do ácido siálico e consequente liberação do vírus influenza no trato respiratório (23). Este mecanismo de inibição pode ser justificado pela semelhança entre as estruturas químicas dos NAI com o ácido siálico (substrato para a clivagem da NA), estabelecendo uma inibição competitiva pelo sítio ativo desta enzima (Figura 1.12).

Embora a maioria das cepas de influenza A e B circulantes sejam suscetíveis aos NAIs, a pressão imposta pelo oseltamivir (OST) levou à seleção de mutantes resistentes a esta molécula, com uma prevalência de 1-2% em diferentes países (59). Essa forte redução de sensibilidade ao OST é caracterizada pela mutação H275Y (numeração de N1) na NA viral (60). Além disso, cepas resistentes já foram identificadas em amostras de pacientes que não receberam este tratamento (61,62). Dados do nosso grupo mostraram a presença de vírus A(H1N1)pdm09 resistentes e com susceptibilidade diminuída ao oseltamivir no Brasil, em 2009, 2011, 2012 e 2014-2016 (61,63).

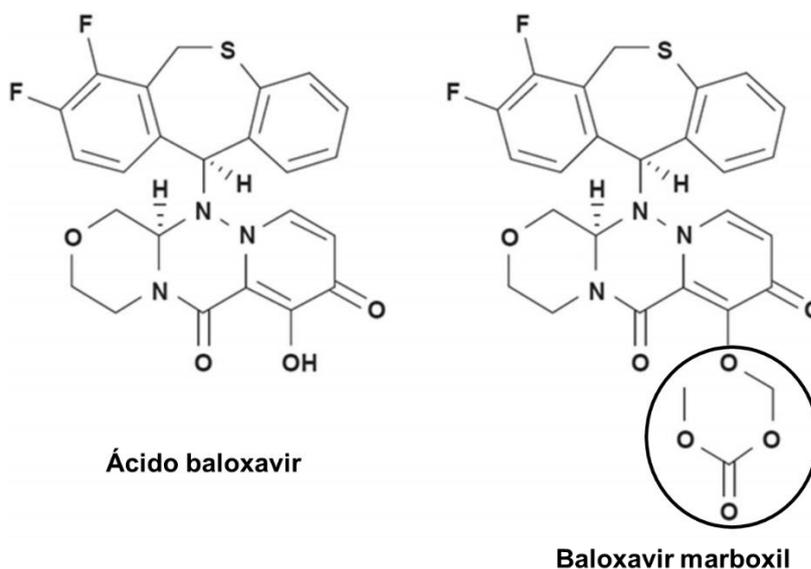


**Figura 1.12: Comparação estrutural entre o ácido siálico e os NAI.** Estruturas químicas do ácido siálico, zanamivir e oseltamivir (A e B). A principal diferença entre elas são os grupos glicerol (marcados com círculos vermelhos) e L-ethylpropoxy (marcado com círculo azul).

Fonte: Adaptado de Das et al., 2010 (64).

Além dos inibidores classicamente utilizados na clínica, mais recentemente, uma nova classe de moléculas inibidoras da polimerase do influenza foi aprovada, o ácido baloxavir (xofluza™) e o favipiravir (T-705), o primeiro pelo FDA (*Food and Drug Administration*) americano e ambos pelo Japão (62)(65).

O ácido baloxavir é a forma ativa derivada do pró fármaco baloxavir marboxil. O mecanismo de ação desta molécula é pela inibição da atividade endonuclease dependente de cap do complexo da polimerase do vírus influenza (Figura 1.13) (66). Sem essa atividade, o vírus não consegue utilizar os pre-RNA<sub>m</sub> do hospedeiro para adquirir a porção 5' cap e formar os RNA<sub>m</sub>v.

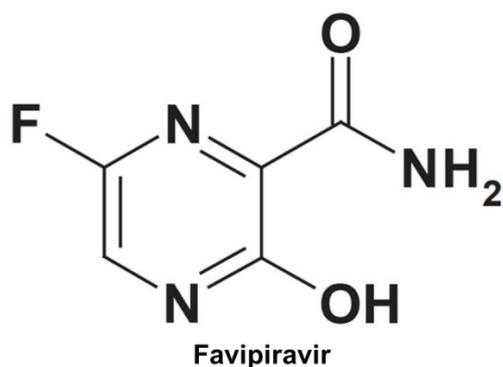


**Figura 1.13: Estrutura química do ácido baloxavir (forma ativa) e baloxavir marboxil (forma pró droga).** A diferença entre as duas formas é a presença de um grupo fenólico a mais na baloxavir marboxil (marcado com círculo preto), que aumenta a absorção oral desta molécula.

Fonte: Adaptado de Omoto et al, 2018 (66).

O favipiravir é um fármaco antiviral que inibe a atividade da polimerase viral de diversos vírus de RNA, incluindo o influenza (Figura 1.14) (67,68). Esta molécula é ativada quando sofre uma fosforibosilação intracelular (favipiravir ribofuranosil-5B-trifosfato, F-RTP). Acredita-se que o mecanismo de ação consiste na incorporação F-

RTP aos RNAv sintetizados ou se ligando aos domínios da polimerase, impedindo a adição dos nucleotídeos para a síntese de novos RNAv e RNAmv (67).



**Figura 1.14: Estrutura química do favipiravir.**

Fonte: Adaptado de Furuta et al, 2017 (67)

Tem sido proposto a utilização destas moléculas em combinação com o OST. Dados laboratoriais têm mostrado que essa combinação retarda a morte de camundongos imunocomprometidos infectados com A(H1N1)pdm09, mas não evita o surgimento de resistência ao OST (69). Além disso, já foram observadas mutações de resistência e de redução de sensibilidade em genes da polimerase de A(H1N1)pdm09 e A/H3N2 frente a esses novos antivirais em cultura de células (70) e em crianças hospitalizadas (sem que estas tivessem se quer recebido o antiviral) (71), respectivamente.

#### 1.1.8.2. Vacinas

Conforme anteriormente abordado, os mecanismos evolutivos dos vírus influenza os tornam capazes de escapar da resposta imune do indivíduo, o que demanda a formulação anual da vacina globalmente utilizada (72).

As vacinas inativadas são particuladas e compostas, basicamente, pelas glicoproteínas de superfície HA e NA. Estas vacinas são trivalentes, conferindo

imunidade para os três vírus Influenza de maior importância epidemiológica: A/H1N1, A/H3N2 e B (73). No ano de 2019, a composição vacinal trivalente para o hemisfério norte foi: A/Brisbane/02/2018 (H1N1); A/Kansas/14/2017(H3N2) e B/Colorado/06/2017(74). Já para o hemisfério sul foi A/Michigan/45/2015 (H1N1); A/Switzerland/8060/2017 (H3N2) e B/Colorado/06/2017 (75).

Em 1999, foi incorporada ao Programa Nacional de Imunizações do Brasil, uma estratégia de vacinação contra a influenza, com o propósito de reduzir internações, complicações e mortes na população alvo para a vacinação. Na campanha de 2019, que foi de 10 de abril a 31 de maio, teve uma cobertura vacinal aproximada de 90%, porém nem todos os integrantes do público alvo e estados do país cumpriram com os 90% de cobertura vacinal estabelecido pelo ministério da saúde (76). Este fato chama atenção para a importância da divulgação dos riscos da doença e benefícios da vacinação (1).

Anualmente, são feitas modificações nas vacinas de influenza sazonal contra as cepas virais em circulação. A OMS, recomenda as cepas virais que deverão ser utilizadas na produção das vacinas no hemisfério sul, essa recomendação é geralmente feita no mês de setembro de cada ano. A Anvisa publica uma Resolução (RE), na qual define a composição vacinal que será utilizada no país no ano seguinte, em conformidade com as determinações da OMS (77). É importante ressaltar que desde a definição da cepa vacinal até a administração na população é necessário um período de 6 meses para a produção da vacina, este período é crítico no caso de pandemias, uma vez que a população não tem imunidade prévia e fica mais sujeita a um pior prognóstico.

## **1.2. Imunidade inata na infecção por influenza**

### **1.2.1. Resposta imune inata em infecções por influenza**

As infecções virais promovem uma alteração no perfil de sinalização, a nível molecular, das células hospedeiras, durante a disputa entre patógeno e hospedeiro pela maquinaria celular. A liberação de interferon (IFN) pelas células é o início do estabelecimento de um estado antiviral nas mesmas (78).

Em contrapartida, os vírus possuem a capacidade de inibir cascatas de sinalizações intracelulares ou proteínas antivirais, com o objetivo de bloquear as atividades antivirais da célula, levando ao aumento da replicação viral (79). O balanço entre estes, e outros eventos, levará ao favorecimento do desenvolvimento de uma patologia ou à recuperação do hospedeiro (80).

Os vírus influenza no geral possuem tropismo para células epiteliais alveolares, presentes no trato respiratório inferior. Células como macrófagos e células dendríticas, apesar de serem infectadas não produzem uma progênie viral, sendo considerada uma infecção abortiva (11).

As barreiras de defesa do organismo contra esse patógeno contam com a presença de muco, além da presença de citocinas como IFN e genes induzidos por IFN (ISGs), que atuam como a primeira linha de defesa das células (13).

Durante a infecção pelo vírus influenza, os RNAs são padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), que são detectados pelos receptores de reconhecimento padrão (PRRs) (81).

Os vírus influenza podem ser detectados por alguns PRR, como por exemplo os receptores da família do tipo toll (TLRs) e a família de receptores de ácido retinóico (RIG) (11). Os TLRs 3, 7/8 estão presentes no endossomo celular e tem como alvo o RNA de dupla fita (dsRNA) (82) e RNA de fita simples (ssRNA), respectivamente (83). O TLR 3 é encontrado em células dendríticas, células do epitélio respiratório e macrófagos alveolares (82) enquanto o TLR 7 e 8 estão presentes em neutrófilos, macrófagos, células dendríticas e monócitos (84,85). O RIG-I encontra-se no

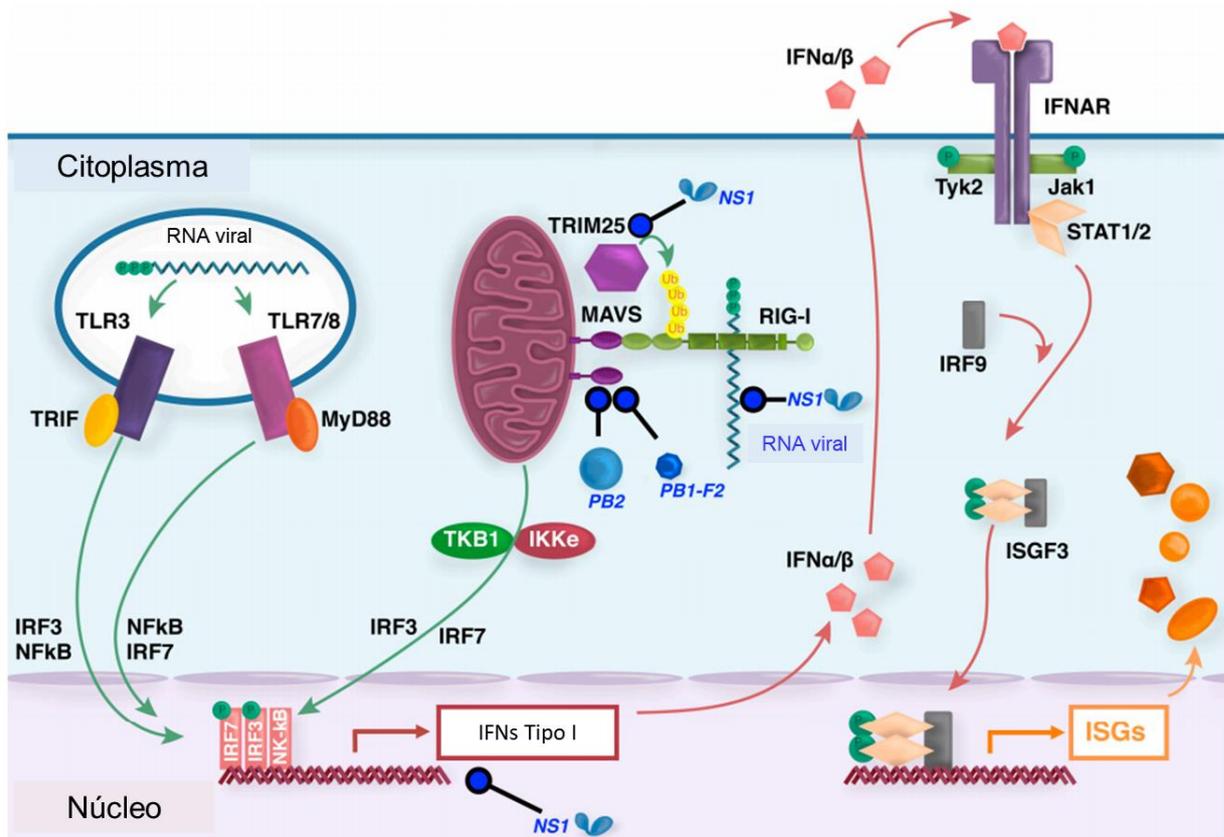
citoplasma celular e reconhece dsRNA citoplasmático que tenha sido capeado com 5' trifosfato (5' ppp), durante a replicação viral (86).

O reconhecimento do vírus nos compartimentos endossomais pelos TLR 3, 7/8 ativam proteínas adaptadoras TRIF ou MyD88, respectivamente. De forma semelhante, a família de sensores RIG no citoplasma quando na presença do RNAv, induz uma mudança conformacional no RIG que permite a associação com proteína de sinalização antiviral mitocondrial (MAVS). A ativação destas proteínas induz cascatas de sinalizações que culminam na translocação de fatores de transcrição como NFκB, fator regulatório do IFN 3 (IRF 3) e IRF 7 para o núcleo, que levam a expressão de IFN do tipo I (IFN-α e IFN-β) (Figura 1.15) (82,83).

Com a liberação de IFN do tipo I no microambiente, esta molécula irá atuar de maneira autocrina e parácrina, ligando-se ao complexo de receptores de IFN na superfície da célula (IFNAR). Esses receptores estão associados as cinases, tirosina cinase 2 (Tyk2) e janus cinase 1 (Jak1), que recrutam os fatores de transcrição de transdução de sinal e ativador da transcrição (STAT). A junção de STAT com IRF 9, forma o fator de gene induzido por IFN 3 (ISGF3), que é translocado ao núcleo para induzir a expressão de ISGs (Figura 1.15) (11).

Existem mais de 6000 ISGs que codificam para diferentes proteínas responsáveis por crescimento, diferenciação e proliferação celular (87). Com essa abrangência de funções, esses genes também estão envolvidos nas respostas às infecções virais (88). As proteínas celulares que possuem funções antivirais são chamadas de fatores de restrição, que serão abordadas mais adiante. Grande parte desses fatores são transcricionalmente controlados pelo IFN.

No entanto, o vírus influenza codifica proteínas que antagonizam a resposta do IFN, evadindo desta forma do sistema imune. A proteína NS1 do vírus inibe a produção e sinalização por IFN do tipo I (24,89). Já se sabe que essa proteína se associa ao RNAv, fazendo com que não seja detectado no citoplasma e também se ligando ao RIG-I, impedindo a ativação de IRF3 e a liberação de IFN-β (Figura 1.15) (89). Além disso, inibe diretamente atividade de ubiquitinase da proteína TRIM 25, atividade essencial para o papel antiviral de RIG-I (90). A proteína PB2 e PB1- F2 interage com a proteína MAVS, inibindo a expressão de IFN-β (Figura 1.15) (91,92).



**Figura 1.15: Liberação de IFN do tipo I em infecções por influenza.** Durante a infecção pelo vírus influenza, o RNA viral é exposto nos endossomos e no citoplasma celular podendo então ser detectado pelos receptores do tipo Toll, TLRs 3,7 e 8 ou pelo sensor citoplasmático de receptores de ácido retinóico, RIG-I. Os TLRs 3 e 7/8 ativam uma cascata de sinalização através das proteínas adaptadoras TRIF e MyD88, e o RIG-I através da proteína de sinalização antiviral mitocondrial (MAVS). A ativação dessas vias leva ao recrutamento de fatores regulatórios do IFN, IRF3 e IRF7, além do fator de transcrição NFκB. Juntos, esses fatores são translocados ao núcleo, induzindo a expressão de RNAm para IFN-α e IFN-β (IFN do tipo I). Essas citocinas são direcionadas para fora das células, e se ligam de forma autócrina e parácrina ao complexo de receptores de IFNα/β presentes na superfície celular. Uma vez ativado, esses receptores que estão associados as cinases, tirosina cinase 2 (Tyk2) e janus cinase (Jak1), recrutam os fatores de transcrição de transdução de sinal e ativador da transcrição (STAT). A junção de STAT com IRF 9, forma o fator de gene induzido por IFN 3 (ISGF3), que é translocado ao núcleo para induzir a expressão de genes induzidos por IFN. A proteína não estrutural NS1 se liga ao RNA viral impedindo o reconhecimento desse PAMP no citoplasma, além de se ligar a proteína TRIM 25, prevenindo a atividade ubiquitinase, que é importante para o papel viral de RIG-I. A proteína PB2 e PB1- F2 do influenza interage com a proteína adaptadora antiviral mitocondrial, MAVS, inibindo a expressão de IFN-β. A NS1 do influenza inibe a produção e sinalização de IFN do tipo I.

Fonte: Adaptado de Villalón-Letelier, 2017 (11).

### 1.2.2. Fatores de restrição

Os fatores de restrição são proteínas com atividade antiviral que estão presentes de forma constitutiva no hospedeiro. Essas proteínas se contrapõe a replicação viral, restringindo a capacidade replicativa do vírus. São consideradas por muitos autores como uma imunidade intrínseca da célula frente a infecções virais, diferente da imunidade clássica que conta com macrófagos, células dendríticas (DC) e natural killers (NK) (93).

As características de um fator restritivo são geralmente definidas como uma proteína cuja principal função é inibir a replicação viral, são induzidos por IFN ou pela própria infecção e são antagonizados por uma ou mais proteínas virais (93).

Inicialmente, o termo fator de restrição era usado somente em estudos sobre infecções por retrovírus, como é o caso dos fatores restritivos Lv1 e Ref1 conhecidos pela inibição da replicação do vírus da leucemia murina (MLV) e lentivirus (94).

Interessantemente, ainda no campo da retrovirologia, foi percebido que os vírus expressam proteínas que se contrapõe a determinados fatores de restrição. Um exemplo clássico é a proteína acessória chamada vif (fator viral de infectividade) do HIV-1. Esta proteína antagoniza a ação de defesa do fator restritivo APOBEC3G. APOBEC3G tem função antiviral e está relacionada a duas propriedades: a habilidade da proteína em se ligar em RNA fita simples e atividade desaminase em fita simples de DNA (95). Vif recruta APOBEC3G para o complexo ubiquitina ligase E3 e conseqüentemente leva a degradação da proteína pela via ubiquitina-proteossoma (96,97).

No entanto, esse termo foi expandido para outros tipos virais, visto que os fatores de restrição poderiam inibir a replicação de outros vírus além de retrovírus. Por exemplo, as proteínas MX são GTPases induzidas pelo IFN, sendo a Mx1 reconhecadora de RNPs dos vírus influenza (98), bloqueando a amplificação do RNAv a partir dos RNAc (99). Já as OAS são sintetases que induzem a degradação de RNA via RNAseL. A RNAseL ativada degrada os ssRNA viral e celular, diminuindo a

replicação de vírus da hepatite C, por exemplo (100). Também foi observado que a atividade antiviral de OASL é devido ao aumento da sinalização de RIG-I (101).

Outro importante fator de restrição viral é conhecido como teterina, que inibe a liberação das partículas virais da superfície celular por brotamento, impedindo a dispersão viral, na ausência de vpu (102). Já a Trim5 $\alpha$  liga-se ao capsídeo do HIV, bloqueando estágios iniciais da replicação viral, impedindo o transporte do cDNA ao núcleo (103,104).

Além destes fatores citados, o SAMHD1 e a família de proteínas transmembranares induzidas por IFN (IFITM) são proteínas muito conhecidas na literatura por seus efeitos antivirais na replicação de diversos vírus (105–109). Esses fatores restritivos serão melhor abordados nos tópicos abaixo.

#### **1.2.2.1. SAMHD1**

SAMHD1 (*sterile alpha-motif and histidine-aspartate domain-containing protein 1*) é uma proteína dNTPase que converte os desoxinucleotídeos (dNTPs) em desoxinucleosídeos e fosfato inorgânico (110). É formada por 626 aminoácidos e regula diretamente o pool de dNTPs intracelular disponível na célula, através da atividade trifosfohidrolase. Os sítios ativos dessa enzima residem no motivo  $\alpha$  e nos domínios HD da proteína. Essa atividade enzimática é regulada pela ligação de dGTP aos sítios alostéricos de SAMHD1 (110,111). Esta proteína pode ser encontrada nas formas monoméricas, diméricas e tetraméricas, porém a forma tetramérica é a que possui atividade dNTPase (111,112). Durante o ciclo celular, SAMHD1 é fosforilada por ciclina A2 e CDK1 na posição Treonina 592 (T592) em células cíclicas, porém ainda permanece controverso se essa regulação por quinases afeta a atividade enzimática (113).

A proteína SAMHD1 está envolvida em doenças autoimunes como a síndrome Aicardi-Goutières, alguns tipos de câncer e restrição viral. É também estimulada por IFN e tem sido largamente estudada como fator restritivo a replicação de retrovírus como HIV, SIV e MLV (109,114,115). Inicialmente foi observado que o mecanismo de

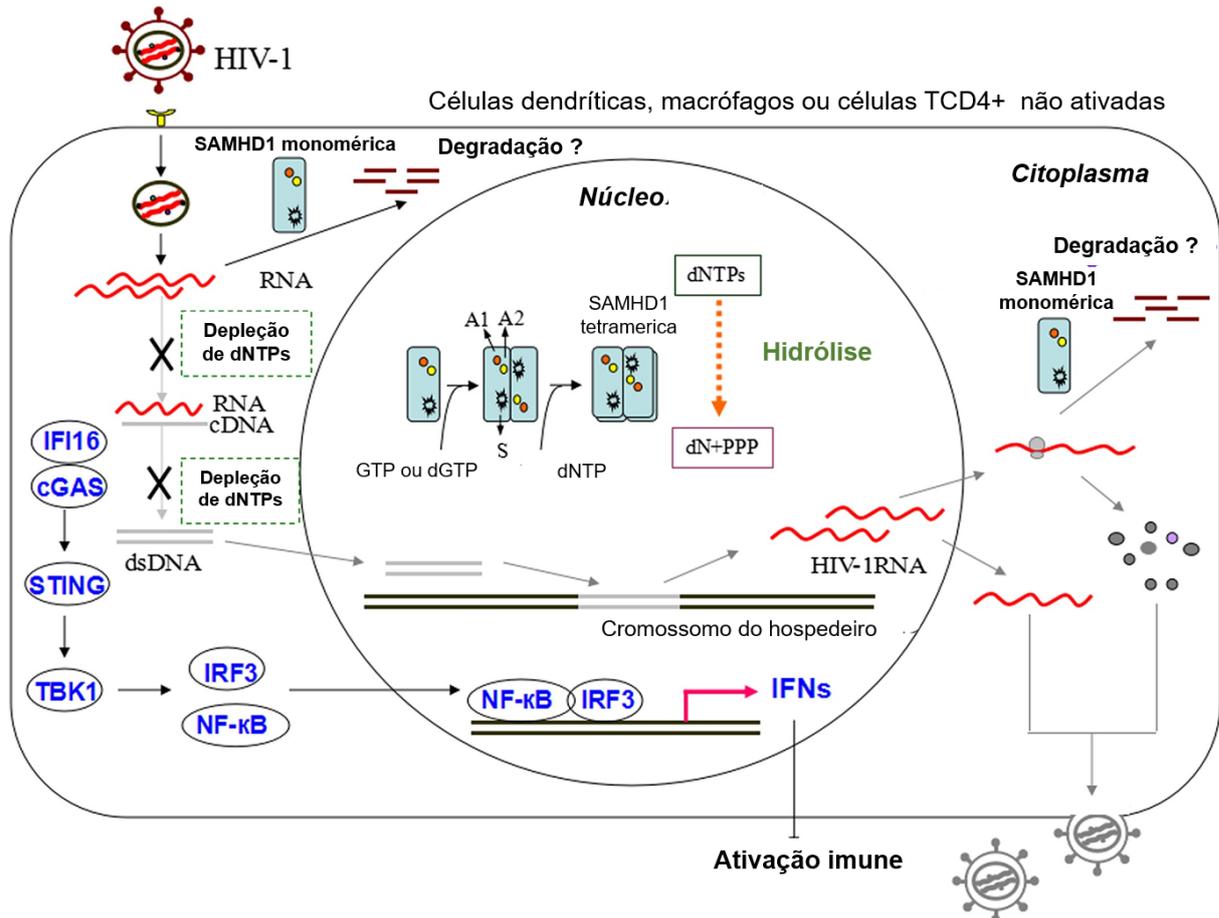
inibição desses vírus era através da diminuição dos dNTPs na célula, culminando em uma menor atividade da transcriptase reversa (109).

No ciclo de replicação do HIV-1, a proteína gp120 do vírus se liga ao CD4 da célula, o que muda a conformação estrutural e aumenta sua afinidade pelos receptores CCR5 ou CXCR4 (116). Em seguida, ocorre a fusão do envelope viral a membrana celular, permitindo o acesso do core viral ao citoplasma. A proteína SAMHD1 é uma desoxinucleotídeo trifosfohidrolase ativada por guanosina trifosfato/desoxiguanosina trifosfato (GTP ou dGTP), que se liga aos sítios alostéricos A1, A2 e ao sítio catalítico, formando uma SAMHD1 tetramérica (117). Com a atividade dNTPase ativada, os níveis de dNTPs intracelular reduzem. Esta redução causa uma insuficiência para a produção de cDNA viral, prejudicando a replicação do HIV-1 (Figura 1.12). O HIV-2 e SIV por sua vez, expressam a proteína viral X (Vpx) que antagoniza a função antiviral de SAMHD1, levando a uma degradação dependente de proteassoma (118).

No entanto, uma nova atividade enzimática de SAMHD1 foi descrita, que também poderia levar a uma inibição da replicação viral. Já foi demonstrado que SAMHD1 pode interagir com ssRNA e ssDNA, promovendo sua oligomerização (119). Em 2014, Ryoo e colaboradores observaram uma atividade ribonuclease em SAMHD1, que inibia a replicação do HIV por degradar o RNAv diretamente (120). Esta atividade foi descrita como sendo específica para os retrovírus e não para outros vírus de RNA, porém tem sido discutido que este conceito não é conciliável ao fato de que a ligação do ácido nucleico ao SAMHD1 não apresenta especificidade de sequência (121). Já 2016, Antonucci e colaboradores discutiram que a inibição da replicação do HIV-1 por SAMHD1 não ocorria via atividade ribonuclease (122), o que foi contestado por Ryoo neste mesmo ano (123). Logo, o efeito desta atividade sobre o HIV-1 ainda é controverso.

Vírus de DNA como Hepatite B e Herpes simples do tipo 1 (HSV-1) já mostraram-se sensíveis ao SAMHD1 em modelos celulares como hepatócitos e macrófagos (108,124). Nestes casos, a atividade dNTPase também é o mecanismo inibitório. Até o momento, para vírus de RNA, além dos HIV, observou-se que SAMHD1 inibe a replicação de um vírus da síndrome respiratória e reprodutiva suína (PRRSV) (125). O PRRSV é um vírus envelopado de ssRNA de polaridade positiva, e

a superexpressão de SAMHD1 *in vitro* diminui a síntese do RNAc viral, inibindo desta forma a replicação viral (125).



**Figura 1.16: Mecanismo de inibição da replicação de HIV-1 por SAMHD1.** O SAMHD1 monomérico contém 2 sítios alostéricos (A1 e A2) e um sítio de ligação ao substrato (S). A ligação de GTP ou dGTP a um sítio alostérico (A1) promove a formação de SAMHD1 dimérico. A ligação de qualquer dNTP aos sítios alostéricos não específicos (A2) e sítios catalíticos (S) gera a forma tetramérica de SAMHD1. Esta forma possui atividade dNTPase, que hidrolisa os dNTPs em dN e trifosfato inorgânico. Dessa forma, SAMHD1 restringe a infecção por HIV-1 em células T CD4+ em repouso, macrófagos e células dendríticas, pois reduz a concentração de dNTPs intracelulares de tal forma que impede a síntese do cDNA viral. Sem o cDNA viral, há um bloqueio na produção de dsDNA viral e com isso o HIV-1 não integra esse material genético ao cromossomo da célula hospedeira. Ainda, é relatado que SAMHD1 também restringe a replicação do HIV-1 através de sua atividade ribonuclease, degradando diretamente o RNA do vírus no citoplasma da célula. O DNA do HIV-1 pode ser detectado pelos sensores de DNA cGAS e IFI16 que ativam um adaptador STING. O STING fosforila ainda mais o TBK1 e depois ativa os fatores de transcrição IRF3 e NFκB, que finalmente induzem a expressão de IFNs do tipo I e ativação da resposta imune.

Fonte: Adaptado de Li, 2017 (126).

### 1.2.2.2. IFITM3

Os IFITM são formados por cerca de 130 aminoácidos que se dividem em duas porções transmembranares variáveis e uma porção citoplasmática conservada. Nos humanos existem 5 genes codificadores para estas proteínas (ifitm1, ifitm2, ifitm3, ifitm5 e ifitm10), todos localizados no cromossomo 11 (127). Em 2009, os IFITM foram identificadas como importantes fatores restritivos à infecção pelos vírus influenza A H1N1, West Nile e Dengue (128). Posteriormente, se observou que estas proteínas são restritivas a entrada de vírus como Marburg, Ebola, Coronavirus SARS, Influenza A, Hepatite C, Zika e Metapneumovirus (105–107,129).

Já foi descrito que a atividade antiviral do IFITM acontece no início da replicação viral. No caso do vírus da hepatite C, os vírus são sequestrados no caminho endossomal e levados aos lisossomos para a destruição (129). Já os vírus influenza, são bloqueados no início da fusão (hemifusão) entre o envelope viral com a membrana do endossomo (130). No entanto, ainda não se sabe exatamente como o IFITM impede a fusão das membranas, mas acredita-se que este fator promova uma alteração das propriedades físicas da membrana (131).

Assim como outros, nosso grupo já demonstrou a relação entre aumento dos níveis proteicos de IFITM3 e a diminuição da replicação do influenza. Em trabalhos anteriores, vimos que a replicação do vírus influenza em células de origem epitelial (HeLa) e em macrófagos derivados de monócitos humanos foi inibida, quando estas células eram previamente infectadas/expostas ao HIV-1, ou apenas a sua principal proteína de superfície (gp120) (132). Este efeito ocorre mesmo em células que não apresentam CD4 em sua superfície, mas sim apenas os receptores celulares de quimiocinas CCR5 e CXCR4 (132).

### 1.2.3. Receptores de quimiocinas

As quimiocinas são pequenas proteínas que participam da resposta imune no organismo e que são expressas nos tecidos em homeostase, durante injúrias e inflamações. Essas moléculas ligam-se aos receptores presentes nas células que, quando ativados, desencadeiam sinalizações intracelulares (133).

Classicamente, as quimiocinas são importantes devido ao papel de quimiotaxia, no qual o gradiente dessas moléculas, ao longo do microambiente inflamatório, induz a migração de células imunes ao local da inflamação (134). No entanto, estão envolvidas em outros papéis biológicos como angiogênese e hematopoiese (135,136). Essas moléculas são classificadas em quatro grupos distintos, dependendo do posicionamento do motivo de cisteína no terminal NH<sub>2</sub>. Os membros da família incluem CXC, CC, C e CX3C das quais CXC ( $\alpha$ -quimiocinas) e CC ( $\beta$ -quimiocinas) são os grupos melhor caracterizados (137).

Os receptores de quimiocinas quando são ativados pelos seus ligantes específicos adquirem uma mudança conformacional, permitindo a ativação de efetores intracelulares como a proteína G e  $\beta$ -arrestina. Além disso, quando ativados, esses receptores apresentam características importantes na sua regulação, incluindo dessensibilização, processo no qual estes se tornam refratários a estimulação contínua dos agonistas (133). Após ativação, ocorre a fosforilação, internalização, reciclagem e degradação dos mesmos, sendo estes mecanismos importantes para evitar o estímulo prolongado destes receptores (138).

Geralmente, os receptores para quimiocinas são transmembranares e estão associados a proteína G (GPCR) (133). Quando ativos, os GPCR agem como um fator de troca de nucleotídeos de guanina se ligando a GTP e permitindo a subunidade  $\alpha$  da proteína G se dissociar da subunidade  $\beta\gamma$ . Os GPCR atuam utilizando segundos mensageiros na célula para a transdução de sinal e o tipo de segundo mensageiro ativado depende do subtipo de GPCR. As proteínas G $\alpha$  são divididas em quatro grupos: G $\alpha_q$ , G $\alpha_s$ , G $\alpha_i$ , G $\alpha_{12/13}$ . G $\alpha_q$  ativa a fosfolipase C (PLC), estimulando a liberação de cálcio intracelular, G $\alpha_s$  ativa a adenilato ciclase estimulando a produção

de AMP cíclico (AMPC); G $\alpha$ i inibe a adenilato ciclase, inibindo a produção de AMPC; G $\alpha$ 12/13 ativa a família de GTPases Rho (139).

Durante a infecção por vírus influenza *in vitro* e *in vivo*, ocorre aumento da expressão do receptor CCR5 e das quimiocinas como CCL2, (MCP-1) CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ), CCL4 (MIP-1 $\beta$ ), CCL5 (RANTES) e CXCL10 (IP-10) (140,141). Sabidamente, a infecção por influenza promove um estímulo de uma grande quantidade de moléculas inflamatórias (citocinas e quimiocinas), para direcionar o infiltrado de células inflamatórias à resolução da infecção (141,142).

Porém, dados do nosso grupo sugerem que os receptores de quimiocinas podem ter outras funções além das descritas. Como mencionado anteriormente, a proteína do HIV-1 gp120 foi capaz de diminuir a replicação do vírus influenza *in vitro* (132). A gp120, que pode atuar como um agonista endógeno, é uma proteína que se liga aos receptores CCR5 e CXCR4 (143).

O CXCR4 alguns ligantes naturais como o CXCL12 (SDF-1), MIF e ubiquitina extracelular (eUb) (144), sendo os dois últimos ligantes alternativos e não cognatos. Já foi descrito que o eixo CXCL12/CXCR4 é envolvido em diversos tipos de câncer, proliferação e migração celular (145). Já o CCR5 possui três ligantes agonistas totais, o CCL3, CCL4 e CCL5 (146) e é envolvido em ativação de leucócitos e quimiotaxia, secreção de citocinas e proliferação celular (143,147,148).

Um polimorfismo interessante do CCR5 é o CCR5 $\Delta$ 32. Indivíduos homozigotos para essa característica apresentam uma deleção de 32 pares de base no gene que codifica para o receptor CCR5, o que resulta na ausência dessa molécula na superfície celular (149). Indivíduos que possuem o CCR5 mutante são resistentes a infecções por HIV-1 com tropismo para este receptor (150). Entretanto, na literatura já foi descrito um pior prognóstico para indivíduos com a mutação  $\Delta$ 32 em infecções por vírus influenza e West Nile (151,152). De forma contrária, nosso grupo e outros já mostraram que esta mutação não influencia durante o curso clínico da infecção por influenza nas amostras que foram analisadas (153,154). Logo, ainda permanece controverso o papel do receptor CCR5 em infecções por influenza.

### 1.3. Justificativa

Já foi descrito na literatura que indivíduos caracterizados como CCR5 $\Delta$ 32, o curso da infecção por influenza durante a pandemia foi agravado, culminando em maior taxa de mortalidade. Em contrapartida, dados do nosso grupo e de outros mostram que esta deleção não está associada a desfechos desfavoráveis, quanto a infecção por vírus influenza e outros tipos virais. Além disso, dados do nosso grupo já demonstraram que a replicação do vírus influenza em células de origem epitelial (HeLa) e em macrófagos é inibida quando estas células são previamente expostas ou infectadas pelo HIV-1. Observamos também que apenas a principal proteína de superfície do HIV, gp120, dispara este mesmo fenômeno e o fator restritivo IFITM3 era responsável pela inibição da replicação. Adicionalmente, foi observado que a molécula de CD4 não era necessária, sendo importante os receptores CCR5 e CXCR4 para o efeito inibitório. Os fatores restritivos são proteínas bem estudadas que inibem a replicação de diversas espécies de vírus. Apesar disso, ainda não está bem elucidado o mecanismo de ação, como são ativadas durante a infecção e se polimorfismos nestas proteínas podem causar algum impacto na resposta imune do hospedeiro. Com base nesses conhecimentos, hipotetizamos que a ligação de agonistas dos receptores CCR5 ou CXCR4 poderia levar a modulação de fatores celulares de restrição viral. É importante ressaltar que estes dados são interessantes do ponto de vista do conhecimento básico sobre a biologia das infecções virais, uma vez que, apesar de muitos fatores de restrição serem estudados, a importância deles para cada vírus ainda não está totalmente desvendada. Além disso, traz perspectivas sobre o desenvolvimento de moléculas agonistas e antagonistas de receptores celulares com atividade contra agentes virais de grande importância para a saúde pública, que poderiam ser administrados em conjunto ou substituindo moléculas antivirais já associadas ao surgimento de resistência.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo geral**

Avaliar se os ligantes endógenos e exógenos dos receptores celulares CCR5 e CXCR4, são capazes de modular fatores de restrição e a replicação do vírus influenza A, *in vitro*.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Avaliar o efeito de ligantes dos receptores CCR5 e CXCR4 na replicação do vírus influenza;
- Avaliar a infectividade dos vírus crescidos em células expostas aos ligantes de CCR5;
- Identificar fatores de restrição viral modulados pelos ligantes de CCR5;
- Avaliar a modulação dos níveis proteicos de SAMHD1 pelos ligantes de CCR5 e o seu efeito na inibição da replicação viral;
- Avaliar o papel do nucleosídeo guanosina sobre a replicação do vírus influenza.

### **3 Metodologia**

#### **3.1 Cultivo celular**

Células epiteliais de rim canino (MDCK) e células de linhagem de epitélio pulmonar humano (A549) foram cultivadas, respectivamente, em meio DMEM high glyucose (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) (Gibco, Nova Iorque, EUA) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (SFB) (Gibco, Nova Iorque, EUA), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina (Invitrogen, Nova Iorque, EUA) (meio DMEM completo). Ambas culturas foram mantidas em garrafas de poliestireno de 75 cm<sup>2</sup>, em atmosfera de 5% de gás carbônico (CO<sub>2</sub>) à 37 °C e acompanhadas diariamente ao microscópio óptico de campo claro. Para o repique, as células foram lavadas com PBS (tampão salina fosfato) pH 7,2 e tratadas com tripsina-EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) 0,25 %.

#### **3.2 Crescimento e titulação do estoque viral**

A cepa viral utilizada nos experimentos foi a influenza vacinal A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2), cedida pelo IRR (*Influenza Reagent Resource*) e adaptada para laboratório. Para o crescimento viral, esta cepa foi inoculada em células MDCK com meio de inoculação contendo DMEM high glyucose, 0,2 % de albumina (BSA) e HEPES (25 mM) (155). Após 1 hora de infecção, o meio foi trocado para o meio de inoculação acrescido de 2 µg/mL de tripsina-TPCK (*tosyl phenylalanyl chloromethyl ketone*). A cultura foi incubada em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> à 37 °C e acompanhada diariamente até a observação do efeito citopático (CPE), que são alterações causadas nas células devido à infecção viral. Quando 75% da monocamada celular apresentava CPE, o sobrenadante da cultura era coletado e centrifugado a 2500 rpm, por 10 minutos. O precipitado contendo os restos celulares foi descartado e o sobrenadante contendo os vírus foi coletado e congelado à -70 °C. A titulação foi feita pelo método de TCID<sub>50</sub>/mL (título de vírus infectivo para 50% da cultura celular), realizada pelo método de ELISA, preconizado em protocolos

internacionais (155), e calculada pela metodologia de Reed & Muench (156). Esse ensaio determina a maior diluição viral capaz de infectar 50% das células em cultura. Assim, células MDCK previamente semeadas em placas de 96 poços ( $2 \times 10^4$  células/poço) foram expostas a diluições virais seriadas de base 10. Após 18 horas de infecção, o título viral foi quantificado por ensaio imunoenzimático (ELISA), seguindo o protocolo já estabelecido pela OMS (155).

### **3.3 Atividade Neuraminidase**

Inicialmente, foram avaliados o melhor modelo de infecção para estudo e MOI (multiplicidade de infecção- relação vírus/célula) viral a ser utilizado. A quantificação viral nesta etapa foi a atividade neuraminidase (NA) devido a facilidade e rapidez para a detecção do vírus influenza.

#### **3.3.1 Ensaio com células MDCK**

Afim de identificar o papel dos ligantes de CCR5 sobre a infecção do vírus influenza, células MDCK foram semeadas em placas de 24 poços ( $3 \times 10^4$  células/poço) e cultivadas em meio DMEM completo. Vinte e quatro horas depois, as células foram lavadas com PBS e expostas ou não as quimiocinas humanas (ligantes endógenos): CCL3 (30 ng/mL), CCL4 (15 ng/mL), CCL5 (15 ng/mL) (R&D Systems). As concentrações usadas neste trabalho foram 3x a dose efetiva (ED50) de quimioatração de células em cultura (dado fornecido pelo fabricante). A concentração utilizada é compatível com a concentração utilizada para ativação dos receptores CCR5 (146). Vinte e quatro horas após exposição, as células foram lavadas com meio de inoculação e infectadas por 1 hora com o vírus A(H1N1)pdm09 (A/Michigan/45/2015) em dois MOIs (0.05 e 0.5), à 37 °C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse tempo, o inóculo foi retirado e o meio foi trocado para meio de inoculação com 1,5 µg/mL de tripsina-TPCK. Vinte e quatro horas após infecção (hpi), os sobrenadantes foram recolhidos e em seguida, diluídos numa proporção de 1:5 em

tampão de lise do kit comercial NA-Star® (Life Technologies, EUA). Em seguida, foi adicionado o substrato (1,2- dioxetano) para a enzima neuraminidase do vírus e a incubação foi de 15 minutos, à 37 °C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, a atividade neuraminidase (NA) foi quantificada por luminescência, seguindo as instruções do fabricante. Os resultados foram obtidos em unidades relativas de luz (RLU).

Posteriormente, células MDCK foram semeadas em placas de 24 poços (3 x 10<sup>4</sup> células/poço) e cultivadas em meio DMEM completo. Vinte e quatro horas depois, as células foram lavadas com meio de inoculação e infectadas por 1 hora com o vírus A(H1N1)pdm09 no MOI de 0.05, à 37 °C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse tempo, o inóculo foi retirado e o meio foi trocado para meio de inoculação com 1,5 µg/mL de tripsina-TPCK com ou sem os ligantes endógenos: CCL3 (30 ng/mL), CCL4 (15 ng/mL), CCL5 (15 ng/mL). Vinte e quatro horas após infecção (hpi), os sobrenadantes foram recolhidos e quantificados por atividade NA (descrito acima).

### **3.3.2 Busca pelo melhor modelo de infecção**

Afim de avaliar o melhor modelo para o estudo, comparamos a infecção em células A549 e MDCK com o objetivo de identificar o melhor vírus influenza e MOI em células A549, para a realização dos ensaios. A intenção era obter em A549 a mesma atividade NA que observamos em células MDCK.

Então, células MDCK ou A549 foram semeadas em placas de 24 poços (3 x 10<sup>4</sup> células/poço) e cultivadas em meio DMEM completo. Vinte e quatro horas depois, as células foram lavadas com meio de inoculação e infectadas por 1 hora com o vírus A/H1N1 ou A/H3N2 em diferentes MOIs (0.05,0.5,1 e 2), à 37 °C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse tempo, o inóculo foi retirado e o meio foi trocado para meio de inoculação com 1,5 µg/mL de tripsina-TPCK. Vinte e quatro horas após infecção, os sobrenadantes foram recolhidos e quantificados por atividade NA (descrito anteriormente).

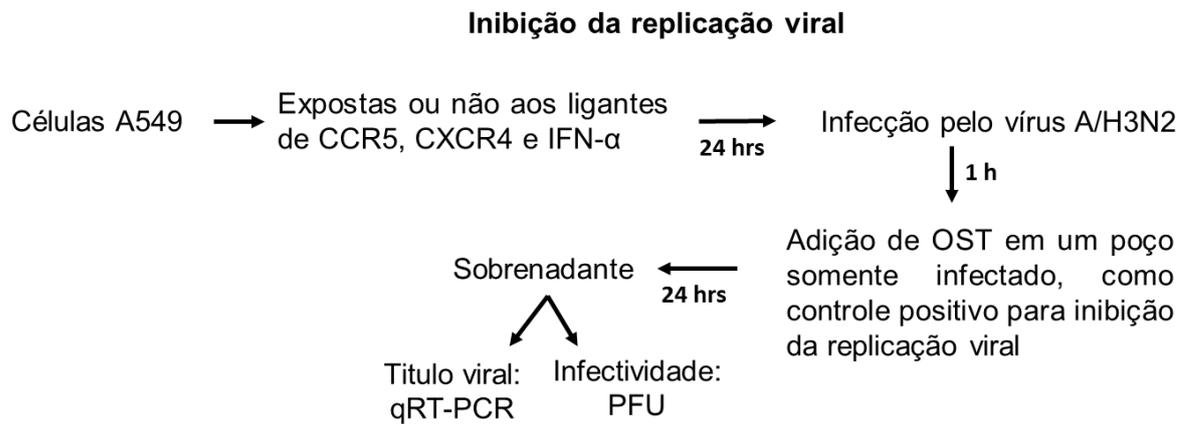
### 3.4 Ensaio de inibição da replicação viral

Células A549 foram semeadas em placas de 24 poços ( $3 \times 10^4$  células/poço) e cultivadas em meio DMEM completo. Vinte e quatro horas depois, as células foram lavadas com PBS e expostas ou não aos ligantes endógenos e exógenos, CCL3 (30 ng/mL), CCL4 (15 ng/mL), CCL5 (15 ng/mL), CXCL12 (agonista do receptor CXCR4) (100 ng/mL), gp120 HIV-1 (BaL; CN54; 96ZM651; RSC3 G367R; IIIB; BR029) (5 µg/mL) e ao interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) humano (10 ng/mL) (Sigma).

As proteínas recombinantes gp120 (ligantes exógenos) foram gentilmente cedidas pelo programa NIH AIDS Reagent. Estas proteínas têm origem de vírus com tropismo para os receptores celulares CCR5 e CXCR4. As gp120 HIV-1 R5-trópicas utilizadas foram BaL, 96ZM651, CN54 e RSC3 G367R. As gp120 HIV-1 X4-trópicas utilizadas foram IIIB e BR029.

Vinte e quatro horas após exposição, as células foram lavadas com meio de inoculação e infectadas por 1 hora com o vírus A/H3N2 no MOI 2, à 37 °C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse tempo, o inóculo foi retirado e o meio foi trocado para meio de inoculação com 1,5 µg/mL de tripsina-TPCK. Neste momento foi acrescentado OST-car (64 nM), em um poço somente infectado (sem exposição aos ligantes). O IFN- $\alpha$  e o oseltamivir carboxilato (OST-car; gentilmente cedido pela Hoffman-La Roche Inc., Basileia, Suíça) (64 nM) foram usados como controles positivos de inibição da replicação viral nos experimentos.

Vinte e quatro horas após infecção (24 hpi), o sobrenadante foi coletado e armazenado em -70 °C até a sua utilização. O título viral foi avaliado por qRT-PCR em tempo real utilizando a quantificação relativa. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição da replicação viral. O fluxograma do desenho experimental do ensaio de inibição de replicação viral está representado na figura abaixo (Figura 3.1).



**Figura 3.1.: Fluxograma geral do ensaio de inibição da replicação viral.**

### 3.4.1 qRT-PCR

Os vírus crescidos em células A549 expostas ou não aos ligantes de CCR5 e CXCR4 foram coletados em 24 hpi e submetidos a extração de RNA viral para a realização da quantificação do vírus por meio de RT-PCR em tempo real.

#### 3.4.1.1 Extração de RNA viral

As extrações de RNA viral foram realizadas utilizando-se o kit QIAamp Viral RNA mini kit (Qiagen, Hilden, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, foi adicionado 560  $\mu\text{L}$  de solução desnaturante (tampão AVL), capaz de inativar RNAses e assegurar à liberação do RNA, em 140  $\mu\text{L}$  da amostra a ser extraída. Após incubação de 10 minutos a temperatura ambiente, foi adicionado 560  $\mu\text{L}$  de etanol para permitir a ligação do RNA à membrana de sílica em gel “QIAamp”. Foram realizadas duas etapas de lavagens para retirada de impurezas e o RNA viral purificado foi eluído em 60  $\mu\text{L}$  de água livre de DNase/RNase (tampão AVE) e estocado a  $-70^{\circ}\text{C}$  até o momento de uso.

### 3.4.1.2 RT-PCR em tempo real em única etapa

O RNA viral foi submetido à reação de RT-PCR em tempo real em etapa única para quantificação do gene M do vírus influenza A, de acordo com o protocolo do *Centers for Disease Control and Prevention/Atlanta – World Health Organization* (155) (Tabela 3.1).

**Tabela 3.1: Reagentes para a quantificação do gene M do vírus influenza A.**

Reagentes	Concentração
<b>Tampão</b>	2x
<b>Primer<sup>1</sup></b>	40 µM
<b>Sonda<sup>2</sup></b>	10 µM
<b>Enzima<sup>3</sup></b>	80 U
<b>RNA</b>	5 µL
<b>Volume final</b>	25 µL

<sup>1</sup> Sequências dos *primers* INFA: direto 5` GACCRATCCTGTCCACCTCTGA 3` e reverso 5` AGGGCATTYTGGACAAAKCGTCTA 3`

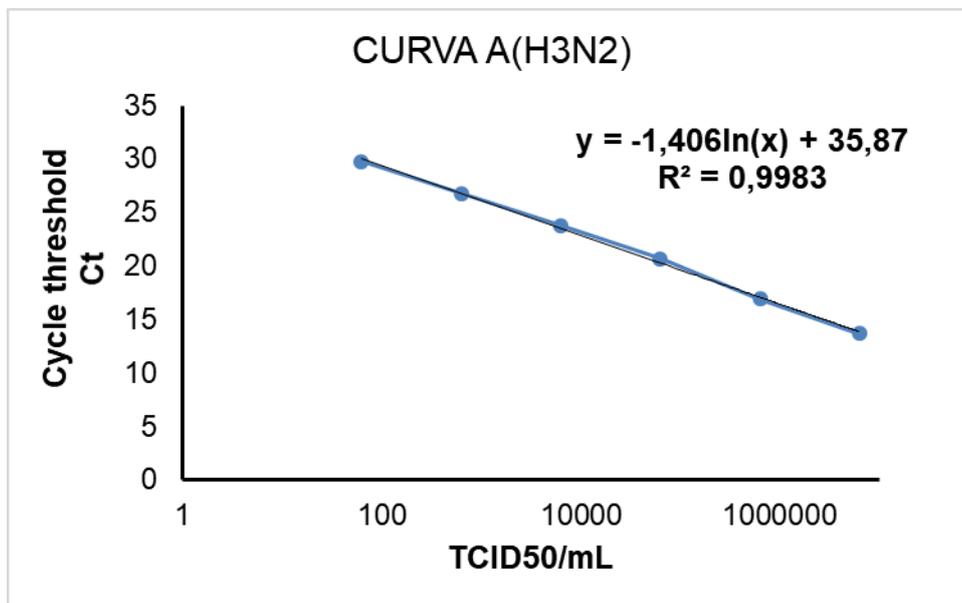
<sup>2</sup> Sequência sonda: 5` TGCAGTCCTCGCTCACTGGGCACG 3` (Kit Promega)

<sup>3</sup> GoScript™ Transcriptase Reversa Taq DNA polimerase (Kit Promega).

A transcrição reversa foi realizada a 45° C por 25 minutos, seguida da ativação da enzima polimerase em 95 °C por 2 minutos. A amplificação do cDNA foi feita em 45 ciclos com a desnaturação do cDNA por 15 segundos em 95 °C, seguidos de amplificação a 55 °C por 30 segundos. As reações foram realizadas em duplicata usando o sistema de detecção 7500 da Applied Biosystems.

A quantificação viral foi baseada em um método de curva padrão, como descrito em outros trabalhos, com algumas modificações (157) . Para a quantificação do RNA viral foi realizada uma curva padrão do vírus A(H3N2) previamente titulado por TCID<sub>50</sub>/mL. O RNA deste vírus padrão foi extraído e quantificado nas diluições bruto, 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>, 10<sup>-4</sup> e 10<sup>-5</sup>. Desta forma, fizemos uma curva na qual correlacionarmos os valores de Ct (cycle threshold - o número de ciclos de amplificação que uma

amostra necessita para atingir uma determinada quantidade de fluorescência emitida) com os títulos em TCID<sub>50</sub>/mL. A partir desta curva, obtivemos a equação da reta (Figura 3.2). Os valores de Ct das amostras foram substituídos nesta equação para obtenção dos títulos em TCID<sub>50</sub> /mL relativo. Com esses dados, consideramos o TCID<sub>50</sub>/mL relativo das amostras controle (sem tratamento) como 100% da replicação viral. Então, calculamos a porcentagem de replicação das demais amostras em relação ao controle. A porcentagem de inibição da replicação de cada ponto experimental é calculada como 100% – % replicação viral obtida.



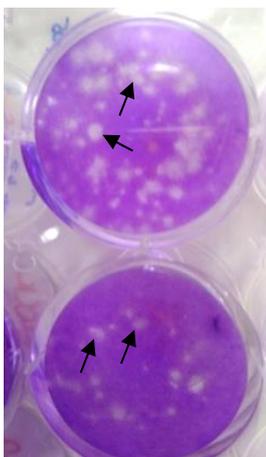
**Figura 3.2: Curva padrão do vírus A(H3N2) relacionando Ct e TCID<sub>50</sub>/mL.** Exemplo de curva do vírus A(H3N2) utilizado nos experimentos, em destaque o valor de R<sup>2</sup> e a equação da reta utilizada para o cálculo do TCID<sub>50</sub>/mL relativo dos pontos experimentais. O Y é o valor do Ct da amostra avaliada e o X é o valor do TCID<sub>50</sub> /mL relativo, que será obtido através do cálculo.

### 3.4.2 Titulação viral por unidade formadora de placa (PFU)

Células MDCK foram semeadas em placas de 12 poços (5 x 10<sup>5</sup> células/poço) e cultivadas em meio DMEM completo. No dia seguinte, os sobrenadantes dos experimentos foram diluídos serialmente em DMEM sem SFB e cada amostra tinha três diluições (10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-3</sup>). Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com meio DMEM e foram infectadas com 200 µL das amostras previamente diluídas, por

1 hora a 37 °C e atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub>. Após esse tempo, o meio foi trocado por outro contendo 2 mL de solução de agarose 1% diluída em DMEM sem SFB, contendo 1 µg/mL de tripsina-TPCK. Então, as células foram incubadas por 72 horas na estufa à 37°C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, a agarose foi retirada da placa e as células foram coradas e fixadas com cristal de violeta em formaldeído 10%. A escolha da diluição é feita a partir da contagem de PFU por poço que tenha uma quantidade entre 3 a 30 placas (Figura 3.3). As placas foram enumeradas para se determinar o título viral e este é expresso em PFU/mL.

O PFU/mL é calculado como: número de placas contadas X diluição escolhida para contagem X 5.



**Figura 3.3: Exemplo das placas formadas pelo vírus A/H3N2 em células MDCK após 72 h de titulação pelo ensaio de PFU.** Cada ponto (seta preta) é considerado uma unidade formadora de placa e estes pontos são contados para a determinação do título viral.

### 3.5 Avaliação dos fatores restritivos

Afim de avaliar quais fatores restritivos poderiam estar sendo modulados pelos ligantes de CCR5, células A549 foram semeadas em placas de 24 poços ( $3 \times 10^5$  células/poço) e cultivadas em meio DMEM completo. Vinte e quatro horas depois, as células foram lavadas com PBS 1x e expostas aos ligantes, CCL3 (30 ng/mL), CCL4 (15 ng/mL), CCL5 (15 ng/mL), gp120 HIV-1 BaL (5 µg/mL) e ao IFN- $\alpha$  (10 ng/mL).

Vinte e quatro horas após exposição, as células foram lavadas com PBS e lisadas com tampão específico para extração de RNA total para quantificação de RNAm.

### 3.5.1 Extração de RNA total e síntese de cDNA

As extrações de RNA total das células foram realizadas utilizando-se o RNeasy Mini Kit (Qiagen), seguindo as especificações do fabricante. Brevemente, as células foram lisadas com 600 µL do tampão de lise RLT com 1% de β-mercaptoetanol. Em seguida, foi adicionado 600 µL de etanol 70% nas amostras para a ligação do RNA à membrana de sílica. Foram realizadas três etapas de lavagens para retirada de impurezas e o RNA puro foi eluído em 80 µl de água livre de DNase/RNase e estocado a -70°C até o momento de uso. O RNA total foi diluído 10x em água livre de DNase/RNase e foi feita a quantificação do mesmo no Qubit (Qiagen).

A eliminação de DNA genômico e a síntese de cDNA foi realizada com o Kit RT<sup>2</sup> First Strand (Qiagen, Hilden, Alemanha), seguindo as recomendações do fabricante. Brevemente, utilizou-se 110-720 ng de RNA das amostras e foi feita a eliminação de DNA genômico, com uma ciclagem de 5 minutos a 42 °C e 1 minuto no gelo. Em seguida, a transcrição reversa do RNA total foi feita com os reagentes da tabela 3.2.

A qualidade do cDNA sintetizado foi avaliada no espectrofotômetro NanoDrop 2000® pela relação A260/230 e A260/280, onde obtivemos resultados médios de 2,08 e 1,72, respectivamente.

**Tabela 3.2: Reagentes para a síntese de cDNA.**

Reagentes	Volume (1 reação)
<b>Tampão BC3 5X</b>	4 µl
<b>Control P2</b>	1 µl
<b>Mix transcriptase reversa RE 3</b>	2 µl
<b>Água livre de RNase</b>	3 µl
<b>Volume final</b>	10 µl

A ciclagem utilizada foi de 42 °C por 15 minutos e 95 °C por 5 minutos. As reações de eliminação de DNA genômico e transcrição reversa citadas ocorreram no termociclador Verity da Applied Biosystems.

### 3.5.2 qPCR

Para quantificar a expressão dos fatores de restrição celulares e de outros transcritos associados com a resposta imune inata foi utilizada uma placa de 96 poços de PCR em tempo real customizada RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array (CAPH12347A) (Qiagen), seguindo as especificações do fabricante. A placa era composta por primers para diferentes genes induzidos por interferon: teterina (cat#PPH05790B), IFITM1 (cat#PPH05981C), IFITM2 (cat#PPH05548F), IFITM3 (cat#PPH02872E), MX1 (cat#PPH01325A), MX2 (cat#PPH01326F), SAMHD1 (cat#PPH18140A), APOBEC3G (cat#PPH06904A), MCP1P1 (cat#PPH16134B), IFN1- $\alpha$  (PPH01321B), receptor de IFN (PPH00869F) e o gene *housekeeping* GAPDH. O cDNA das amostras foi adicionado ao Power Sybr Green PCR mastermix (Termofisher). A ativação da enzima polimerase foi em 95 °C por 10 minutos. A desnaturação do cDNA foi realizada em 95 °C por 15 segundos, seguida de 1 minuto de extensão em 60 °C (40 ciclos). As reações foram realizadas em duplicata usando o sistema de detecção 7500 da Applied Biosystems. Os resultados foram normalizados em relação aos níveis de RNAm do gene GAPDH. Os níveis transcricionais foram analisados através do cálculo  $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ , onde  $\Delta\Delta CT = \Delta CT$  (experimental) –  $\Delta CT$  (controle) (158).

### 3.6 Transfecção de RNA de interferência (RNAi) para SAMHD1

Afim de realizar um modelo experimental de *knockdown* de SAMHD1, células A549 foram semeadas em placas de 6 poços (5 x 10<sup>5</sup> células/poço) e cultivadas em meio DMEM sem antibióticos. Vinte e quatro horas depois, as células foram lavadas com PBS e transfectadas com RNAi para SAMHD1 ou a sua sequência *scramble* (30, 50 ou 100 nM) (Ambion) em OPTI-MEM (Gibco), usando lipofectamina 2000

(Invitrogen). *Scramble* é uma sequência com os mesmos nucleotídeos do RNAi alvo, mas ordenados de forma embaralhada. Seis horas após transfecção, o meio foi trocado por meio DMEM sem antibióticos acrescido de 2% de SFB ou expostas aos ligantes de CCR5 e IFN- $\alpha$ . Vinte e quatro horas após transfecção, as células foram lisadas para ensaio de *immunoblotting* ou lavadas com meio de inoculação e infectadas por 1 hora com o vírus A/H3N2 no MOI 2, à 37 °C e atmosfera de 5 % de CO<sub>2</sub>. Após esse tempo, o inoculo foi retirado e o meio foi trocado para meio de inoculação com 1,5  $\mu$ g/mL de tripsina-TPCK. 24 hpi, o sobrenadante foi coletado e armazenado em 70 °C até a sua utilização. O título viral foi avaliado por qRT-PCR em tempo real utilizando a quantificação relativa (TCID<sub>50</sub>/mL relativo). O fluxograma do desenho experimental do modelo de *knockdown* para SAMHD1 está representado na figura abaixo (Figura 3.4).

#### Modelo experimental de *knockdown* para SAMHD1

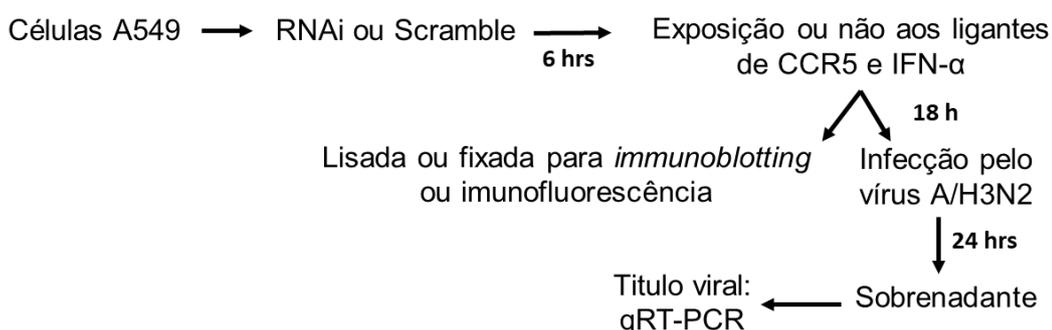


Figura 3.4.: Fluxograma geral do ensaio de *knockdown* para SAMHD1.

### 3.7 Ensaio de *immunoblotting*

Células A549 foram semeadas em placas de 6 poços ( $5 \times 10^5$  células/poço). Vinte e quatro horas depois, as células foram expostas as quimiocinas, CCL3 (30 ng/mL), CCL4 (15 ng/mL), CCL5 (15 ng/mL) e a gp120 HIV-1 BaL (5  $\mu$ g/mL) ou transfectadas com o RNAi de SAMHD1 (100 nM). Vinte e quatro horas após exposição ou transfecção, as células foram lisadas com o tampão de lise RIPA contendo inibidores de protease (Sigma). Cinquenta  $\mu$ g de proteínas de cada amostra foi preparada em tampão de Laemmli, fervidas por 1 minuto a 100 °C e aplicadas em gel

de poliacrilamida 12%. As proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose e bloqueadas com 5% BSA TBS-0.1% Tween-20 (TBS-T), por 1 hora em temperatura ambiente. Em seguida, as membranas foram incubadas com anticorpos primários contra IFITM3 (Abcam) ou SAMHD1 (Termofisher), diluídos de 1:1000 em 5% BSA TBS-T. A incubação foi *overnight* na temperatura de 4 °C. Após esse período, uma nova incubação com anticorpo secundário conjugado com peroxidase IRDye 680RD *Goat (polyclonal) Anti-Rabbit IgG (H+L)* (LI-COR) ou IRDye 800CW *Goat Anti-Mouse IgG* (LI-COR) foi realizada, diluído em 1:10000 em 5% BSA TBS-T, por 1 hora em temperatura ambiente. Este sistema produz quimioluminescência, revelado no equipamento Odyssey (LI-COR). Todas as imagens tiveram sua densitometria quantificada pelo programa ImageJ 1.6.0 e normalizada através da quantificação da proteína de citoesqueleto celular,  $\beta$ -actina.

### 3.8 Ensaio de imunofluorescência

Células A549 foram semeadas em lamínulas de vidro em placas de 24 poços ( $2 \times 10^4$  células/poço). Vinte e quatro horas depois, as células foram expostas as quimiocinas, CCL3 (30 ng/mL), CCL4 (15 ng/mL), CCL5 (15 ng/mL) e gp120 HIV-1 BaL (5  $\mu$ g/mL) ou transfectadas com o RNAi de SAMHD1 (100 nM). Vinte e quatro horas após exposição ou transfecção, as células foram lavadas com PBS e fixadas com paraformaldeído 4% (PFA), por 15 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, as células foram incubadas por 5 minutos com PBS- 0,3% Triton (PBS-T) para a permeabilização da membrana celular. Em seguida, as células foram lavadas com PBS por 5 minutos (3 lavagens) e bloqueadas com PBS- 1% BSA (PBS-BSA) por 1 hora em temperatura ambiente. As células foram incubadas *overnight* em câmara úmida em 4 °C com anticorpo primário para IFITM3 (Abcam) ou SAMHD1 (Termofisher), ambos diluídos em 1:200 em PBS-BSA. Após esse período, as células foram lavadas com PBS por 5 minutos (3 lavagens) e incubadas em temperatura ambiente com anticorpo secundário Alexa Fluor 488 *Goat Anti-Mouse IgG (H+L)* (Invitrogen) ou Alexa Fluor 594 *Goat Anti-Rabbit* (Invitrogen), por 2 horas em câmara úmida, diluído em 1:400 em PBS-BSA. Após incubação com o anticorpo secundário

as células foram lavadas com PBS por 5 minutos (3 lavagens) e em seguida realizou-se a incubação com o intercalante de DNA DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) para a marcação do núcleo celular (marcação em azul), diluído 1:1000 por 5 minutos. As células foram lavadas novamente com PBS e a lâmina foi selada usando o meio de montagem n-propilgalactose. As fluorescências foram observadas em microscópio Zeiss APOTOME e a intensidade relativa da fluorescência foi calculada através da média da razão entre a intensidade total sobre o número total de núcleos em 4 campos diferentes com mesmo aumento.

### **3.9 Tratamento com guanosina**

Com objetivo de avaliar o efeito da adição de nucleosídeos sobre a replicação do vírus influenza, células A549 foram semeadas em placas de 24 poços ( $6 \times 10^4$  células/poço) e cultivadas em meio DMEM completo. Vinte e quatro horas depois, as células foram lavadas com PBS e expostas ou não aos ligantes de R5: CCL5 (15 ng/mL) e gp120 HIV-1 BaL (5 µg/mL) e ao IFN- $\alpha$  (10 ng/mL). Vinte e quatro horas após exposição, as células foram lavadas com meio de inoculação e infectadas por 1 hora com o vírus A/H3N2 no MOI 2, à 37 °C e atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse tempo, o inóculo foi retirado e o meio foi trocado para meio de inoculação com 1,5 µg/mL de tripsina-TPCK e foi acrescentado guanosina (50 e 100 µM) (Sigma) nos poços selecionados. Vinte e quatro horas após infecção (24 hpi), o sobrenadante foi coletado e armazenado em -70 °C até a sua utilização. O título viral foi avaliado por qRT-PCR em tempo real utilizando a quantificação relativa (TCID<sub>50</sub>/mL relativo).

### **3.10 Análise estatística**

Os dados obtidos foram gerados e analisados no programa GraphPad Prism 5.0 e a determinação da significância entre os diferentes grupos experimentais foi realizada pela determinação da média e erro padrão da média a partir do teste *t*

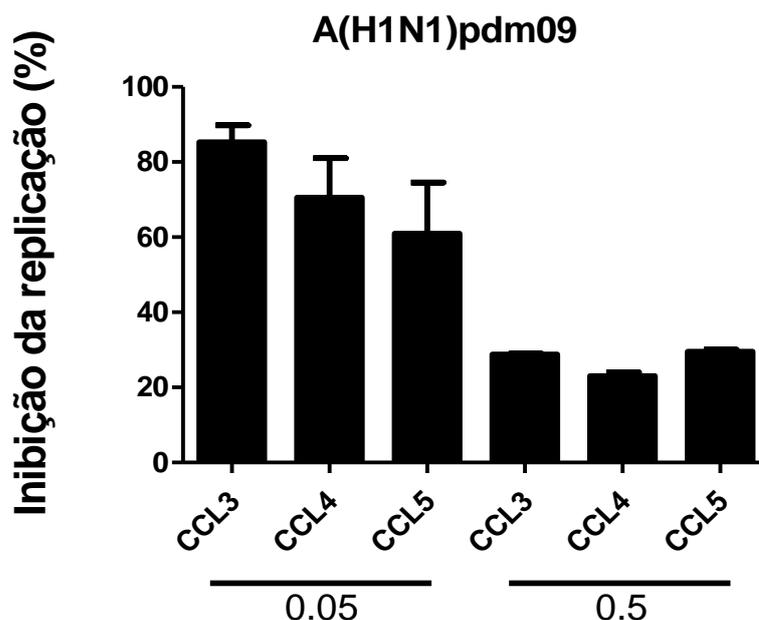
student e ANOVA com pós teste Tukey. Utilizamos um intervalo de confiança de 95%, logo, valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

## **4. Resultados**

### **4.1. Escolha do modelo de infecção para o estudo**

#### **4.1.1. Busca pelo melhor MOI e vírus a ser utilizado para infecção em A549**

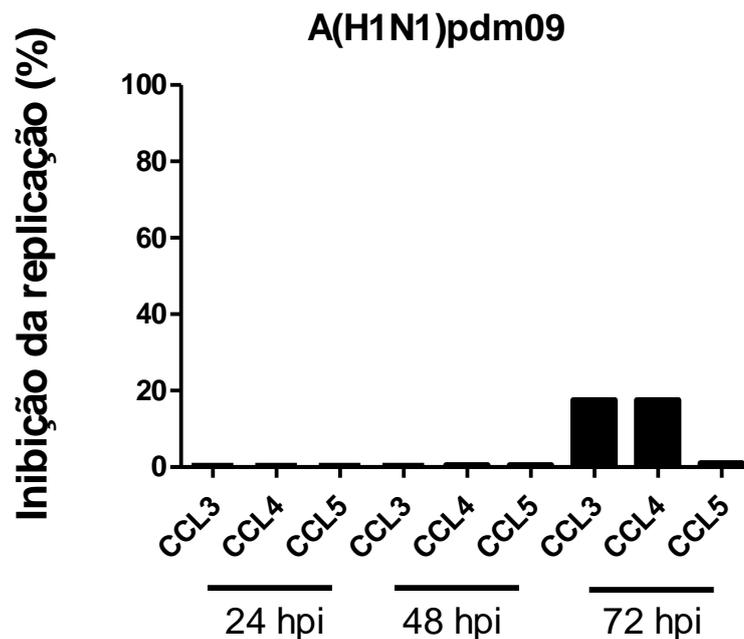
As células MDCK são as principais células utilizadas para o isolamento de vírus influenza devido a grande quantidade de partículas virais que são produzidas nesse sistema (159) . Então, inicialmente células MDCK foram expostas aos ligantes CCL3, CCL4 e CCL5 por 24 h. Em seguida, essas células foram infectadas com o vírus A(H1N1)pdm09 em dois MOIs: 0.05 e 0.5. Em 24 hpi, o sobrenadante foi coletado para a titulação viral através da atividade neuraminidase. Nós observamos que os ligantes endógenos do receptor CCR5 foram capazes de inibir a replicação do influenza em células MDCK (Figura 4.1). O efeito inibitório nessas células é dependente de MOI, visto que foi maior no MOI 0.05 quando comparado ao MOI de 0.5 (Figura 4.1).



**Figura 4.1: Efeito de ligantes de CCR5 sobre a replicação do vírus influenza A(H1N1)pdm09 em células MDCK.** Células MDCK foram expostas as quimiocinas CCL3 (30 ng/mL), CCL4 (15 ng/mL), CCL5 (15 ng/mL). Depois de 24 h, as células foram infectadas com o vírus influenza A(H1N1)pdm09 no MOI 0.05 e 0.5. 24 hpi, o sobrenadante foi recolhido e o título viral avaliado através da atividade neuraminidase. A avaliação da replicação viral foi realizada pela razão entre valores de unidades de luminescência obtidos nos pontos experimentais sobre o controle infectado x 100. A inibição da replicação foi calculada como 100% menos a porcentagem de replicação (n=3).

Considerando a inibição da replicação do vírus influenza pela pré-exposição com os ligantes do receptor CCR5, fomos avaliar se estas moléculas seriam capazes de inibir a replicação se adicionadas a cultura após a infecção viral. Então, células MDCK foram infectadas com o vírus A(H1N1)pdm09 no MOI 0.05 por 1 h, e posteriormente foram expostas aos ligantes CCL3, CCL4 e CCL5.

Observamos uma pequena inibição da replicação viral nos sobrenadantes coletados em 72 hpi, mas não no sobrenadante de 24 e 48 hpi (Figura 4.2).

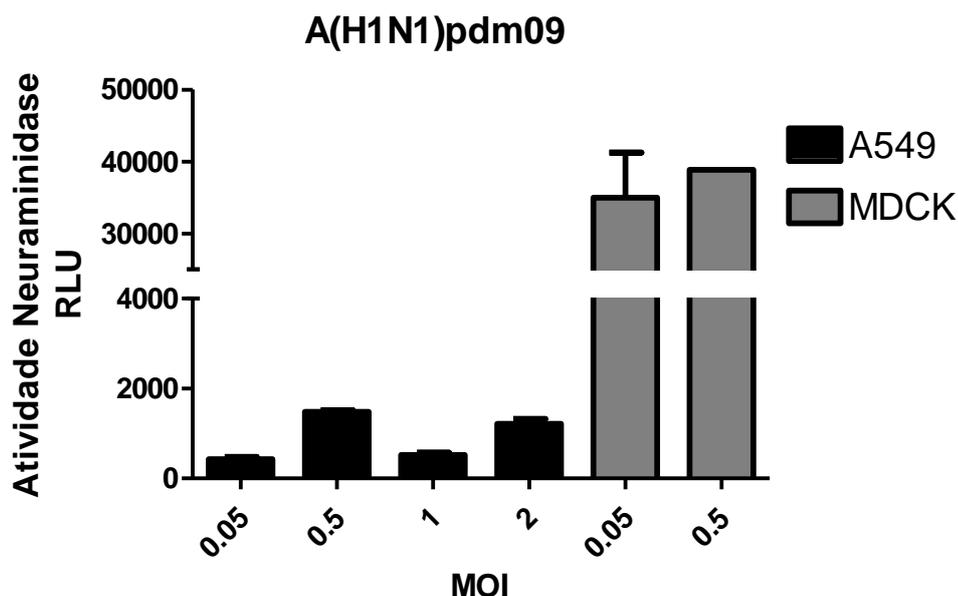


**Figura 4.2: Efeito do tratamento com os ligantes de CCR5 após infecção do vírus influenza A(H1N1)pdm09 em células MDCK.** Células MDCK foram infectadas com o vírus influenza A(H1N1)pdm09 por 1 h, no MOI de 0.05. Após a infecção, as células foram expostas as quimiocinas CCL3 (30 ng/mL), CCL4 (15 ng/mL), CCL5 (15 ng/mL). Os sobrenadantes foram coletados nos pontos de 24, 48 e 72 hpi para a quantificação viral através da atividade neuraminidase. A avaliação da replicação viral foi realizada pela razão entre valores de unidades de luminescência obtidos nos pontos experimentais sobre o controle infectado x 100. A inibição da replicação foi calculada como 100% menos a porcentagem de replicação.

Em células MDCK os ligantes de CCR5 foram capazes de inibir a replicação do vírus influenza A(H1N1)pdm09 no MOI de 0.05 e é necessário a pré exposição das moléculas para o efeito inibitório (Figura 4.1 e 4.2).

Sabendo disso, nós prosseguimos na busca pelo melhor modelo de estudo, e decidimos avaliar as células A549 por serem um modelo de pneumócito humano, uma vez que o vírus influenza se replica em células do trato respiratório. Então, a nível de comparação, células A549 e MDCK foram infectadas com os vírus influenza A/H1N1pdm09 em diferentes MOIs.

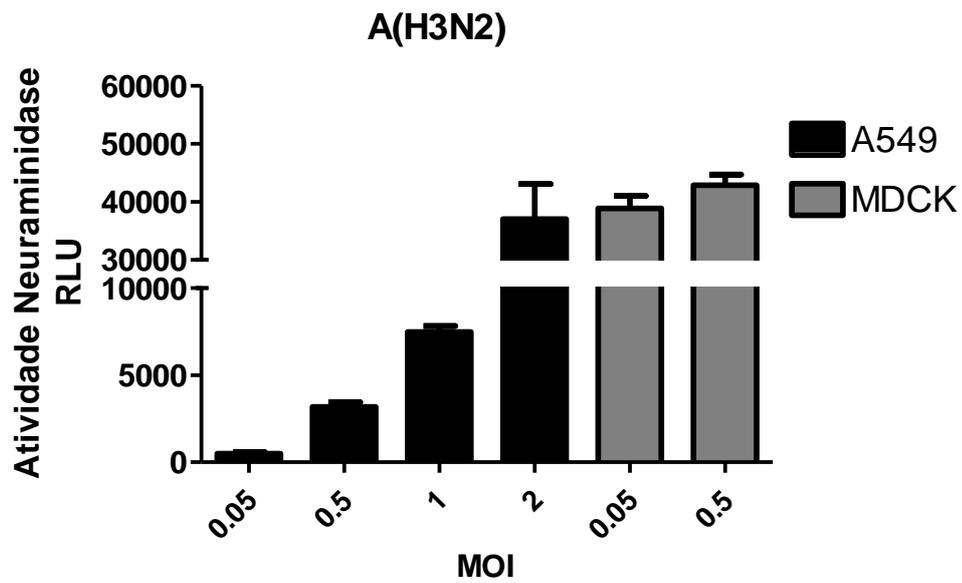
Nossos resultados mostraram que os diferentes MOIs do vírus A(H1N1)pdm09 testados em A549 (0.05, 0.5, 1 e 2) não fizeram uma infecção produtiva, como podemos observar pelos baixos títulos virais (Figura 4.3), e nem se equiparavam aos títulos virais observados no MOI de 0.05 em células MDCK (Figura 4.3).



**Figura 4.3: Comparação dos títulos virais de A(H1N1)pdm09 crescidos em células A549 e MDCK.** Células A549 e MDCK foram infectadas com o vírus influenza A(H1N1)pdm09 nos MOIs de 0.05, 0.5, 1 e 2 (A549) e 0.05 e 0.5 (MDCK). 24 hpi, o sobrenadante foi recolhido e o título viral avaliado através da atividade neuraminidase. O resultado foi expresso em unidades relativas de luz.

Sabendo que as infecções por A(H1N1)pdm09 não estavam sendo produtivas em células A549, nós então analisamos a produção viral do vírus A/Switzerland/9715293/2013 (H3N2) nessas células. Para isso, células MDCK e A549 foram infectadas com o vírus influenza A/H3N2 em diferentes MOIs e o título viral avaliado por atividade neuraminidase.

Observamos que células A549 infectadas aumentavam os títulos virais, conforme aumentou-se o MOI (Figura 4.4), indo de acordo com o esperado, e no MOI de 2 o título viral ficou equivalente ao MOI de 0.05, observado em células MDCK (Figura 4.4). Com base nisso, nosso modelo ficou estabelecido em células A549 com infecção pelo vírus A(H3N2) no MOI de 2.



**Figura 4.4: Comparação dos títulos virais de A(H3N2) crescidos em células A549 e MDCK.** Células MDCK e A549 foram infectadas com o vírus influenza A(H3N2) nos de MOI 0.05 e 0.5 (MDCK) e 0.05, 0.5, 1 e 2 (A549). 24 hpi, o sobrenadante foi recolhido e o título viral avaliado através da atividade neuraminidase. O resultado foi expresso em unidades relativas de luz.

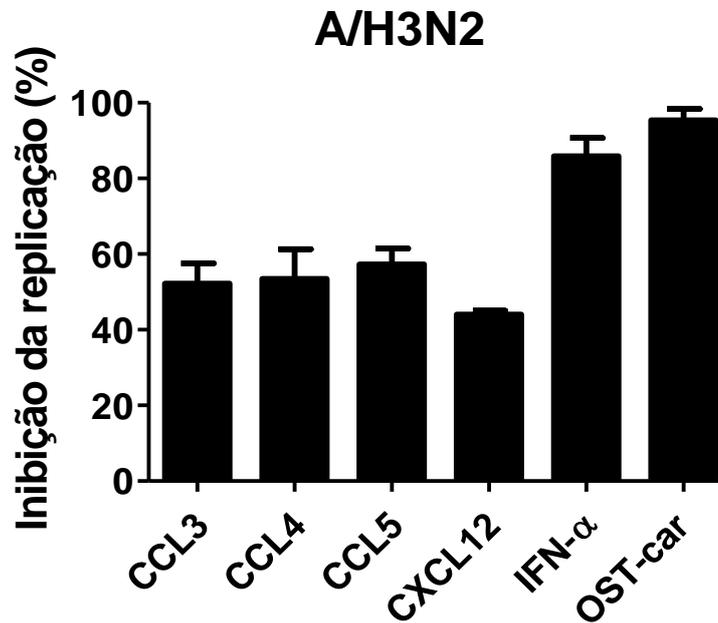
#### **4.2. Avaliação de ligantes de CCR5 e CXCR4 na inibição da replicação do vírus influenza A/H3N2 em células A549**

Baseados nos resultados anteriores, realizamos um novo ensaio no qual os ligantes dos receptores celulares CCR5 e CXCR4 foram avaliados com relação aos seus efeitos sobre a replicação *in vitro* do vírus A/H3N2, em células A549. As células foram expostas a esses ligantes por 24 h antes de serem infectadas. Após 24 h de infecção, o sobrenadante foi coletado e o vírus titulado por RT-PCR em tempo real.

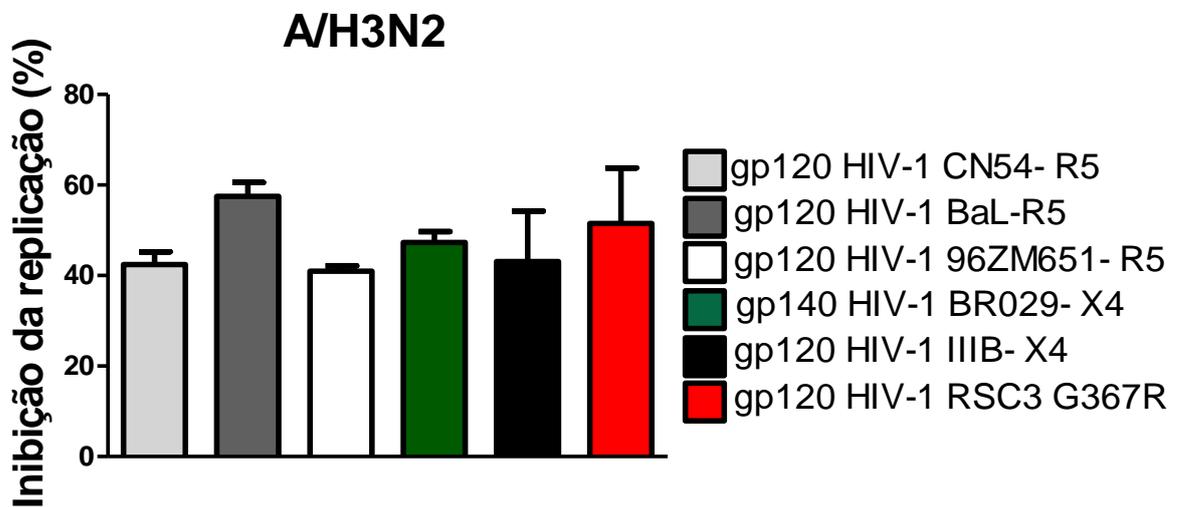
Observamos que os ligantes foram capazes de inibir a replicação do vírus influenza em pelo menos 40%, sendo a média de 53,1% para os ligantes endógenos (Figura 4.5A) e 49% para exógenos (Figura 4.5B). Entre os ligantes endógenos, o CCL5 foi a quimiocina que mais inibiu a replicação viral (57,3%) e entre os ligantes exógenos testados, a gp120 BaL foi a proteína recombinante que mais inibiu a replicação viral (57,5%). Então, utilizamos esses dois ligantes nos ensaios de replicação viral. Os controles positivos IFN- $\alpha$  e OST-car inibiram a replicação viral em 85% e 95%, respectivamente (Figura 4.5A).

O CXCL12 apesar de inibir a replicação viral, a concentração utilizada para esse efeito precisou ser 20 x o ED50 (100 ng/mL), ultrapassando a concentração das outras  $\beta$ -quimiocinas aqui avaliadas. Ainda, dentre os ligantes endógenos, foi a molécula que apresentou menor inibição de replicação viral, 44% (Figura 4.5A). Sendo assim, optamos por prosseguir somente com os ligantes de CCR5, para aprofundarmos o estudo sobre o efeito inibitório dessas moléculas sobre a replicação do vírus influenza.

A



B

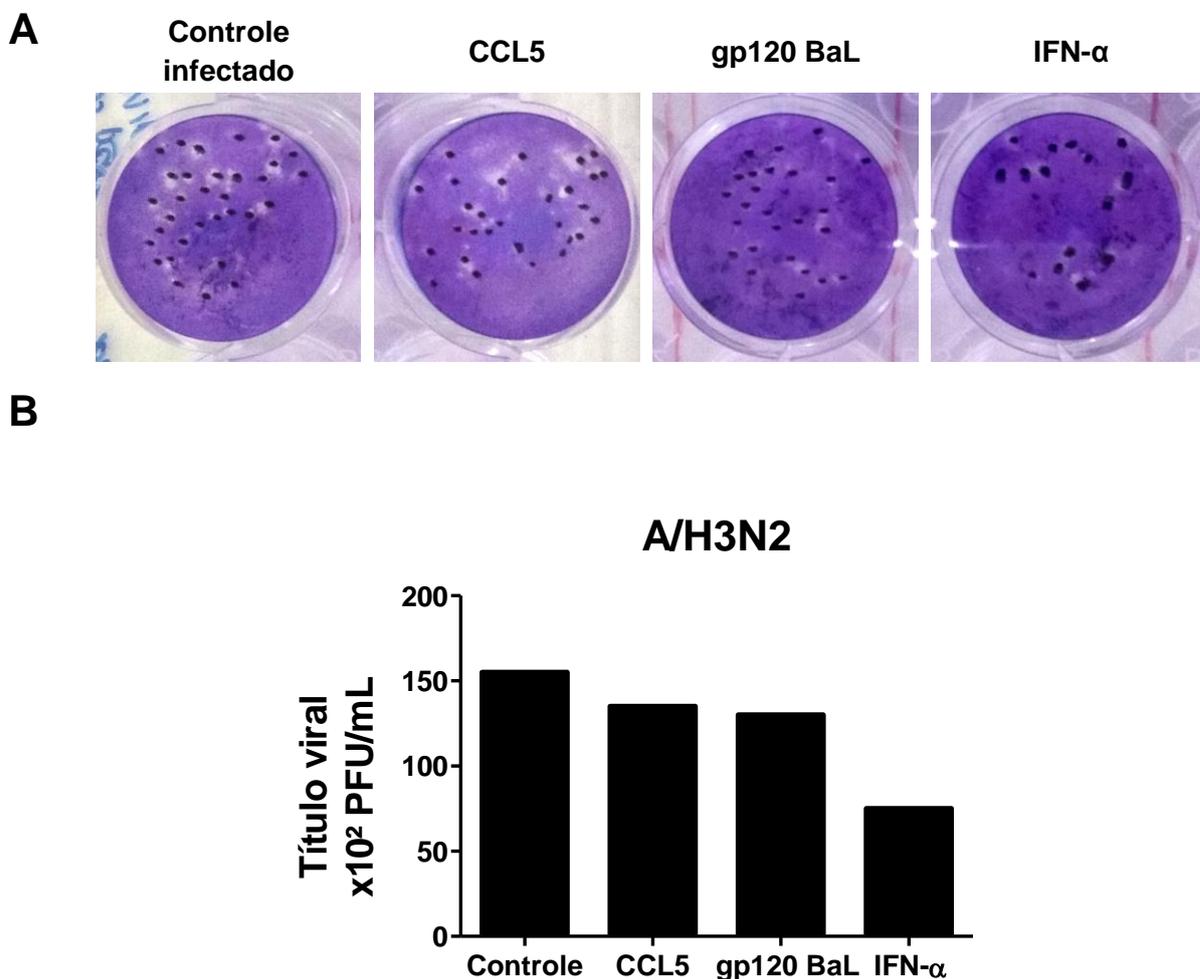


**Figura 4.5: Avaliação dos ligantes de CCR5 e CXCR4 na inibição da replicação do vírus influenza.** Células A549 foram expostas as quimiocinas CCL3 (30 ng/mL), CCL4 (15 ng/mL), CCL5 (15 ng/mL), CXCL12 (100 ng/mL) (A) ou as proteínas recombinantes gp120 (5  $\mu$ g/mL) (B). Depois de 24 h, as células foram infectadas com o vírus influenza A/H3N2 no MOI 2. IFN- $\alpha$  (10 ng/mL) e o OST-car (64 nM) foram usados como controle positivo para inibição da replicação. 24 hpi, o sobrenadante foi recolhido e o título viral avaliado através de RT-PCR em tempo real (TCID<sub>50</sub>/mL relativo). Resultados expressos em % de inibição da replicação viral em relação a quantificação do controle (n=3).

#### 4.2.1. Infectividade viral

Com objetivo de avaliar se haveria diferença na infectividade do vírus influenza replicados em células A549 expostas ou não aos ligantes de CCR5, os sobrenadantes foram recolhidos e avaliados por PFU, após o primeiro *round* de infecção (24 hpi).

Podemos observar que os vírus crescidos em A549 permanecem com a capacidade infectiva. Além disso, os títulos dos vírus crescidos nas células expostas a CCL5 ou gp120 BaL são levemente menores se comparado aos vírus crescidos na ausência dessas moléculas (controle infectado) (Figura 4.6).



**Figura 4.6: Infectividade dos vírus crescidos em células expostas aos ligantes de CCR5.** Células MDCK foram infectadas com os sobrenadantes de vírus crescidos em células A549 expostas ou não aos ligantes de CCR5, nas diluições -1, -2 e -3. Uma hora após infecção, foi colocada a solução de agarose 1% sobre os poços. 72 hpi, a agarose foi retirada da placa e as células foram coradas e fixadas com cristal de violeta em formaldeído 10% (**A**) e as unidades formadoras de placa contadas (**B**). Resultado representativo de 3 experimentos.

### **4.3. Avaliação dos níveis proteicos de IFITM3 após exposição dos ligantes de CCR5**

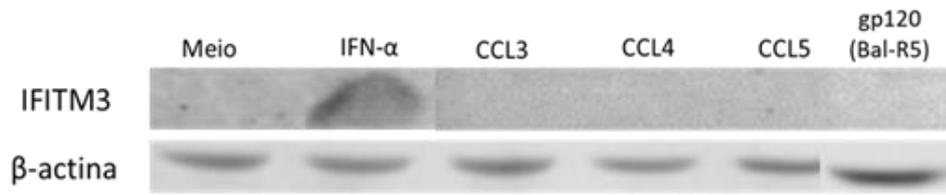
Para avaliar se o efeito inibitório observado no nosso modelo de estudo ocorria devido ao fator de restrição IFITM3, células A549 foram expostas aos ligantes de CCR5 e 24 h após foram lisadas ou fixadas para avaliação do conteúdo proteico de IFITM3 por *immunoblotting* e imunofluorescência indireta, respectivamente.

Não foi possível detectar os níveis basais de IFITM3 em A549 pelo *immunoblotting*. Além disso, não observamos bandas correspondentes a IFITM3 em células expostas aos ligantes de CCR5, porém vimos uma banda bem marcada, referente às células expostas ao IFN- $\alpha$  e também bandas de  $\beta$ -actina, o que mostra a validade do ensaio (Figura 4.7A).

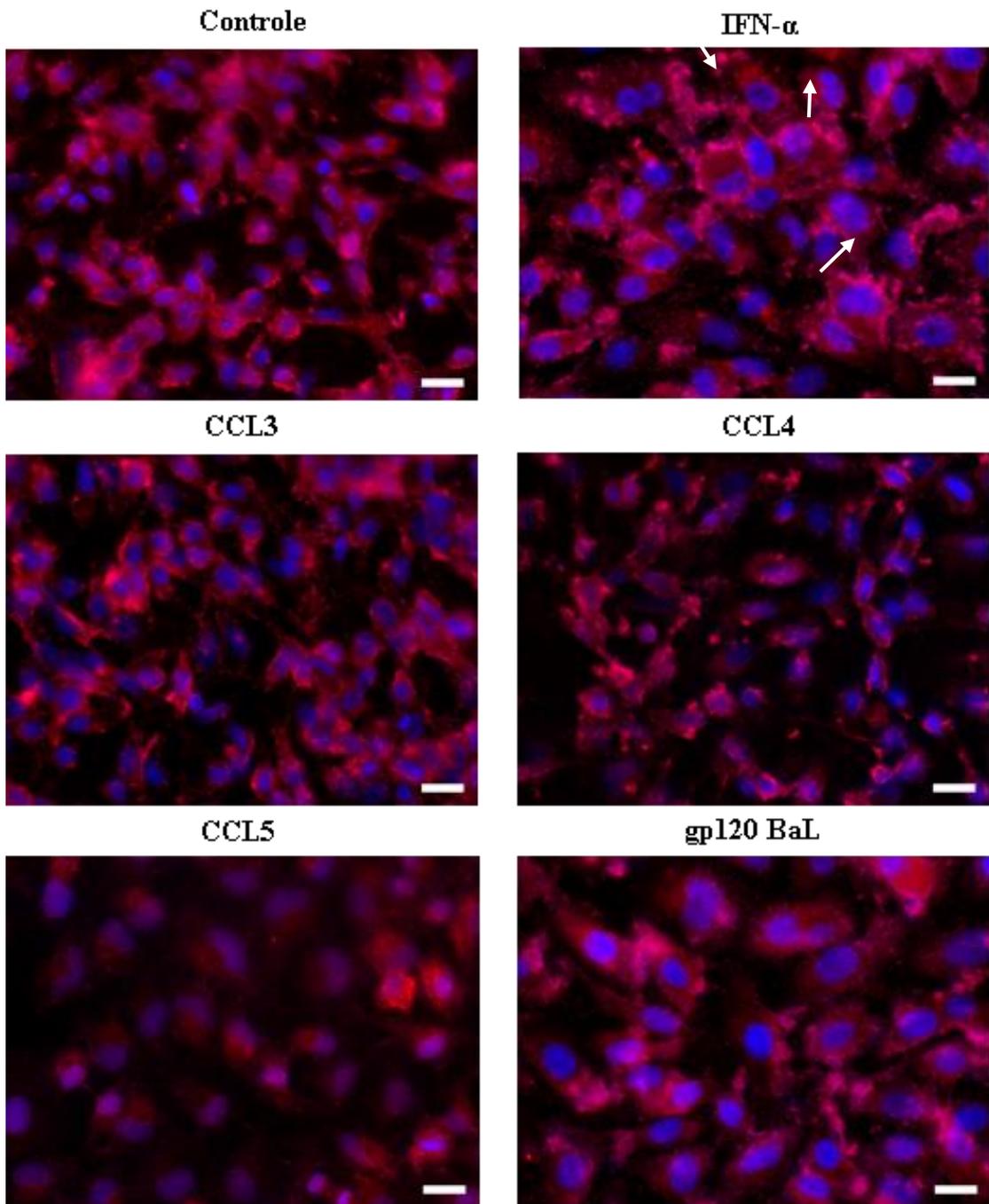
Por outro lado, as imagens do ensaio de imunofluorescência mostram a marcação da proteína IFITM3 na membrana das células A549, indicando que nestas células existe expressão deste fator de restrição, apesar de não ser visualizada no ensaio anterior (Figura 4.7B).

Não observamos diferença significativa quando comparamos a intensidade de fluorescência entre as células tratadas e o controle sem tratamento (Figura 4.7C). Nas imagens das células expostas ao IFN- $\alpha$  podemos ver um aumento nos níveis de fluorescência (setas brancas). Este resultado era esperado, visto que IFITM3 é um gene induzido por interferon (Figura 4.6B).

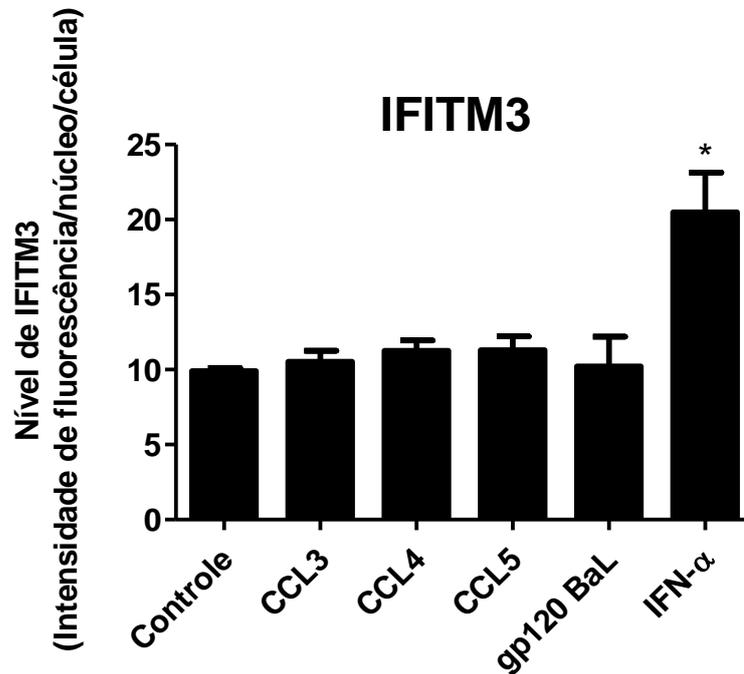
**A**



**B**



C



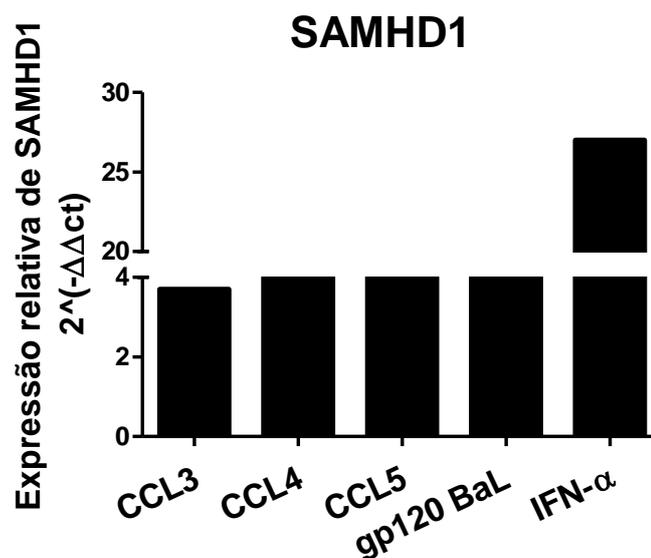
**Figura 4.7: Níveis proteicos de IFITM3 após a exposição dos ligantes de CCR5 em A549.** Células A549 foram expostas as quimiocinas CCL3 (30 ng/mL), CCL4 (15 ng/mL), CCL5 (15 ng/mL), a proteína gp120 BaL (5 µg/mL) e ao IFN-α (10 ng/mL). Vinte e quatro horas depois, a monocamada celular foi lisada com tampão RIPA ou fixada com PFA 4% para avaliação dos níveis proteicos de IFITM3 por imunoblotting e imunofluorescência indireta, respectivamente. Bandas foram analisadas por densitometria usando o software ImageJ (imagem representativa de três experimentos) **(A)**. As fluorescências foram observadas em microscópio Zeiss APOTOME. Em azul, núcleo marcado com DAPI e em vermelho, marcação para IFITM3. Setas brancas representam áreas de maior concentração de IFITM3 nas células expostas ao IFN-α **(B)**. A intensidade relativa da fluorescência foi calculada através da média da razão entre a intensidade total sobre o número total de núcleos em 4 campos diferentes com mesmo aumento **(C)**. (n=3, \* p < 0,05). Barra: 20 µm.

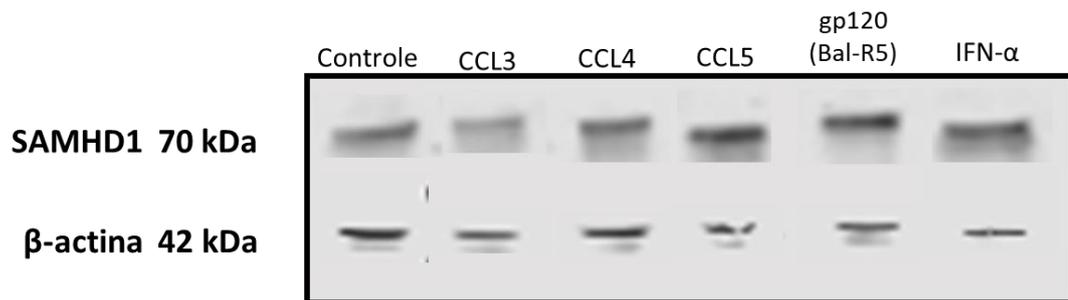
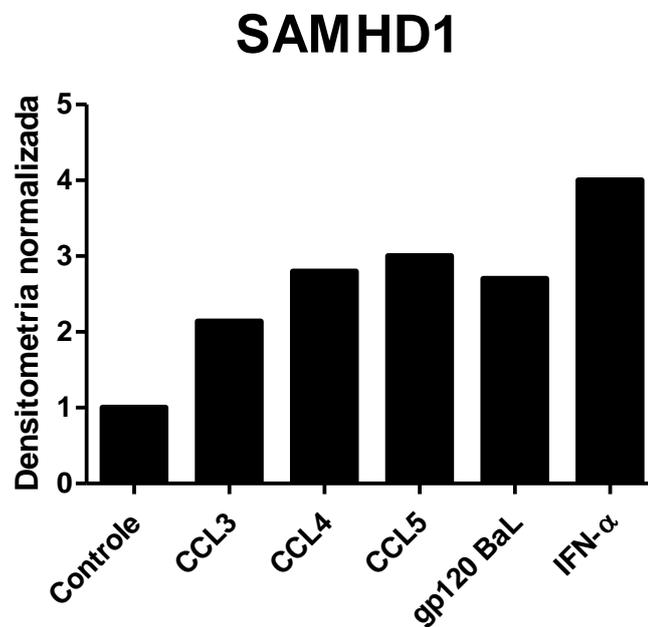
#### 4.4. Níveis transcricionais e proteicos de SAMHD1 após exposição à ligantes de CCR5

A hipótese de que os ligantes de CCR5 poderiam modular fatores de restrição viral foi testada através de um painel de PCR em tempo real customizado, que continha primers para avaliar os níveis transcricionais dos alvos, ou seja, genes regulados por interferon. O RNA das células A549 expostas ou não aos ligantes foi extraído e submetido a este painel.

Observamos um aumento de 4 vezes nos níveis de transcritos para SAMHD1 em células expostas aos ligantes estudados se comparado a células não expostas e de 27 vezes para o controle positivo, IFN- $\alpha$  (Figura 4.8A). Além disso, através do *immunoblotting*, observamos um aumento de até três vezes nos níveis proteicos para SAMHD1 nas células expostas aos ligantes de CCR5, quando comparadas ao controle (Figura 4.8B-C). Já o IFN- $\alpha$  foi capaz de aumentar o nível em quatro vezes quando comparado ao controle, nessas células. Estes dados mostram que o aumento dos níveis transcricionais se refletem em aumento do conteúdo proteico de SAMHD1, no modelo celular estudado.

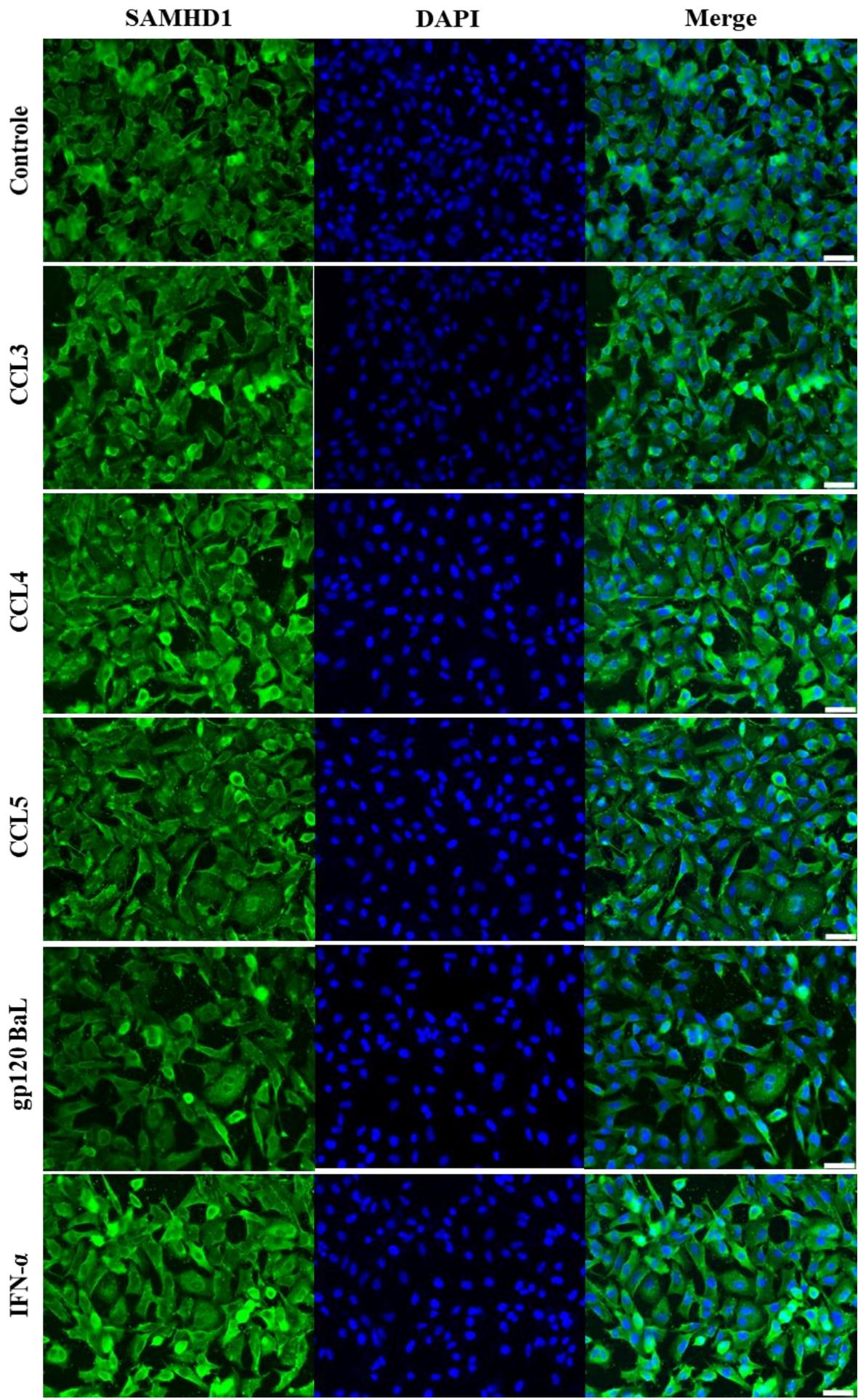
A



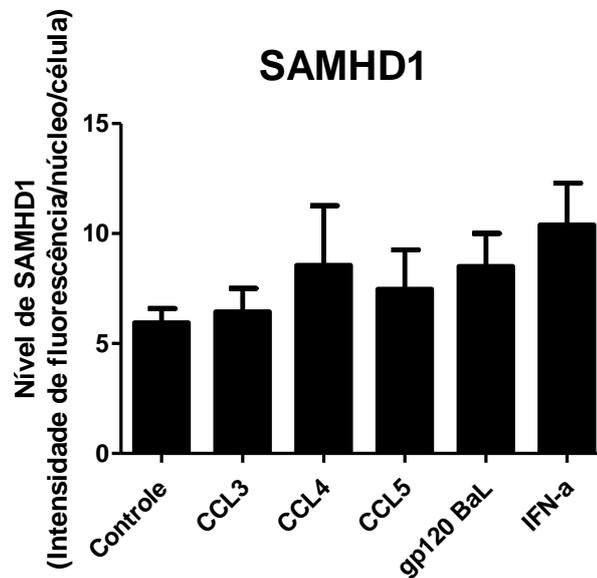
**B****C**

**Figura 4.8: Níveis de RNAm e proteicos de SAMHD1 em A549 após exposição dos ligantes de CCR5.** Células A549 foram expostas as quimiocinas CCL3 (30 ng/mL), CCL4 (15 ng/mL), CCL5 (15 ng/mL) e gp120-BaL (5  $\mu$ g/mL). A monocamada celular foi lisada com tampão de lise para extração de RNA total ou tampão RIPA para o ensaio de *immunoblotting* para SAMHD1 e  $\beta$ -actina, como uma proteína normalizadora. A análise para expressão gênica relativa foi realizada usando o método  $2^{-\Delta\Delta CT}$  (A). Bandas foram analisadas por densitometria no software ImageJ. Imagem representativa de três experimentos. (B, C).

O aumento dos níveis de SAMHD1 em células A549 após exposição dos ligantes também foi observado por imunofluorescência. Alguns trabalhos sugerem que a proteína SAMHD1 selvagem é levada ao núcleo após sua síntese proteica no citoplasma, sendo o núcleo o local da proteína (160,161). Nós fomos avaliar a localização dessa enzima intracelularmente e identificamos que SAMHD1 encontra-se no citoplasma, especialmente na região perinuclear. É possível observar nas imagens que as células do controle apresentam níveis basais de SAMHD1 e estes ficam próximos ao núcleo (Figura 4.9). No entanto, na presença dos ligantes, há um aumento de SAMHD1 e esta proteína fica distribuída ao longo de todo o citoplasma (Figura 4.9).



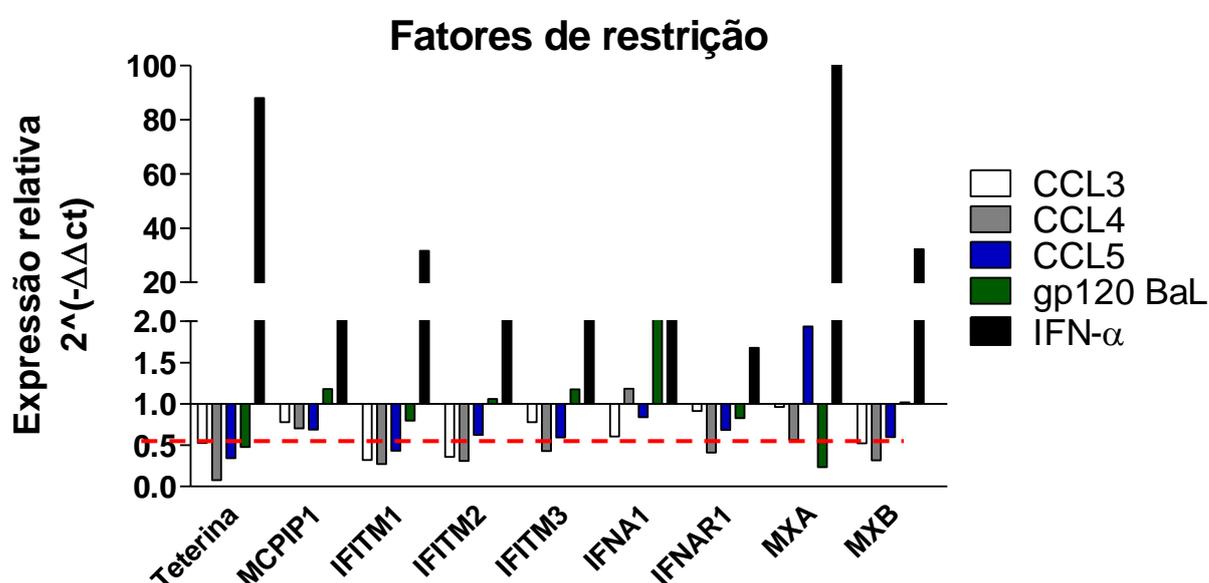
**B**



**Figura 4.9: Quantificação do nível de SAMHD1 por imunofluorescência após exposição dos ligantes de CCR5, em A549.** Células A549 foram expostas as quimiocinas CCL3 (30 ng/mL), CCL4 (15 ng/mL), CCL5 (15 ng/mL), gp120-BaL (5 µg/mL) e ao IFN-α (10 ng/mL). a monocamada celular foi fixada com PFA 4% para avaliação dos níveis proteicos de SAMHD1 por imunofluorescência indireta. As fluorescências foram observadas em microscópio Zeiss APOTOME. Em azul, núcleo marcado com DAPI e em verde, marcação para SAMHD1 (A). A intensidade relativa da fluorescência foi calculada através da média da razão entre a intensidade total sobre o número total de núcleos em 4 campos diferentes com mesmo aumento (B). Barra: 50 µm.

Por outro lado, observamos que os RNAm de ifitm1, ifitm2 e ifitm3 foram regulados negativamente após a exposição aos ligantes, o que corrobora com o dado anterior de que não é este fator de restrição envolvido com o fenômeno de diminuição da replicação do vírus influenza no modelo celular estudado (Figura 4.10).

No controle experimental com IFN- $\alpha$  observamos um aumento dos níveis de RNAm para todos as proteínas que são estimuladas por esta molécula, o que valida o ensaio (Tabela 4.1).



**Figura 4.10: Fatores de restrição modulados pelos ligantes de CCR5 em células A549.** Células A549 foram expostas as quimiocinas CCL3 (30 ng/mL), CCL4 (15 ng/mL), CCL5 (15 ng/mL), a proteína gp120 BaL (5  $\mu$ g/mL) e ao IFN- $\alpha$  (10 ng/mL). As expressões relativas dos fatores de restrição foram determinadas usando o painel customizado RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array (Qiagen). A análise para expressão gênica relativa foi realizada usando o método  $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ . Com base neste índice, consideramos 1 como 100% de transcrição, ou seja, sem variação em relação ao controle. Valores abaixo de 1 indicam inibição da transcrição (linha vermelha tracejada).

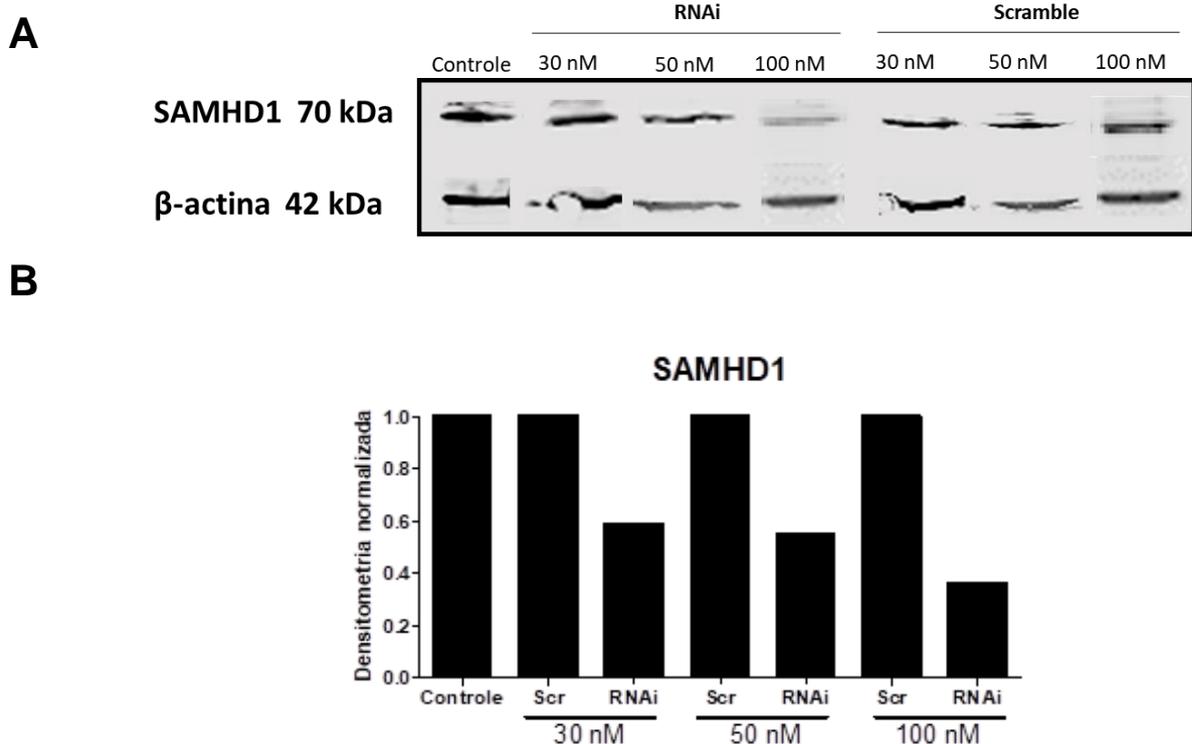
**Tabela 4.1: Fatores restritivos analisados após exposição ao IFN-  $\alpha$  humano em células A549**

Fatores de restrição	Aumento da transcrição (nº de vezes em relação ao controle)
Teterina	88
MCPIP1	1
IFITM1	31
IFITM2	5
IFITM3	16
IFNA1	1
IFNAR1	1
MXA	534
MXB	32
SAMHD1	27

#### 4.5. Avaliação do efeito do *knockdown* de SAMHD1 na replicação do vírus influenza A

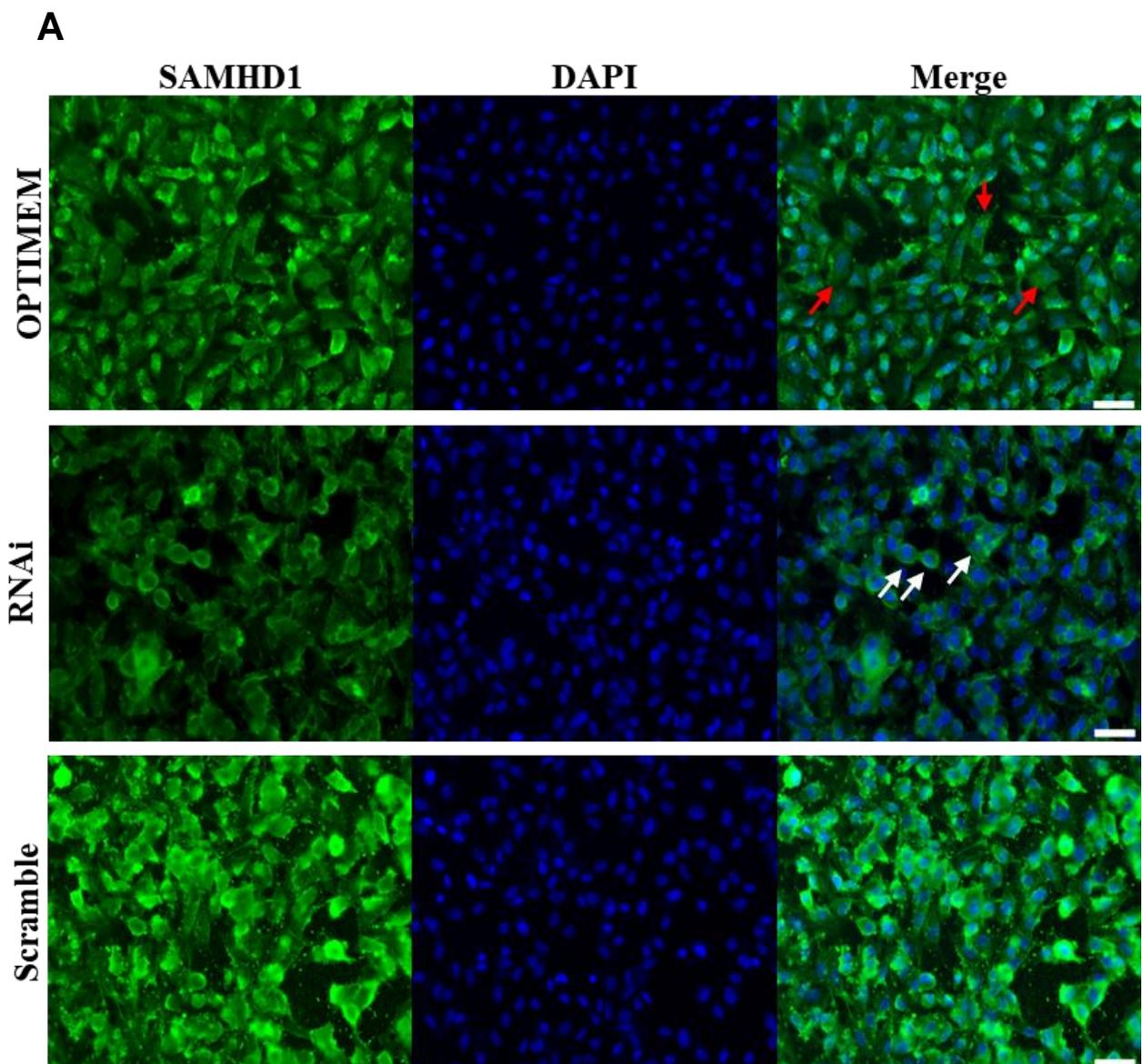
No modelo experimental analisado, a proteína SAMHD1 teve seus conteúdos transcricional e proteico aumentados, após a exposição aos ligantes endógenos e exógenos de CCR5. Afim de avaliar se existiria uma relação entre o aumento de SAMHD1 e a diminuição da replicação viral, realizamos o *knockdown* de SAMHD1 através da transfecção de RNAi, em células A549 e as infectamos para avaliar o crescimento viral. Primeiramente validamos o ensaio de transfecção nas células A549 na qual testamos 3 concentrações diferentes (30, 50 e 100 nM) do RNAi para SAMHD1 ou sua sequência scramble (Scr).

Observamos que na concentração de 100 nM houve uma redução de 60% dos conteúdos proteicos de SAMHD1 e sendo assim, utilizamos esta concentração nos ensaios posteriores (Figura 4.11).

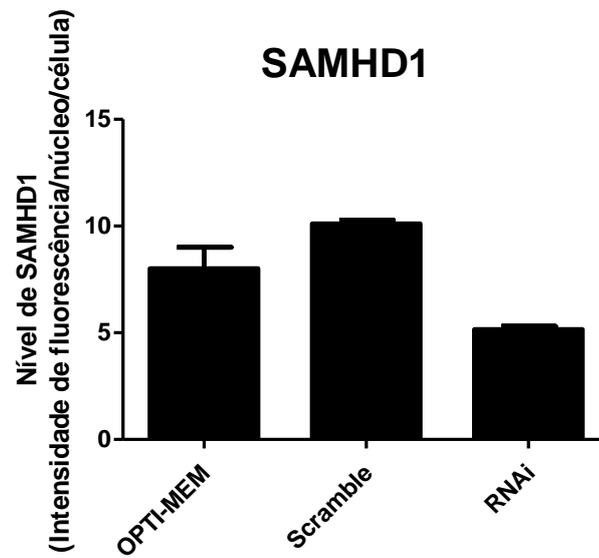


**Figura 4.11: *Knockdown* de SAMHD1 em células A549.** Células A549 foram transfectadas com 30, 50 ou 100 nM de RNAi ou a sequência scramble em OPTI-MEM, usando lipofectamina 2000. A monocamada celular foi lisada e submetida ao ensaio de *immunoblotting* para SAMHD1 e β-actina, como uma proteína normalizadora. Bandas foram analisadas por densitometria no software ImageJ (**A, B**).

Em seguida, fomos observar a morfologia geral das células A549 após o processo de RNAi, através de imunofluorescência indireta. Observamos uma diminuição da marcação para SAMHD1 (marcação em verde) nas células que sofreram o *knockdown* para SAMHD1 (Figura 4.12) (setas brancas), corroborando com os dados de *immunoblotting* (Figura 4.11). Além disso, é possível perceber diferenças entre as células que foram transfectadas (RNAi e scramble) ou não (OPTIMEM). As células transfectadas tem uma marcação mais perinuclear do que as células controle, que possuem uma distribuição da proteína por todo o citoplasma (setas vermelhas).



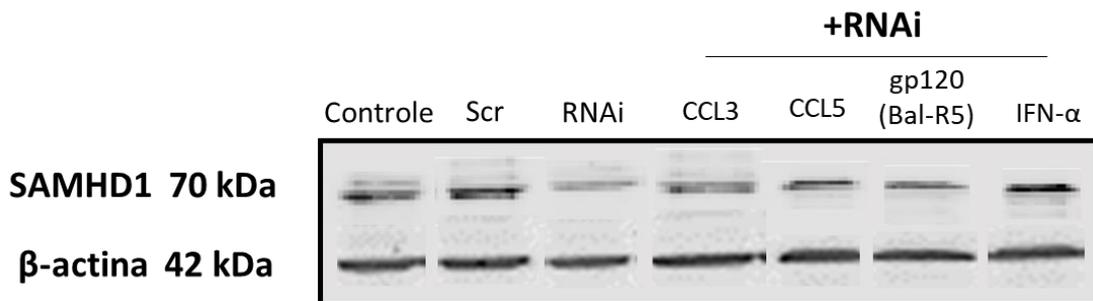
**B**



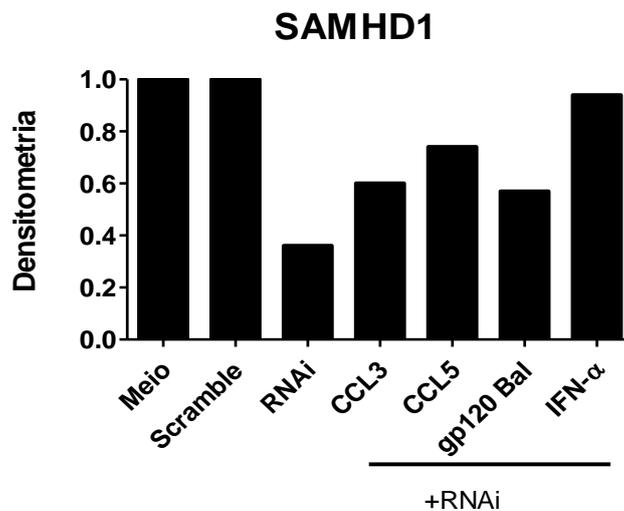
**Figura 4.12: Quantificação do nível de SAMHD1 por imunofluorescência em A549 após *knockdown*.** Células A549 foram transfectadas com 100 nM de RNAi ou a sequência scramble em OPTI-MEM, usando lipofectamina 2000. Em azul, núcleo marcado com DAPI e em verde, marcação para SAMHD1 (**A**). A intensidade relativa da fluorescência foi calculada através da média da razão entre a intensidade total sobre o número total de núcleos em 4 campos diferentes com mesmo aumento (**B**). Barra: 50  $\mu$ m.

Posteriormente, avaliamos se os níveis proteicos de SAMHD1 poderiam ser recuperados mediante a exposição aos ligantes de CCR5. Para isso, células A549 foram transfectadas com RNAi para SAMHD1 ou seu scramble. Após 6 h, receberam ou não o tratamento com os ligantes de CCR5. Passadas 24 h da transfecção, as células foram lisadas para avaliação do conteúdo proteico. Observamos que a exposição ao CCL3, CCL5 e a gp120 aumentam os níveis proteicos de SAMHD1 em 50, 100 e 50%, quando comparados somente a transfecção com RNAi. A exposição ao IFN- $\alpha$  recuperou os níveis proteicos de SAMHD1 comparáveis ao controle e ao Scr (Figura 4.13). Este dado corrobora com o que foi visto anteriormente, no qual a exposição aos ligantes de CCR5 aumenta os níveis proteicos de SAMHD1 em células A549. Além disso, indica que as células permanecem passíveis de sinalização mesmo mediante ao stress provocado pela transfecção.

**A**



**B**



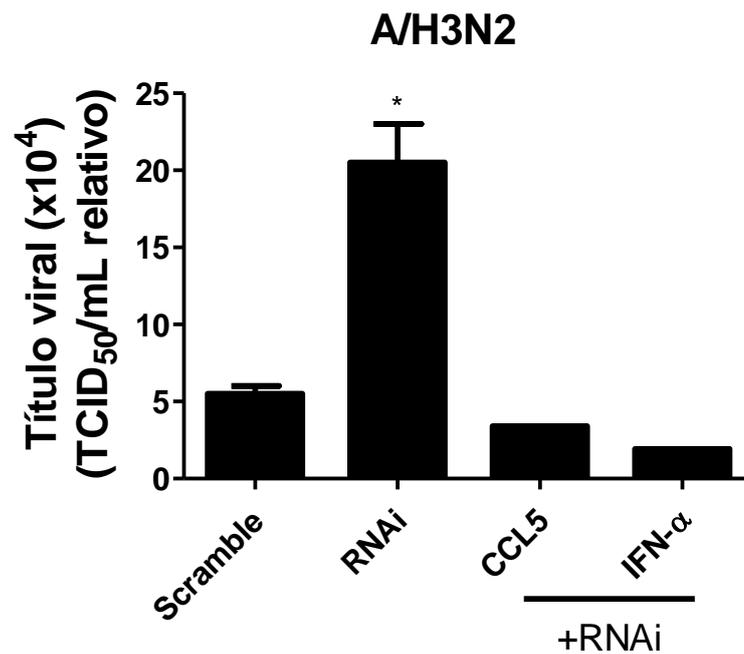
**Figura 4.13: Níveis proteicos de SAMHD1 após exposição dos ligantes de CCR5 no modelo de *knockdown* para SAMHD1 em A549.** Células A549 foram transfectadas com 100 nM de RNAi ou a sequência scramble em OPTI-MEM, usando lipofectamina 2000. Após 6 h,

as células foram expostas ou não a CCL3 (30 ng/mL), CCL5 (15 ng/mL), gp120 BaL (5 µg/mL) ou IFN-α (10 ng/mL). A monocamada celular foi lisada submetida ao ensaio de *immunoblotting* para SAMHD1 e β-actina, como uma proteína normalizadora **(A)**. Bandas foram analisadas por densitometria no software ImageJ **(B)**.

Após consolidar nosso modelo de estudo, avaliamos o papel de SAMHD1 nas infecções por influenza. Para tal, células A549 após 24 h da transfecção com 100 nM de RNAi para SAMHD1 ou seu scramble foram infectadas com influenza A/H3N2. Após 24 h, o sobrenadante foi recolhido e o título viral quantificado por TCID<sub>50</sub>/mL relativo.

Observamos que a diminuição dos níveis proteicos de SAMHD1 aumenta a replicação do vírus influenza em média 4 vezes quando comparada ao scramble. O scramble foi utilizado como referência, pois as células transfectadas com esta sequência controle são submetidas ao mesmo nível de stress que as com o *knockdown*, como visto nas imagens de imunofluorescência (Figura 4.12 e Figura 4.14).

Observamos também que nas células que sofreram o *knockdown* de SAMHD1, mas que tiveram seu conteúdo recuperado parcialmente, pela exposição ao CCL5, ou totalmente, pela exposição IFN-α, a replicação do vírus influenza é inibida e comparável ao scramble (Figura 4.13 e Figura 4.14).



**Figura 4.14: Efeito do *knockdown* de SAMHD1 sobre a replicação de vírus influenza A em células A549.** Células A549 foram transfectadas com 100 nM de RNAi ou a sequência scramble em OPTI-MEM, usando lipofectamina 2000. Após 6 h, as células foram expostas ou não ao CCL5 (15 ng/mL) ou IFN- $\alpha$  (10 ng/mL). Após 24 h da transfecção, as células foram infectadas com o vírus A/H3N2 no MOI 2. Após 24 h, o sobrenadante foi coletado para extração do RNA viral e o título viral foi quantificado através de RT-PCR em tempo real. Os resultados foram expressos em TCID<sub>50</sub>/mL relativo (n=3; \*p<0,05, comparando entre scramble e RNAi).

#### 4.6. Efeito do tratamento com guanósina sobre a replicação do vírus influenza A em A549

Considerando o papel de SAMHD1 sobre a regulação do *pool* de nucleotídeos intracelulares, fomos avaliar qual seria a consequência da adição de guanósina nas células A549 expostas ou não aos ligantes de CCR5, sobre a replicação viral.

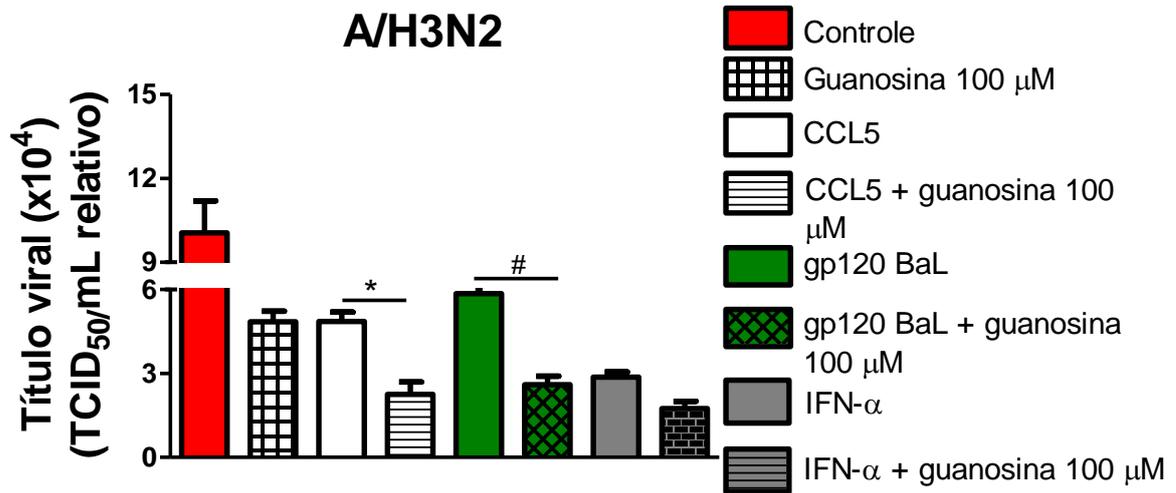
Observamos que a guanósina foi capaz de inibir a replicação do vírus influenza em cerca de 52%, comparado ao controle infectado (Figura 4.15), nas duas concentrações utilizadas.



**Figura 4.15: Efeito do tratamento com guanósina sobre a replicação de vírus influenza.** Células A549 foram infectadas com o vírus A/H3N2 no MOI 2, por 1 h. Após esse período, as células foram tratadas com guanósina a 50 e 100 µM. O IFN-α (10 ng/mL) foi usado como controle positivo para inibição da replicação e colocado em cultura 24 h antes da infecção. 24 hpi, o sobrenadante foi coletado para extração do RNA viral e o título viral foi quantificado através de RT-PCR em tempo real. Os resultados foram expressos em TCID<sub>50</sub>/mL relativo (n=2; \*p<0,05, comparando controle com os grupos tratados com guanósina ou IFN-α).

Posteriormente, células A549 foram previamente expostas aos ligantes de CCR5 e após 24 h foram infectadas com influenza A/H3N2. Depois de 1 h de infecção, as células foram tratadas com guanósina a 100 µM. Após 24 h, o sobrenadante foi recolhido e o título viral quantificado por TCID<sub>50</sub>/mL relativo. Foi observado que as células que foram previamente expostas aos ligantes de CCR5 (CCL5 ou gp120 BaL)

e tratadas com guanosina a 100  $\mu$ M após a infecção, apresentaram uma inibição ainda mais acentuada se comparado aos seus respectivos controles sem tratamento (Figura 4.16).



**Figura 4.16: Efeito do tratamento com guanosina sobre a replicação do vírus influenza em células previamente expostas aos ligantes de CCR5.** Células A549 foram expostas as quimiocinas CCL5 (15 ng/mL) e a gp120 BaL (5  $\mu$ g/mL). IFN- $\alpha$  (10 ng/mL) foi usado como controle positivo para inibição da replicação. Depois de 24 h, as células foram infectadas com o vírus influenza A/H3N2 no MOI 2. Após 1 h de infecção, as células foram tratadas com guanosina em 100  $\mu$ M. 24 hpi, o sobrenadante foi recolhido e o título viral avaliado através de RT-PCR em tempo real (TCID<sub>50</sub>/mL relativo). (n=2; \*p<0,05, comparando entre células expostas a CCL5 e células expostas a CCL5 e tratadas com guanosina; # p<0.05, comparando entre células expostas a gp120 BaL e células expostas a gp120 BaL e tratadas com guanosina 100  $\mu$ M).

## 5. DISCUSSÃO

As infecções causadas pelos vírus influenza são de grande importância para saúde pública (49). Todos os anos ocorrem epidemias de gripe devido aos mecanismos evolutivos que os vírus influenza possuem (72). Neste processo, ocasionalmente, novas cepas potencialmente pandêmicas são geradas. O controle da doença com a campanha de vacinação é realizado anualmente na tentativa de reduzir o impacto das infecções por influenza na população, principalmente as do grupo de risco (1). Porém, nem sempre é eficaz devido ao escape viral do sistema imune do indivíduo. Neste momento, o uso de antivirais é uma estratégia adicional para diminuir os riscos da doença. Considerando o fato que a principal classe de antiviral usada no tratamento de infecções causadas por influenza, o OST, já apresenta cepas resistentes se faz necessário estudar e entender os mecanismos da fisiopatologia da infecção em busca de novos alvos terapêuticos/farmacológicos (62).

Seguindo nesta linha, cada vez mais tem se estudado as proteínas presentes no hospedeiro cuja principal função é inibir a replicação viral, que são os fatores de restrição. Esses fatores restritivos fazem parte da maquinaria celular do hospedeiro e atuam limitando a replicação viral, estabelecendo um estado antiviral na célula (162). Estas proteínas fazem parte da via de sinalização do interferon tipo I e são, em parte, responsáveis pela capacidade antiviral do mesmo (163). Durante anos, os estudos relacionados aos fatores de restrição viral ficavam limitados a infecções por retrovírus (94). No entanto, o termo começou a ser utilizado para indicar a inibição de outros tipos virais, como os vírus influenza e flavivírus (106,128).

Nosso grupo já identificou que a ativação dos receptores CCR5 e CXCR4 foi capaz de aumentar os níveis proteicos de IFITM3 em células HeLa e macrófagos derivado de monócitos humanos, com consequente redução da infecção pelo vírus influenza (132). Nesse trabalho estamos avaliando o papel dos receptores celulares CCR5 e CXCR4 na replicação dos vírus influenza, através da modulação de fatores de restrição celulares, como o IFITM3 e o SAMHD1 em células A549.

Nossos dados iniciais mostram que os ligantes endógenos de CCR5 inibiram a replicação do vírus influenza A(H1N1)pdm09, em células MDCK. O pré estímulo das

células com os agonistas foi necessário para que a inibição ocorresse no primeiro *round* de infecção, ou seja, 24 horas após a infecção. Este dado mostra que após a entrada do vírus na célula o efeito inibitório dos ligantes de CCR5 sobre a replicação viral não ocorre, sugerindo que o tempo de pré-exposição a essas quimiocinas é importante para que algum fator antiviral possa ser aumentado na célula, para diminuir a replicação viral.

Observamos o efeito inibitório também em células A549, no qual os ligantes endógenos e exógenos de CCR5 e CXCR4 diminuíram a replicação do vírus influenza A/H3N2, corroborando com o dado anterior visto em células MDCK e trabalhos prévios do grupo (132). Isso sugere que o efeito das quimiocinas sobre os receptores celulares possam estar induzindo um estado antiviral na célula, e que não é um efeito restrito a um tipo celular ou ao subtipo de vírus influenza A utilizado. Avaliamos também a infectividade dos vírus crescidos em células expostas aos ligantes de CCR5 e foi observado uma leve redução do título viral, o que vai de acordo com a inibição da replicação viral observada com os esses tratamentos.

Dentre os fatores restritivos mais estudados, o IFITM vem sendo mostrado como uma proteína capaz de inibir diversas famílias virais, incluindo vírus influenza (162). IFITM3 é uma proteína induzida por interferon presente na membrana citoplasmática e endossomal das células (164). O mecanismo de ação deste fator restritivo é no início do ciclo replicativo viral. No caso do vírus influenza, esta proteína impede a chegada das RNPs ao núcleo por bloquear a fusão do envelope viral com a membrana do endossomo (130).

Ja foi verificado que pacientes homozigotos para o polimorfismo no gene para IFITM3 (rs12252C), que diminuem a expressão dessa proteína, tinham uma maior prevalência de infecções severas pelo vírus A(H1N1)pdm09 (165,166). Em contrapartida, dados da literatura e do nosso grupo (manuscrito em preparação), mostraram que o polimorfismo rs12252C no IFITM3 não está associado a infecções graves por A(H1N1)pdm09 nas amostras analisadas (167,168). Qin e colaboradores (2018) encontraram altos títulos de anticorpos neutralizantes contra influenza em indivíduos com o polimorfismo rs12252C no IFITM3, sugerindo uma imunidade pré existente e compensatória à diminuição do conteúdo desta proteína nos pacientes (169).

Para estudar a importância dessa proteína *in vitro*, nós testamos se o IFITM3 poderia estar envolvido no efeito inibitório dos ligantes de CCR5 sobre a replicação de vírus A/H3N2, no modelo de células A549. Foi observado que somente o IFN- $\alpha$  foi capaz de modular os níveis proteicos de IFITM3 nessas células. Este resultado corrobora com dados da literatura mostrando que o IFITM3 é uma proteína induzida por IFN (128).

Não conseguimos detectar os níveis basais dessa proteína através de immunoblotting em células A549, vendo somente através de imunofluorescência indireta. Sun e colaboradores (2016) já mostraram que células A549 possuem baixos níveis basais de IFITM3 se comparado a outros modelos, como células endoteliais humanas, e que isto pode estar envolvido na diferença de permissividade de infecção por vírus influenza entre essas linhagens celulares (170). Além disso, neste trabalho também não foram identificados níveis basais de IFITM3 em A549 pela técnica de immunoblotting (170).

É sabido que as células podem responder de diferentes maneiras aos mesmos estímulos endógenos ou exógenos (171). Observamos que na linhagem celular A549 ocorreu a inibição da replicação viral, quando estas células foram expostas aos ligantes endógenos e exógenos dos receptores celulares CCR5 e CXCR4, corroborando com dados prévios do nosso grupo (132). Diferentemente do observado pelo nosso grupo em trabalhos anteriores, no entanto, em modelo de células A549, a ativação dos receptores CCR5 pelos agonistas não promoveu o aumento de IFITM3, mas sim de outro fator restritivo celular, SAMHD1. Os níveis transcricionais analisados refletiram em aumento proteico, pois observamos que os ligantes de CCR5 foram capazes de modular positivamente a proteína SAMHD1 em células A549. Isso sugere que a ativação desses receptores leva a uma modulação de proteínas antivirais, mas o tipo de proteína induzida pode ser célula específica.

Alguns trabalhos anteriores mostraram que SAMHD1 não era regulado por IFN do tipo I em monócitos, células dendríticas e linfócitos primários, mas sim em linhagens celulares (172,173). Corroborando com este dado, nós observamos um aumento de SAMHD1 endógeno via IFN- $\alpha$  nas células de linhagem A549. De forma semelhante, Yang e colaboradores (2015) viram que o tratamento com IFN do tipo I em modelos celulares de linhagem como HeLa e HEK 293 aumentavam os níveis de

SAMHD1 endógeno (173). Também observaram que a expressão de SAMHD1 nessas células dependiam de TLR3 e RIG-I, além da translocação de IRF3 fosforilado para o núcleo (173). Além de IFN do tipo I, citocinas pró inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-12 e IL-18 são capazes de aumentar os níveis proteicos de SAMHD1 (173,174).

A SAMHD1 é uma proteína predominantemente nuclear (161), no entanto a localização de SAMHD1 foi exclusivamente citoplasmática no nosso modelo, como observado pelo ensaio de imunofluorescência. Apesar da localização, outros grupos já identificaram que SAMHD1 pode exercer o seu papel antiviral na região citoplasmática da célula, sem necessariamente estar no núcleo (118,160,175). Com base nesses trabalhos, o consenso atual é que a proteína SAMHD1 pode ser encontrada tanto no citoplasma quanto no núcleo e que a atividade antiviral contra retrovírus promovida por esta proteína pode ocorrer nos dois compartimentos (126).

A SAMHD1 é uma proteína com atividade dNTPase e RNase, sendo a atividade dNTPase mais relacionada a restrição de retrovírus, como HIV, ou a vírus de DNA, como Hepatite B e Herpes (108,109,124), já a diminuição dos níveis proteicos de SAMHD1 leva ao aumento da replicação desses vírus (108,109,124). No entanto, já foi visto que a diminuição desta proteína aumentou a replicação de arbovírus, como Chikungunya e Zika, por exemplo (177). São poucos os dados descrevendo o papel de SAMHD1 em infecções por vírus de RNA e para vírus influenza, nenhum dado da literatura mostra a importância de SAMHD1 na replicação viral. Assim, resolvemos avaliar se esta proteína poderia ser a responsável pelo efeito inibitório observado com a exposição aos ligantes de CCR5.

Nossos dados mostraram que os vírus influenza A/H3N2 são sensíveis ao SAMHD1, uma vez que a diminuição do conteúdo desta proteína promoveu aumento da replicação viral. Ao passo que, quando as células transfectadas com RNAi para SAMHD1 eram expostas aos ligantes de CCR5, o nível proteico de SAMHD1 voltava a aumentar e com isso, ocorria a inibição da replicação do vírus influenza. Até o momento, a única correlação na literatura entre SAMHD1 e influenza foi vista por Sadewasser e colaboradores (2017) (178). Este trabalho sugeriu que a diferença no conteúdo proteico de SAMHD1 estimulado durante infecção de linhagens celulares por A/H3N2 sazonal (infecção produtiva) ou aviária (infecção abortiva), poderia ser a

causa da diferença de permissividade de infecção em células A549, entre esses dois subtipos virais (178).

Um vírus de RNA da síndrome respiratória reprodutiva e suína, o HuN4, já foi descrito como sensível a SAMHD1. A superexpressão de SAMHD1 suíno em células MARC-145 (linhagem celular derivada de rim de macaco) levou a uma diminuição do RNAc de HuN4, além de estimular genes induzidos por interferon como ISG15 e ISG56 (125). No entanto, permanece desconhecido o mecanismo regulatório no qual o SAMHD1 é aumentado nas células.

Dados da literatura mostram que o SAMHD1 é ativado alostericamente por derivados de guanina, iniciando o processo de hidrólise dos dNTPs (110,179). Então, expomos células A549 a guanosina e posteriormente as infectamos com influenza. Após 24h de infecção observamos diminuição da replicação viral. Adicionalmente, as células expostas aos ligantes de CCR5 e tratadas com guanosina, após infecção, apresentaram uma maior inibição da replicação viral.

A guanosina é uma purina nucleosídica que pode ser fosforilada intracelularmente. Como mencionado anteriormente, SAMHD1 é uma enzima com atividade dNTPase regulada pela ligação de dGTP ou GTP nos sítios alostéricos, induzindo a hidrólise dos nucleotídeos intracelulares e convertendo a desoxinucleosídeos e fosfato inorgânico (178,179). Sabendo que a guanosina trifosfatada induz a atividade enzimática de SAMHD1, a combinação do aumento dos níveis proteicos de SAMHD1 promovido pelos ligantes do CCR5 com a presença da molécula estimuladora de SAMHD1, guanosina, poderia explicar a forte inibição da replicação viral observada. Desta forma, acreditamos que a atividade dNTPase pode estar envolvida na inibição da replicação do vírus influenza no modelo estudado. No entanto, mais ensaios acerca da atividade enzimática de SAMHD1 deverão ser realizados para comprovar esta hipótese.

Diante do exposto, o estudo dos receptores CCR5 e CXCR4 é interessante do ponto de vista da busca por novas estratégias para inibição da replicação dos vírus influenza, e de outros que também possam ser inibidos pela ativação de fatores restritivos, modulados por seus agonistas. Acreditamos que os resultados obtidos neste projeto são interessantes do ponto de vista do conhecimento básico sobre a

biologia das infecções virais, bem como de estudos relacionados a mecanismos de escape viral. Esperamos trazer novas perspectivas para o desenvolvimento de moduladores de receptores celulares, que estimulam direta ou indiretamente fatores de restrição, com atividade não apenas contra o vírus influenza, mas também frente a outros agentes virais de grande importância para a saúde pública. Além disso, este trabalho abre perspectivas para novos mecanismos antivirais, inclusive podendo usar a gp120 ou parte dela como um modulador do receptor CCR5, o que é interessante do ponto de vista biotecnológico.

## 6. CONCLUSÕES

- Ligantes de CCR5 e CXCR4 diminuem a replicação do vírus influenza;
- Vírus crescidos em células A549 expostas aos ligantes de CCR5 permanecem com a capacidade infectiva;
- Ligantes de CCR5 aumentam os níveis proteicos de SAMHD1;
- Diminuição dos níveis de proteicos de SAMHD1 aumenta a replicação do vírus influenza;
- Tratamento com as quimiocinas após o processo de *knockdown* recupera os níveis proteicos de SAMHD1 e promove inibição da replicação viral;
- Tratamento com guanosina diminui a replicação viral.

## 7. PERSPECTIVAS

- Verificar se os resultados verificados neste trabalho se repetem em outros modelos celulares, como por exemplo outros modelos de pneumócitos;
- Estudar as vias de sinalização envolvidas com a atividade inibitória de SAMHD1 sobre os vírus influenza;
- Avaliar o efeito da superexpressão de SAMHD1 e a relação com a replicação do influenza;
- Avaliar polimorfismos de SAMHD1 em amostras respiratórias de pacientes infectados por influenza, que poderiam estar relacionados a maior ou menor gravidade da doença;
- Realizar estudos *in vivo* com modelos de camundongos *knockout* e selvagem para CCR5, a fim de avaliar os níveis de SAMHD1 em suas células pulmonares, durante infecções por influenza de maior e menor patogenicidade.

## 8. OUTRAS PRODUÇÕES DURANTE O MESTRADO

### 8.1. Inhibitory effect of microalgae and cyanobacteria extracts on influenza virus replication and neuraminidase activity

**Periódico:** PeerJ.

**DOI:** 10.7717/peerj.5716 – Outubro de 2018.

O vírus influenza circula em todo o mundo causa infecções sazonais com sintomas leves a graves, afetando pessoas em qualquer faixa etária. Portanto, esta infecção é um grave problema de saúde pública, que causa doenças graves e morte, principalmente, em populações de alto risco. Todos os anos, 0,5% da população mundial é infectada por esse patógeno. Esta porcentagem pode aumentar até dez vezes durante as pandemias. A vacinação contra influenza é a maneira mais eficaz de prevenir doenças. Além disso, os medicamentos anti-influenza são essenciais para intervenções profiláticas e terapêuticas. O oseltamivir (OST, um inibidor da neuraminidase) é o antiviral primário usado em clínicas durante surtos. No entanto, os vírus resistentes ao OST podem surgir naturalmente ou devido à pressão antiviral, com uma prevalência de 1-2% em todo o mundo. Assim, a busca por novos medicamentos anti-influenza é extremamente importante. Atualmente, vários grupos vêm desenvolvendo estudos descrevendo o potencial biotecnológico de microalgas e cianobactérias, incluindo a atividade antiviral de seus extratos. No Brasil, esse potencial é pouco conhecido e explorado. Com o objetivo de ampliar o conhecimento sobre o tema, 38 extratos de microalgas e cianobactérias isolados de biomas marinhos e de água doce no Brasil foram testados contra: toxicidade celular; replicações de cepas virais sensíveis e resistentes ao OST; e atividade neuraminidase. Para este propósito, as células MDCK infectadas foram tratadas com 200 µg/mL de cada extrato. Um total de 17 extratos (45%) inibiu a replicação do influenza A, com sete deles resultando em mais de 80% de inibição. Além disso, ensaios funcionais realizados com a neuraminidase viral revelaram dois extratos (de *Leptolyngbya* sp. e *Chlorellaceae*) com IC<sub>50</sub> <210 µg/mL para influenza A e B, e para linhagens sensíveis e resistentes ao OST. Além disso, as células MDCK expostas a 1 mg/mL de todos os extratos apresentaram viabilidade superior a 80%. Nossos resultados sugerem que extratos de microalgas e cianobactérias têm propriedades promissoras anti-influenza. Outras investigações químicas devem ser conduzidas para isolar os compostos ativos, para o desenvolvimento de novos medicamentos anti-influenza. Os dados gerados contribuem para o conhecimento do potencial biotecnológico dos biomas brasileiros que ainda são pouco explorados para esse fim.



# Inhibitory effect of microalgae and cyanobacteria extracts on influenza virus replication and neuraminidase activity

Thauane Silva<sup>1</sup>, Paulo S. Salomon<sup>2</sup>, Lidilhone Hamerski<sup>3</sup>, Juline Walter<sup>4</sup>, Rafael B. Menezes<sup>2</sup>, José Edson Siqueira<sup>3</sup>, Aline Santos<sup>1</sup>, Jéssica Aparecida Morais Santos<sup>1</sup>, Natália Ferme<sup>1</sup>, Thaise Guimarães<sup>1</sup>, Giovana O. Fistarol<sup>2</sup>, Paulo I. Hargreaves<sup>2</sup>, Cristiane Thompson<sup>4</sup>, Fabiano Thompson<sup>4</sup>, Thiago Moreno Souza<sup>5,6</sup>, Marilda Siqueira<sup>1</sup> and Milene Miranda<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratório de Virus Respiratórios e do Sarampo, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>2</sup>Laboratório de Fitoplâncton Marinho, Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>3</sup>Instituto de Pesquisas de Produtos Naturais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>4</sup>Laboratório de Microbiologia Marinha, Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>5</sup>Laboratório de Imunofarmacologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>6</sup>Centro de Desenvolvimento Tecnológico em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

## ABSTRACT

**Background.** The influenza virus can cause seasonal infections with mild to severe symptoms, circulating worldwide, and it can affect people in any age group. Therefore, this infection is a serious public health problem that causes severe illness and death in high-risk populations. Every year, 0.5% of the world's population is infected by this pathogen. This percentage can increase up to ten times during pandemics. Influenza vaccination is the most effective way to prevent disease. In addition, anti-influenza drugs are essential for prophylactic and therapeutic interventions. The oseltamivir (OST, a neuraminidase inhibitor) is the primary antiviral used in clinics during outbreaks. However, OST resistant viruses may emerge naturally or due to antiviral pressure, with a prevalence of 1–2% worldwide. Thus, the search for new anti-influenza drugs is extremely important. Currently, several groups have been developing studies describing the biotechnological potential of microalgae and cyanobacteria, including antiviral activity of their extracts. In Brazil, this potential is poorly known and explored.

**Methods.** With the aim of increasing the knowledge on this topic, 38 extracts from microalgae and cyanobacteria isolated from marine and freshwater biomes in Brazil were tested against: cellular toxicity; OST-sensitive and resistant influenza replications; and neuraminidase activity.

**Results.** For this purpose, Madin-Darby Canine Kidney (MDCK)-infected cells were treated with 200 µg/mL of each extract. A total of 17 extracts (45%) inhibited influenza A replication, with seven of them resulting in more than 80% inhibition. Moreover, functional assays performed with viral neuraminidase revealed two extracts (from *Leptolyngbya* sp. and *Chlorellaceae*) with IC<sub>50</sub> mean < 210 µg/mL for influenza A and B, and also OST-sensitive and resistant strains. Furthermore, MDCK cells exposed to 1 mg/mL of all the extracts showed viability higher than 80%.

Submitted 23 April 2018  
Accepted 10 September 2018  
Published 26 October 2018

Corresponding author  
Milene Miranda,  
mmiranda@ioc.fiocruz.br,  
milenediasmiranda@gmail.com

Academic editor  
Peirong Jiao

Additional Information and  
Declarations can be found on  
page 13

DOI 10.7717/peerj.5716

© Copyright  
2018 Silva et al.

Distributed under  
Creative Commons CC-BY 4.0

OPEN ACCESS

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Brasil. **Informe Técnico- 21ª Campanha Nacional de Vacinação contra a Influenza**. Brasília; 2019. p. 1–38. Available from: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/marco/01/Informe-Cp-Influenza-29-02-2019-final.pdf>
2. Britton PN, Dale RC, Blyth CC, Macartney K, Crawford NW, Marshall H, et al. **Influenza-associated Encephalitis / Encephalopathy Identified by the Australian Childhood Encephalitis Study 2013 – 2015**. *Pediatr Infect Dis*. 2017;36(11):1021–6.
3. World Health Organization. **Influenza (Seasonal)**. 2018 [cited 2019 Jun 9]. Available from: [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal))
4. Rubín E, De La Rubia L, Pascual A, Domínguez J, Flores C. **Benign acute myositis associated with H1N1 influenza a virus infection**. *Eur J Pediatr*. 2010;169(9):1159–61.
5. Yuan HT, Ho TH, Lee JT, Chen PC, Wang CW, Yang FC. **A rare case of influenza A (H3N2)-associated encephalitis with seizure**. *Am J Emerg Med*. 2019;(xxxx):3–5.
6. Carrat F, Flahault A. **Influenza vaccine: The challenge of antigenic drift**. *Vaccine*. 2007 Sep 28 [cited 2019 Jun 24]; 25(39–40):6852–62.
7. Foster JE, Mendoza A, Seetahal J. **Viruses as Pathogens: Animal Viruses, With Emphasis on Human Viruses**. 2018. 157-187 p.
8. Hause BM, Collin EA, Liu R, Huang B, Sheng Z, Lu W, et al. **Characterization of a Novel Influenza Virus in Cattle and Swine : Proposal for a New Genus in the Orthomyxoviridae Family**. *mBio*. 2014;5(2):1–10.
9. International Committee on Taxonomy of Viruses. **Taxonomy history: Orthomyxoviridae**. 2018. Available from: [https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode\\_id=201853953](https://talk.ictvonline.org/taxonomy/p/taxonomy-history?taxnode_id=201853953)
10. Presti RM, Zhao G, Beatty WL, Mihindukulasuriya KA, Travassos APA, Popov VL, et al. **Quaranfil, Johnston Atoll and Lake Chad Viruses Are Novel Members of the Family Orthomyxoviridae**. *Am Soc Microbiol*. 2009;83(22):11599–606.
11. Villalón-Letelier F, Brooks AG, Saunders PM, Londrigan SL, Reading PC. **Host cell restriction factors that limit influenza a infection**. *Viruses*. 2017. 9(376): 1-18.
12. Baumeister EG, Pontoriero A V. **Influenza Viruses, Biology, Epidemiology, and Control**. In: *Human Virology in Latin America*. Springer, Cham; 2017. p. 255–65.
13. Gütler L. **Virology of Human Influenza**. In: Kamps BS, Hoffmann C, Preiser W, editors. *Influenza report*. Sevilla: Flying Publisher; 2006. p. 87–91.
14. Chen R, Holmes EC. **The Evolutionary Dynamics of Human Influenza B Virus Rubing**. *J Mol Evol*. 2012;2008(6):655–63.

15. Neumann G, Kawaoka Y. **Transmission of Influenza A Viruses**. *PMC*. 2016;234–46.
16. Campos ACA, Góes LGB, Moreira-Soto A, Carvalho C de, Ambar G, Sander A-L, et al. **Bat Influenza A(HL18NL11) Virus in Fruit Bats, Brazil**. *Emerg Infect Dis*. 2019;25.
17. Mehle A. **Unusual influenza A viruses in bats**. *Viruses*. 2014;6(9):3438–49.
18. Wright PF, Neumann G, Yoshihiro, Kawaoka. **Orthomyxoviruses**. In: *Fields' Virology*. 6th ed. 2007. p. 1186–243.
19. Mccullers JA, Saito T, Iverson AR. **Multiple Genotypes of Influenza B Virus Circulated between 1979 and 2003**. 2004;78(23):12817–28.
20. Stannard LM. **Influenza virus**. 1995 [cited 2019 Jun 8]. Available from: <http://www.virology.uct.ac.za/vir/teaching/linda-stannard/influenzavirus>
21. Kaiser J. **A One-Size-Fits-All Flu Vaccine ?**. 2006; *Science* 312(5772):380–2.
22. Mcauley JL, Zhang K, Mccullers JA. **The Effects of Influenza A Virus PB1-F2 Protein on Polymerase Activity Are Strain Specific and Do Not Impact Pathogenesis**. 2010;84(1):558–64.
23. Dou D, Revol R, Östbye H, Wang H, Daniels R, Daniels R. **Influenza A Virus Cell Entry, Replication, Virion Assembly and Movement**. *Front Immunol*. 2018;9(1581):1–17.
24. García-Sastre A, Egorov A, Matasov D, Brandt S, Levy DE, Durbin JE, et al. **Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon- deficient systems**. *Virology*. 1998;252(2):324–30.
25. Martín-benito J, Ortín J. **Influenza Virus Transcription and Replication**. In: *Advances in Virus Research*. 2013. p. 113–37.
26. Hutchinson EC, Charles PD, Hester SS, Thomas B, Trudgian D. **Conserved and host-specific features of influenza virion architecture**. *Nat Commun*. 2014;5(4816):1–10.
27. Weis W, Brown JH, Cusack S, Paulson JC, Skehel JJ, Wiley DC. **Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid**. *Nature* [Internet]. 1988;333(6172):426–31.
28. Bullough PA, Hughson FM, Skehel JJ, Wiley DC. **Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion**. *Nature*. 1994;371(6492):37–43.
29. Rogers GN, Paulson JC. **Receptor determinants of human and animal influenza virus isolates: Differences in receptor specificity of the H3 hemagglutinin based on species of origin**. *Virology*. 1983;127(2):361–73.
30. Born PS, Siqueira MM, Faria NR, Resende PC, Bello FCMG. **Infection, Genetics and Evolution Phylodynamics of influenza A (H3N2) in South America, 1999 – 2012**. *Elsevier*. 2016;43:312–20.
31. Miller RS, Maclean AR, Gunson RN, Carman WF. **Occurrence of haemagglutinin mutation D222G in pandemic influenza A(H1N1) infected patients in the West of Scotland, United Kingdom, 2009-10**. *Eurosurveillance*. 2010;15(16):21.

32. Robb NC, Smith M, Vreede FT, Fodor E. **NS2/NEP protein regulates transcription and replication of the influenza virus RNA genome.** *J Gen Virol.* 2009;90(6):1398–407.
33. van de Sandt CE, Kreijtz JHCM, Rimmelzwaan GF. **Evasion of Influenza A Viruses from Innate and Adaptive Immune Responses.** *Viruses.* 2012;4(12):1438–76.
34. Drake JW. **Rates of spontaneous mutation among RNA viruses.** *Proc Natl Acad Sci.* 1993;90(9):4171–5.
35. Mchardy AC, Adams B. **The Role of Genomics in Tracking the Evolution of Influenza A Virus.** *PLoS Pathog.* 2009;5(10):1–6.
36. Garten RJ, Davis CT, Russell CA, Shu B, Lindstrom S, Balish A, et al. **Antigenic and Genetic Characteristics Influenza Viruses Circulating in Humans.** *Science.* 2009;325(5937):197—201.
37. Kilbourne ED. **Influenza Pandemics of the 20th Century.** 2006;12(1):9–14.
38. Siqueira MM, Aguiar M d. L, Couto FC, Barreto PF. **Influenza.** In: *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias.* Guanabara Koogan; 2013. p. 1855–72.
39. Taubenberger JK, Baltimore D, Doherty PC, Markel H, Morens DM, Webster RG, et al. **Reconstruction of the 1918 Influenza Virus: Unexpected Rewards from the Past.** *mBio.* 2012;3(5):1–5.
40. Qi L, Davis AS, Jagger BW, Schwartzman LM, Dunham EJ, Kash JC, et al. **Analysis by Single-Gene Reassortment Demonstrates that the 1918 Influenza Virus Is Functionally Compatible with a Low-Pathogenicity Avian Influenza Virus in Mice.** *Journal of Virology.* 2012;86(17):9211–20.
41. Isakova-Sivak I, Stukova M, Erofeeva M, Naykhin A, Donina S, Petukhova G, et al. **H2N2 live attenuated influenza vaccine is safe and immunogenic for healthy adult volunteers.** *Hum Vaccin Immunother.* 2015;11(4):970–82.
42. Hilleman MR. **Realities and enigmas of human viral influenza : pathogenesis, epidemiology and control.** 2002;20:3068–87.
43. Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus Investigation Team. **Emergence of a Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus in Humans.** *New Engl J.* 2009;360:2606–15.
44. Neumann G, Noda T, Kawaoka Y. **Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus.** *Nature.* 2009;459(7249):931–9.
45. Dawood FS, Iuliano AD, Reed C, Meltzer MI, Shay DK, Cheng P, et al. **Estimated global mortality associated with the first 12 months of 2009 pandemic influenza A H1N1 virus circulation : a modelling study.** *Lancet Infect Dis.* 2009;12(9):687–95.
46. World Health Organization. **Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2016- 2017 northern hemisphere influenza season.** 2016.
47. World Health Organization. **The top 10 causes of death.** 2018. p. 1. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death>

48. Pichon M. **Impact of the Respiratory Microbiome on Host Responses to Respiratory Viral Infection.** *Vaccines.* 2017;5(40):1–14.
49. World Health Organization. **Global Influenza Strategy 2019-2030 Influenza.** 2019.
50. Caini S, Andrade W, Badur S, Balmaseda A, Barakat A, Bella A, et al. **Temporal patterns of influenza A and B in tropical and temperate countries: What are the lessons for influenza vaccination?.** *PLoS One.* 2016;11(3):1–15.
51. Lowen AC, Steel J. **Roles of Humidity and Temperature in Shaping Influenza Seasonality.** 2014;88(14):7692–5.
52. Ministério da Saúde. **Influenza: Monitoramento até a Semana Epidemiológica 52 de 2018.** 2018.
53. Ministério da Saúde. **Influenza: Monitoramento até a Semana Epidemiológica 17 de 2019.** 2019.
54. Ministério da Saúde. **Influenza: Monitoramento até a Semana Epidemiológica 14 de 2019.** 2019.
55. Tominack RL, Hayden FG. **Rimantadine hydrochloride and amantadine hydrochloride use in influenza A virus infections.** *Infect Dis Clin North Am.* 1987;1(2):459–78.
56. Bright RA, Medina M, Xu X, Perez-oronoz G, Wallis TR, Davis XM, et al. **Incidence of adamantane resistance among influenza A (H3N2) viruses isolated worldwide from 1994 to 2005: a cause for concern.** *Lancet.* 2005;1175–81.
57. Dong G, Peng C, Luo J, Wang C, Han L, Wu B. **Adamantane-Resistant Influenza A Viruses in the World (1902 – 2013): Frequency and Distribution of M2 Gene Mutations.** *PLoS ONE.* 2015;10(3):1–20.
58. Hurt AC, Besselaar TG, Daniels RS, Ermetal B, Fry A, Gubareva L, et al. **Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors, 2014–2015.** *Antiviral Res.* 2016;132:178–85.
59. Dixit R, Khandaker G, Ilgoutz S, Rashid H, Booy R. **Emergence of Oseltamivir Resistance: Control and Management of Influenza before, during and after the Pandemic.** *Infect Disord - Drug Targets.* 2013;13(1):34–45.
60. Hurt AC, Hardie K, Wilson NJ, Deng YM, Osbourn M, Leang SK, et al. **Characteristics of a widespread community cluster of H275Y oseltamivir-resistant a(H1N1)pdm09 influenza in Australia.** *J Infect Dis.* 2012;206(2):148–57.
61. Souza TML, Resende PC, Fintelman-Rodrigues N, Gregianini TS, Ikuta N, Fernandes SB, et al. **Detection of oseltamivir-resistant pandemic influenza A(H1N1)pdm2009 in Brazil: Can community transmission be ruled out?.** *PLoS One.* 2013;8(11):1–6.
62. Lopes E Souza TM, Fintelman-Rodrigues N, Resende PC, Mesquita M, Gregianini TS, Bozza FA, et al. **Oseltamivir-resistant influenza A(H1N1)pdm2009 strains found in Brazil are endowed with permissive mutations, which compensate the loss of fitness imposed by antiviral**

- resistance.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 2015;110(1):101–5.
63. Matos AR, Resende PC, Miranda MD, Garcia CC, Caetano BC, Lopes JCO, et al. **Susceptibility of Brazilian influenza A(H1N1)pdm09 viruses to neuraminidase inhibitors in the 2014–2016 seasons: Identification of strains bearing mutations associated with reduced inhibition profile.** Antiviral Res. 2018;154(November 2017):35–43.
64. 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;17(5):530–8.
65. Mifsud EJ, Hayden FG, Hurt AC. **Antivirals targeting the polymerase complex of influenza viruses.** Antiviral Res. 2019;169(April):104545.
66. Omoto S, Speranzini V, Hashimoto T, Noshi T, Yamaguchi H, Kawai M, et al. **Characterization of influenza virus variants induced by treatment with the endonuclease inhibitor baloxavir marboxil.** Sci Rep. 2018;8(1):1–15.
67. Furuta Y, Komeno T, Nakamura T. **Favipiravir (T-705), a broad spectrum inhibitor of viral RNA polymerase.** Proc Japan Acad Ser B. 2017;93(7):449–63.
68. Furuta Y, Takahashi K, Kuno M, Kamiyama T, Kozaki K, et al. **In vitro and in vivo activities of anti-influenza virus compound T-705.** Antimicrob Agents Chemother. 2002;46(4):977–81.
69. Baz M, Carbonneau J, Rhéaume C, Cavanagh M-H, Boivin G. **Combination Therapy with Oseltamivir and Favipiravir Delays Mortality but Does Not Prevent Oseltamivir Resistance in Immunodeficient Mice Infected with Pandemic A(H1N1) Influenza Virus.** Viruses. 2018;10(11):610.
70. Goldhill DH, te Velthuis AJW, Fletcher RA, Langat P, Zambon M, Lackenby A, et al. **The mechanism of resistance to favipiravir in influenza.** Proc Natl Acad Sci. 2018 ;115(45):11613–8.
71. Takashita E, Kawakami C, Ogawa R, Morita H, Fujisaki S, Shirakura M, et al. **Influenza A(H3N2) virus exhibiting reduced susceptibility to baloxavir due to a polymerase acidic subunit I38T substitution detected from a hospitalised child without prior baloxavir treatment.** 2019. Eurosurveillance. 2019;24(12).
72. World Health Organization. **Pandemic Influenza Preparedness and Response: A WHO Guidance Document.** Geneva; 2009. 64 p.
73. CDC. **Key Facts About Seasonal Flu Vaccine.** 2018.
74. World Health Organization. **Addendum to the recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2019–2020 northern hemisphere influenza season 21.** 2019.
75. World Health Organization. **Recommended composition of influenza virus vaccines for use in the 2019 southern hemisphere influenza season.** 2019;91(41):1–9.
76. Ministério da Saúde. **Campanha nacional contra a gripe bate meta de 90% de cobertura.** 2019. Available from: <http://www.saude.gov.br/noticias/agencia->

- saude/45543-campanha-nacional-contra-a-gripe-atinge-90-de-cobertura
77. Ministério da Saúde. **RESOLUÇÃO-RE Nº 2.714, DE 4 DE OUTUBRO DE 2018**. Vol. 2018. 2019.
  78. Randall RE, Goodbourn S. **Interferons and viruses: An interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures**. *J Gen Virol*. 2008;89(1):1–47.
  79. Stewart CE, Randall RE, Adamson CS. **Inhibitors of the Interferon Response Enhance Virus Replication In Vitro**. *PLoS ONE*. 2014;9(11):3–10.
  80. Assil S, Webster B, Dreux M. **Regulation of the host antiviral state by intercellular communications**. *Viruses*. 2015;7(8):4707–33.
  81. Medzhitov R. **Recognition of microorganisms and activation of the immune response**. *Nature*. 2007;449(7164):819–26.
  82. Le R, Bloch S, Escriou N, Akira S, Chignard M, Si-tahar M. **Involvement of Toll-like Receptor 3 in the Immune Response of Lung Epithelial Cells to Double-stranded RNA and Influenza A Virus**. *The Journal Of Biological Chemistry*. 2005;280(7):5571–80.
  83. Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S. **Innate Antiviral Responses by Means of TLR7-Mediated Recognition of Single-Stranded RNA**. *Science*. 2004;30:1529–32.
  84. Wang JP, Bowen GN, Padden C, Cerny A, Finberg RW, Newburger PE, et al. **Toll-like receptor – mediated activation of neutrophils by influenza A virus**. *Blood*. 2008;112(5):2028–35.
  85. Ablasser A, Poeck H, Anz D, Schlee M, Kim S, Bourquin C, et al. **Selection of Molecular Structure and Delivery of RNA Oligonucleotides to Activate TLR7 versus TLR8 and to Induce High Amounts of IL-12p70 in Primary Human Monocytes**. *J Immunol*. 2009;
  86. Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M, et al. **The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses**. *Nat Immunology*. 2004;5(7):730–7.
  87. Interferome. database statistics [Internet]. [cited 2019 Jun 16]. Available from: <http://www.interferome.org/interferome/home.jsp>
  88. Rusinova I, Forster S, Yu S, Kannan A, Masse M, Cumming H, et al. **INTERFEROME v2 . 0: an updated database of annotated interferon-regulated genes**. *Nucleic Acids Research*. 2013;41(November 2012):1040–6.
  89. Mibayashi M, Martı L, Loo Y, Ca WB, Gale M, Garcı A. **Inhibition of Retinoic Acid-Inducible Gene I-Mediated Induction of Beta Interferon by the NS1 Protein of Influenza A Virus**. *Journal of Virology*. 2007;81(2):514–24.
  90. Gack MU, Albrecht RA, Urano T, Inn K, Huang I. **Influenza A Virus NS1 Targets the Ubiquitin Ligase TRIM25 to Evade Recognition by the Host Viral RNA Sensor RIG-I**. *Cell*. 2009;439–49.
  91. Graef KM, Vreede FT, Lau Y, Mccall AW, Carr SM, Subbarao K, et al. **The PB2 Subunit of the Influenza Virus RNA Polymerase Affects Virulence by Interacting with the Mitochondrial Antiviral Signaling Protein and Inhibiting**

- Expression of Beta Interferon.** Journal of Virology. 2010;84(17):8433–45.
92. Varga ZT, Ramos I, Hai R, Schmolke M, Palese P. **The Influenza Virus Protein PB1-F2 Inhibits the Induction of Type I Interferon at the Level of the MAVS Adaptor Protein.** PLoS Pathogens. 2011;7(6).
  93. Duggal NK, Emerman M. **Evolutionary conflicts between viruses and restriction factors shape immunity.** Nat Rev Immunol. 2012;12(10):687–95.
  94. Bieniasz PD. **Restriction factors : a defense against retroviral infection.** TRENDS in Microbiology. 2003;11(6):286–91.
  95. Navarro F, Bollman B, Chen H, Renate K, Yu Q, Chiles K, et al. **Complementary function of the two catalytic domains of APOBEC3G.** Virology. 2005;333:374–86.
  96. Harper MS, Barrett BS, Smith DS, Li SX, Gibbert K, Dittmer U, et al. **IFN- $\alpha$  treatment inhibits acute Friend retrovirus replication primarily through the antiviral effector molecule Apobec3.** J Immunol. 2013;190(4):1583–90.
  97. Malim MH, Bieniasz PD. **HIV Restriction Factors and Mechanisms of Evasion.** Cold Spring Harb Perspect Med. 2012;2:1–17.
  98. Xiao H, Killip MJ, Staeheli P, Randall RE. **The Human Interferon-Induced MxA Protein Inhibits Early Stages of Influenza A Virus Infection by Retaining the Incoming Viral Genome.** J Virol. 2013;87(23):13053–8.
  99. Zimmermann P, Ma B, Haller O, Schwemmle M, Kochs G. **The Viral Nucleoprotein Determines Mx Sensitivity of Influenza A Viruses.** Journal of Virology. 2011;85(16):8133–40.
  100. Han J, Barton DJ. **Activation and evasion of the antiviral 2'5' oligoadenylate synthetase/ribonuclease L pathway by hepatitis C virus mRNA.** RNA. 2002;512–25.
  101. Zhu J, Zhang Y, Ghosh A, Cuevas RA, Forero A, Dhar J, et al. **Antiviral Activity of Human OASL Protein Is Mediated by Enhancing Signaling of the RIG-I RNA Sensor.** Immunity. 2014;40(6):936–48.
  102. Liberatore RA, Bieniasz PD. **Tetherin is a key effector of the antiretroviral activity of type I interferon in vitro and in vivo.** Proc Natl Acad Sci. 2011;108(44):18097–101.
  103. Yap MW, Nisole S, Lynch C, Stoye JP. **Trim5alpha protein restricts both HIV-1 and murine leukemia virus.** Proc Natl Acad Sci. 2004;101(29):10786–91.
  104. Diaz-griffero F, Gallo DE, Hope TJ, Sodroski J. **Trafficking of some old world primate TRIM5 proteins through the nucleus.** Retrovirology. 2011;8(1):38.
  105. McMichael TM, Zhang Y, Kenney AD, Zhang L, Zani A, Lu M, et al. **IFITM3 Restricts Human Metapneumovirus Infection.** J Infect Dis. 2018; 218(10): 1582–1591.
  106. Huang IC, Bailey CC, Weyer JL, Radoshitzky SR, Becker MM, Chiang JJ, et al. **Distinct patterns of IFITM-mediated restriction of filoviruses, SARS coronavirus, and influenza A virus.** PLoS Pathog. 2011;7(1): 1–13.
  107. Savidis G, Perreira JM, Portmann JM, Meraner P, Guo Z, Green S, et al. **The IFITMs Inhibit Zika Virus Replication.** Cell Rep. 2016;15(11):2323–30.

108. Chen Z, Zhu M, Pan X, Zhu Y, Yan H, Jiang T, et al. **Inhibition of Hepatitis B virus replication by SAMHD1.** *Biochem Biophys Res Commun.* 2014;450(4):1462–8.
109. Lahouassa H, Daddacha W, Hofmann H, Ayinde D, Logue EC, Dragin L, et al. **SAMHD1 restricts the replication of human immunodeficiency virus type 1 by depleting the intracellular pool of deoxynucleoside triphosphates.** *Nat Immunol.* 2012;13(3):223–8.
110. Goldstone DC, Ennis-Adeniran V, Hedden JJ, Groom HCT, Rice GI, Christodoulou E, et al. **HIV-1 restriction factor SAMHD1 is a deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase.** *Nature.* 2011;480(7377):379–82.
111. Zhu C, Gao W, Zhao K, Qin X, Zhang Y, Peng X, et al. **Structural insight into dGTP-dependent activation of tetrameric SAMHD1 deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase.** *Nat Commun.* 2013;4:1–9.
112. Yan J, Kaur S, DeLucia M, Hao C, Mehrens J, Wang C, et al. **Tetramerization of SAMHD1 is required for biological activity and inhibition of HIV infection.** *J Biol Chem.* 2013;288(15):10406–17.
113. Cribier A, Descours B, Valadão ALC, Laguette N, Benkirane M. **Phosphorylation of SAMHD1 by Cyclin A2/CDK1 Regulates Its Restriction Activity toward HIV-1.** *Cell Rep.* 2013;3(4):1036–43.
114. Gramberg T, Kahle T, Bloch N, Wittmann S, Müllers E, Daddacha W, et al. **Restriction of diverse retroviruses by SAMHD1.** *Retrovirology.* 2013;10:26.
115. White TE, Brandariz-Nuñez A, Carlos Valle-Casuso J, Amie S, Nguyen L, Kim B, et al. **Contribution of SAM and HD domains to retroviral restriction mediated by human SAMHD1.** *Virology.* 2013;436(1):81–90.
116. Alkhatib G. **The biology of CCR5 and CXCR4.** *Curr Opin HIV AIDS.* 2013;71(2):233–6.
117. Hansen EC, Seamon KJ, Cravens SL, Stivers JT. **GTP activator and dNTP substrates of HIV-1 restriction factor SAMHD1 generate a long-lived activated state.** *Proc Natl Acad Sci.* 2014;111(18):E1843–51.
118. Hofmann H, Logue EC, Bloch N, Daddacha W, Polsky SB, Schultz ML, et al. **The Vpx Lentiviral Accessory Protein Targets SAMHD1 for Degradation in the Nucleus.** *J Virol.* 2012;86(23):12552–60.
119. Tüngler V, Staroske W, Kind B, Dobrick M, Kretschmer S, Schmidt F, et al. **Single-stranded nucleic acids promote SAMHD1 complex formation.** *J Mol Med.* 2013;91(6):759–70.
120. Ryoo J, Choi J, Oh C, Kim S, Seo M, Kim SY, et al. **The ribonuclease activity of SAMHD1 is required for HIV-1 restriction.** *Nat Med.* 2014;20(8):936–41.
121. Choi J, Ryoo J, Oh C, Hwang S, Ahn K. **SAMHD1 specifically restricts retroviruses through its RNase activity.** *Retrovirology.* 2015;12:46.
122. Antonucci JM, Gelais CS, Silva S de, Yount JS, Tang C, Ji X, et al. **SAMHD1-mediated HIV-1 restriction in cells does not involve ribonuclease activity.** *Nat Med.* 2016;22(10):1074–5.
123. Ryoo J, Hwang S-Y, Choi J, Oh C, Ahn K. **Reply to SAMHD1-mediated HIV-1**

- restriction in cells does not involve ribonuclease activity.** *Nat Med.* 2016;22(10):1074–5.
124. Kim ET, White TE, Brandariz-Núñez A, Diaz-Griffero F, Weitzman MD. **SAMHD1 Restricts Herpes Simplex Virus 1 in Macrophages by Limiting DNA Replication.** *J Virol.* 2013;87(23):12949–56.
  125. Yang S, Shan T, Zhou Y, Jiang Y, Tong W, Liu F, et al. **Molecular cloning and characterizations of porcine SAMHD1 and its roles in replication of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus.** *Dev Comp Immunol.* 2014;47(2):234–46.
  126. Li M, Zhang D, Zhu M, Shen Y, Wei W, Ying S, et al. **Roles of SAMHD1 in antiviral defense, autoimmunity and cancer.** *Rev Med Virol.* 2017;27(4).
  127. Shi G, Schwartz O, Compton AA. **More than meets the I : the diverse antiviral and cellular functions of interferon - induced transmembrane proteins.** *Retrovirology.* 2017;1–11.
  128. Brass AL, Huang I, Benita Y, John SP, Krishnan MN, Feeley EM, et al. **The IFITM Proteins Mediate Cellular Resistance to Influenza A H1N1 Virus, West Nile Virus, and Dengue Virus.** *Cell.* 2009;139(7):1243–54.
  129. Narayana SK, Helbig KJ, McCartney EM, Eyre NS, Bull RA, Eltahla A, et al. **The interferon-induced transmembrane proteins, IFITM1, IFITM2, and IFITM3 inhibit hepatitis C virus entry.** *J Biol Chem.* 2015;290(43):25946–59.
  130. Desai TM, Marin M, Chin CR, Savidis G, Brass AL, Melikyan GB. **IFITM3 Restricts Influenza A Virus Entry by Blocking the Formation of Fusion Pores following Virus-Endosome Hemifusion.** *PLoS Pathog.* 2014;10(4).
  131. Perreira JM, Chin CR, Feeley EM, Brass AL. **IFITMs restrict the replication of multiple pathogenic viruses.** *J Mol Biol.* 2013;425(24):4937–55.
  132. Mesquita M, Fintelman-Rodrigues N, Sacramento CQ, Abrantes JL, Costa E, Temerozo JR, et al. **HIV-1 and its gp120 inhibits the influenza A(H1N1)pdm09 life cycle in an IFITM3-dependent fashion.** *PLoS One.* 2014;9(6):1–14.
  133. Stone MJ, Hayward JA, Huang C, Huma ZE, Sanchez J. **Mechanisms of regulation of the chemokine-receptor network.** Vol. 18, *International Journal of Molecular Sciences.* 2017.
  134. Moser B, Wolf M, Walz A, Loetscher P. **Chemokines: Multiple levels of leukocyte migration control.** *Trends Immunol.* 2004;25(2):75–84.
  135. Owen JL, Mohamadzadeh M. **Macrophages and chemokines as mediators of angiogenesis.** *Front Physiol.* 2013;4(159):1–8.
  136. Staversky RJ, Byun DK, Georger MA, Zaffuto BJ, Goodman A, Becker MW, et al. **The Chemokine CCL3 Regulates Myeloid Differentiation and Hematopoietic Stem Cell Numbers.** *Sci Rep.* 2018;8(1):1–9.
  137. Murdoch C, Monk PN, Finn A. **Functional expression of chemokine receptor CXCR4 on human epithelial cells.** *Immunology.* 1999;98(1):36–41.
  138. Oppermann M. **Chemokine receptor CCR5: Insights into structure, function, and regulation.** *Cell Signal.* 2004;16(11):1201–10.

139. Syrovatkina V, Alegre KO, Dey R, Huang X-Y. **Regulation, Signaling and Physiological Functions of G-proteins.** *J Mol Biol.* 2016;118(24):6072–8.
140. Wareing MD, Lyon AB, Lu B, Gerard C, Sarawar SR. **Chemokine expression during the development and resolution of a pulmonary leukocyte response to influenza A virus infection in mice.** *J Leukoc Biol.* 2004;76(4):886–95.
141. Wang J, Nikrad MP, Travanty EA, Zhou B, Phang T, Gao B, et al. **Innate immune response of human alveolar macrophages during influenza a infection.** *PLoS One.* 2012;7(3): 1–12.
142. Shinya K, Gao Y, Cilloniz C, Suzuki Y, Fujie M, Deng G, et al. **Integrated Clinical, Pathologic, Virologic, and Transcriptomic Analysis of H5N1 Influenza Virus-Induced Viral Pneumonia in the Rhesus Macaque.** *J Virol.* 2012;86(11):6055–66.
143. Flanagan CA. **Receptor conformation and constitutive activity in CCR5 chemokine receptor function and HIV infection.** 1st ed. Vol. 70, *Advances in Pharmacology.* Elsevier Inc.; 2014. 215-263 p.
144. Pawig L, Klasen C, Weber C, Bernhagen J, Noels H. **Diversity and inter-connections in the CXCR4 chemokine receptor/ligand family: molecular perspectives.** *Front Immunol.* 2015;6(August):1–23.
145. Wang M, Lin T, Wang Y, Gao S, Yang Z, Hong X, et al. **CXCL12 suppresses cisplatin-induced apoptosis through activation of JAK2/STAT3 signaling in human non-small-cell lung cancer cells.** *Onco Targets Ther.* 2017;10:3215–24.
146. Mueller A, Mahmoud NG, Goedecke MC, Strange PG, Mckeating JA. **Pharmacological characterization of the chemokine receptor CCR5.** 2002;135(4):1033-1043.
147. Lin CL, Suri RM, Rahdon RA, Austyn JM, Roake JA. **Dendritic cell chemotaxis and transendothelial migration are induced by distinct chemokines and are regulated on maturation.** *Eur J Immunol.* 1998;28(12):4114–22.
148. Velasco-Velázquez M, Pestell RG. **The CCL5/CCR5 axis promotes metastasis in basal breast cancer.** *Oncoimmunology.* 2013;2(4).
149. Martinson JJ, Chapman NH, Rees DC, Liu Y-T, Clegg JB. **Global distribution of the CCR5 gene 32-basepair deletion.** *Nat Genet.* 1997;16(1):100–3.
150. Samson M, Libert F, Doranz BJ, Rucker J, Liesnard C, Farber C-M, et al. **Resistance to HIV-1 infection in Caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene.** *Nature.* 1996;382:722–5.
151. Glass WG, McDermott DH, Lim JK, Lekhong S, Yu SF, Frank WA, et al. **CCR5 deficiency increases risk of symptomatic West Nile virus infection.** *J Exp Med.* 2006;203(1):35–40.
152. Falcon A, Cuevas MT, Rodriguez-Frandsen A, Reyes N, Pozo F, Moreno S, et al. **CCR5 deficiency predisposes to fatal outcome in influenza virus infection.** *J Gen Virol.* 2015;96(8):2074–8.
153. Sironi M, Cagliani R, Pontremoli C, Rossi M, Migliorino G, Clerici M, et al. **The CCR5Δ32 allele is not a major predisposing factor for severe H1N1pdm09**

- infection.** BMC Res Notes. 2014;7:504.
154. Matos AR, Martins JSCC, Lourdes M De, Oliveira A, Garcia CC, Siqueira MM. **Human CCR5Δ32 (rs333) polymorphism has no influence on severity and mortality of influenza A(H1N1)pdm09 infection in Brazilian patients from the post pandemic period.** Infect Genet Evol. 2018;67(2019):55–9.
  155. World Health Organization. **WHO global influenza surveillance network: manual for the laboratory diagnosis and virological surveillance of influenza.** Geneva: WHO Press; 2011. 1-137 p.
  156. Reed LJ, Muench H. **A SIMPLE METHOD OF ESTIMATING FIFTY PER CENT ENDPOINTS.** Am J Hygiene. 1938;5:25–9.
  157. Blachere FM, Lindsley WG, Slaven JE, Green BJ, Anderson SE, Chen BT, et al. **Bioaerosol sampling for the detection of aerosolized influenza virus.** Influenza Other Respi Viruses. 2007;1(3):113–20.
  158. Schmittgen TD, Livak KJ. **Analyzing real-time PCR data by the comparative C T method.** Nat Publ Gr. 2008;3(6):1101–8.
  159. Liu J, Shi X, Schwartz R, Kemble G. **Use of MDCK cells for production of live attenuated influenza vaccine.** Vaccine. 2009;27(46):6460–3.
  160. Schaller T, Pollpeter D, Apolonia L, Goujon C, Malim MH. **Nuclear import of SAMHD1 is mediated by a classical karyopherin α/β1 dependent pathway and confers sensitivity to Vpx MAC induced ubiquitination and proteasomal degradation.** Retrovirology. 2014;11(1):1–16.
  161. Rice GI, Bond J, Asipu A, Brunette RL, Manfield IW, Carr IM, et al. **Mutations involved in Aicardi-Goutières syndrome implicate SAMHD1 as regulator of the innate immune response.** Nat Genet. 2009;41(7):829–32.
  162. Amie SM, Bambara RA, Kim B. **GTP is the primary activator of the anti-HIV restriction factor SAMHD1.** J Biol Chem. 2013;288(35):25001–6.
  163. Bailey CC, Zhong G, Huang I-C, Farzan M. **IFITM-Family Proteins: The Cell's First Line of Antiviral Defense.** Annu Rev Virol. 2014;1(1):261–83.
  164. Schoggins JW, Wilson SJ, Panis M, Murphy MY, Jones CT, Bieniasz P, et al. **A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response.** Nature. 2011;472(7344):481–5.
  165. Spence JS, He R, Hoffmann HH, Das T, Thinon E, Rice CM, et al. **IFITM3 directly engages and shuttles incoming virus particles to lysosomes.** Nat Chem Biol. 2019;15(3):259–68.
  166. Zhang Y-H, Zhao Y, Li N, Peng Y-C, Giannoulatou E, Jin R-H, et al. **Interferon-induced transmembrane protein-3 genetic variant rs12252-C is associated with severe influenza in Chinese individuals.** Nat Commun. 2013;4:1418.
  167. Everitt AR, Clare S, Pertel T, John SP, Wash RS, Smith SE, et al. **IFITM3 restricts the morbidity and mortality associated with influenza.** Nature. 2012;484(7395):519–23.
  168. Randolph AG, Yip WK, Allen EK, Rosenberger CM, Agan AA, Ash SA, et al. **Evaluation of IFITM3 rs12252 Association with Severe Pediatric Influenza Infection.** J Infect Dis. 2017;216(1):14–21.

169. López-Rodríguez M, Herrera-Ramos E, Solé-Violán J, Ruíz-Hernández JJ, Borderías L, Horcajada JP, et al. **IFITM3 and severe influenza virus infection. No evidence of genetic association.** Eur J Clin Microbiol Infect Dis [Internet]. 2016;35(11):1811–7.
170. Qin L, Wang D, Li D, Zhao Y, Peng Y, Wellington D, et al. **High Level Antibody Response to Pandemic Influenza H1N1/09 Virus Is Associated With Interferon-Induced Transmembrane Protein-3 rs12252-CC in Young Adults.** Front Cell Infect Microbiol. 2018;8(May):1–6.
171. Sun X, Zeng H, Kumar A, Belser JA, Maines TR, Tumpey TM. **Constitutively Expressed IFITM3 Protein in Human Endothelial Cells Poses an Early Infection Block to Human Influenza Viruses.** J Virol. 2016;90(24):11157–67.
172. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. **General Principles of Cell Communication.** In: Molecular Biology of the Cell. 4th ed. New York: Garland Science; 2002.
173. St Gelais C, de Silva S, Amie SM, Coleman CM, Hoy H, Hollenbaugh JA, et al. **SAMHD1 restricts HIV-1 infection in dendritic cells (DCs) by dNTP depletion, but its expression in DCs and primary CD4+ T-lymphocytes cannot be upregulated by interferons.** Retrovirology. 2012;9(1):105.
174. Yang S, Zhan Y, Zhou Y, Jiang Y, Zheng X, Yu L, et al. **Interferon regulatory factor 3 is a key regulation factor for inducing the expression of SAMHD1 in antiviral innate immunity.** Sci Rep. 2016;6(29665):1–16.
175. Pauls E, Jimenez E, Ruiz A, Permanyer M, Ballana E, Costa H, et al. **Restriction of HIV-1 replication in primary macrophages by IL-12 and IL-18 through the upregulation of SAMHD1.** J Immunol. 2013;190(9):4736–41.
176. White TE, Brandariz-Nuñez A, Laguette N, Brojatsch J, Diaz-Griffero F, Valle-Casuso J, et al. **Role of SAMHD1 nuclear localization in restriction of HIV-1 and SIVmac.** Retrovirology. 2012;9(1):49.
177. Wichit S, Hamel R, Zanzoni A, Diop F, Cribier A, Talignani L, et al. **SAMHD1 Enhances Chikungunya and Zika Virus Replication in Human Skin Fibroblasts.** Int J Mol Sci. 2019;20(7):1695.
178. Sadewasser A, Paki K, Eichelbaum K, Bogdanow B, Saenger S, Budt M, et al. **Quantitative Proteomic Approach Identifies Vpr Binding Protein as Novel Host Factor Supporting Influenza A Virus Infections in Human Cells.** Mol Cell Proteomics. 2017;16(5):728–42.
179. Powell RD, Holland PJ, Hollis T, Perrino FW. **Aicardi-Goutières syndrome gene and HIV-1 restriction factor SAMHD1 is a dGTP-regulated deoxynucleotide triphosphohydrolase.** J Biol Chem. 2011;286(51):43596–600.