

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**AVALIAÇÃO DO PAPEL IMUNOREGULADOR DO RECEPTOR β 2-
ADRENÉRGICO NAS POPULAÇÕES DE CÉLULAS INATAS LINFOIDES (ILC)
DURANTE A INFECÇÃO PELO VÍRUS INFLUENZA**

Por
Leonardo de Paula Pereira

Belo Horizonte
2023

LEONARDO DE PAULA PEREIRA

**AVALIAÇÃO DO PAPEL IMUNOREGULADOR DO RECEPTOR β 2-
ADRENÉRGICO NAS POPULAÇÕES DE CÉLULAS INATAS LINFOIDES (ILC)
DURANTE A INFECÇÃO PELO VÍRUS INFLUENZA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração Biologia Celular e Molecular, Genética e Bioinformática.

Orientação: Alexandre de Magalhaes Vieira Machado (in memoriam)

Orientação: Remo de Castro Russo

Coorientação: Marcelo Pascoal Xavier

Belo Horizonte

2023

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do IRR
CRB 6 3740

P414a Pereira, Leonardo de Paula.
2023

Avaliação do papel imunoregulador do receptor β 2-Adrenérgico nas populações de células inatas linfoides (ilc) durante a infecção pelo Vírus Influenza / Leonardo de Paula Pereira. – Belo Horizonte, 2023

XI, 63 f., il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 58-63

Dissertação (Mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular, Genética e Bioinformática.

1. Receptores Adrenérgicos beta/ isolamento & purificação. 2. Imunidade Inata/imunologia 3. Vírus Influenza/patogenicidade. I. Título. II. Machado, Alexandre de Magalhaes Vieira (Orientação-in memorian). III. Russo, Remo de Castro (Orientação). Xavier, Marcelo Pascoal (Coorientação).

CDD – 22. ed. – 616.203

LEONARDO DE PAULA PEREIRA

**AVALIAÇÃO DO PAPEL IMUNOREGULADOR DO RECEPTOR β 2-
ADRENÉRGICO NAS POPULAÇÕES DE CÉLULAS INATAS LINFOIDES (ILC)
DURANTE A INFECÇÃO PELO VÍRUS INFLUENZA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências - área de concentração Biologia Celular e Molecular, Genética e Bioinformática.

Banca Examinadora:

Dr. Remo de Castro Russo – UFMG (Presidente)

Dra. Cristiana Couto Garcia – IRR/Fiocruz Minas (Titular)

Dr. Helton da Costa Santiago – UFMG (Titular)

Dr. Fabrício Marcus Silva Oliveira – IRR/Fiocruz Minas (Suplente)

Dissertação defendida e aprovada em Belo Horizonte, 12/07/2023

COLABORADORES

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunologia de Doenças Virais (IDV) do Instituto René Rachou – Fiocruz Minas e Laboratório de Imunologia e Mecânica Pulmonar da Universidade Federal de Minas Gerais, contando com a colaboração dos seguintes pesquisadores:

- Dr. Alexandre Machado – IRR/Fiocruz Minas
- Dr. Remo de Castro Russo – UFMG
- Ana Luiza Pessoa De Mendonça Ângelo – IRR/Fiocruz Minas
- Msc. Matheus de Oliveira Silva Pinto – IRR/Fiocruz Minas
- Msc. Rayanne Rosa Do Nascimento Macário – IRR/Fiocruz Minas
- Msc. Kimberly Freitas Cardoso – IRR/Fiocruz Minas
- Dr. Leonardo Gomes Vaz – UFMG
- Dr. Lucas Kraemer Rocha – UFMG
- Dra. Ana Paula de Faria Gonçalves – IRR/Fiocruz Minas
- Dr. Alexander Birbrair – UFMG
- Dr. Marcelo Antônio Pascoal Xavier – IRR/Fiocruz Minas
- Dr. Helton da Costa Santiago

*I got a million miles on me
They want to see how far I'll go
The path was never paved with gold (gold)
We worked and built this on our own (own) [...]*

[...] So when we win, we will have pride.

Beyoncé – Be alive

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus por ter me dado forças para superar todos os desafios que surgiram durante a execução do trabalho.

Aos meus pais, Simone e Ramiro, e meus avós, Iracia e Nicomedes, que me deram amplo apoio e amparo nas minhas decisões. Vocês são os pilares da minha educação e graças a vocês eu tive força para concretizar esta etapa, muito obrigado!

À minha Irmã, Kamilly, por todo incentivo e preocupação com o meu bem-estar.

Ao meu namorado, Marcos Felipe, por todo apoio, companheirismo, cuidado e por estar presente nos momentos em que mais precisei de amparo.

Aos meus amigos, Rafaela Ramalho, Carolina Damasceno, Matheus Felipe e Caio Wilker, pelo apoio e constante torcida pela conclusão desta etapa.

Ao Dr. Alexandre Machado e ao Dr. Remo de Castro Russo, pela confiança, oportunidade e incentivo em trabalhar com o instigante Influenza vírus, muito obrigado!

Aos alunos do grupo Influenza, em especial à Ana Luiza Pessoa De Mendonça Angelo, Matheus de Oliveira Silva Pinto, Rayanne Rosa Do Nascimento Macário e Kimberly Freitas Cardoso pelo carinho e boa vontade, por toda colaboração, apoio e disponibilidade no desenvolvimento deste trabalho.

Aos alunos do Laboratório de Imunologia e Mecânica Pulmonar, Drs. Leonardo Vaz e Lucas Kraemer, por toda ajuda na execução dos experimentos com animais, marcações celulares, leitura e análise da citometria de fluxo.

À Dra. Ana Paula de Faria Gonçalves, pelo ponta pé inicial na execução dos trabalhos com os receptores beta 2 adrenérgico e Influenza.

Ao Dr. Alexander Birbrair pela disponibilidade em ceder a matriz de camundongos knockout para o receptor B2 adrenérgico.

A todos os colegas do Laboratório de Imunologia de Doenças Virais (IDV) pela convivência agradável, apoio e pelos momentos de descontração.

Aos professores e funcionários da pós-graduação e do Instituto René Rachou.

Aos órgãos financiadores, instituições e programas que possibilitaram a realização desse trabalho:

- CAPES, FAPEMIG e CNPq;
- FIOCRUZ (Fundação Oswaldo Cruz) e IRR (Instituto René Rachou);
- Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde (IRR/FIOCRUZ-MG).

Muito obrigado!

RESUMO

O vírus Influenza (IAV) é um patógeno de vigilância constante, que pode infectar uma ampla gama de hospedeiros. Em humanos, pode causar quadros de doença respiratória assintomática ou graves. A infecção pelo IAV é responsável por ocasionar cerca de 5 milhões de casos graves no mundo, acarretando aproximadamente 650 mil mortes anualmente, causando sobrecarga no sistema de saúde e impacto na economia mundial. A resposta imune inata possui componentes mieloides (macrófagos, monócitos, células dendríticas) e linfoides (Natural Killer cells, Linfócitos $\gamma\delta$, e células inatas linfóides – ILCs), que compõem um nicho residente nos tecidos pulmonares que orquestram as respostas inflamatórias e de reparo tecidual durante a infecção viral. O Sistema Nervoso Simpático (SNS) desempenha um importante papel na sinalização adrenérgica, através da liberação de catecolaminas que atuam nos receptores adrenérgicos que desempenham distintas funções no organismo, dentre elas, impacto na resposta imune. Desse modo, o presente estudo teve como objetivo analisar o impacto imunomodulador da sinalização adrenérgica pelo receptor β 2-adrenérgico durante infecção experimental pelo vírus IAV. Para isso, camundongos wild-type (WT) e knockout para o receptor B2AR (B2AR^{-/-}) foram infectados por via intranasal com 250 PFU do vírus A/PR/8/34 e acompanhados por 7 dias. Avaliamos subpopulações de leucócitos no lavado broncoalveolar por FACS, sobrevivência de camundongos, alterações histopatológicas, mediadores inflamatórios por CBA array e resposta imune humoral por ELISA. Camundongos B2AR^{-/-} apresentaram maior número de eosinófilos, neutrófilos, monócitos, macrófagos e células dendríticas quando comparados a camundongos WT. Além disso, apresentaram uma resposta de ILCs desregulada, com aumento das populações de ILC1, ILC2, ILC3 e ILCreg, diferentemente dos camundongos WT que montaram uma resposta mista, com expansão de ILC1 e ILC2. Camundongos B2AR^{-/-} apresentaram alterações histopatológicas graves caracterizadas por infiltrado inflamatório neutrofílico septal e alveolar, edema e congestão. Consequentemente, causando um maior comprometimento das funções ventilatórias em relação aos camundongos WT. Além disso, níveis aumentados de IFN- γ , IL-6 e TNF foram observados em camundongos B2AR^{-/-}. Camundongos B2AR^{-/-} tiveram títulos de IgA específica mais elevados em comparação com camundongos WT, porém, sem diferenças na carga viral pulmonar, mas o B2AR^{-/-} sucumbiu à infecção precocemente e teve maior mortalidade. Assim, esse achado indica a importância do receptor B2AR durante a resposta inflamatória durante a infecção pelo vírus influenza A.

PALAVRAS-CHAVE: Células linfoides inatas, Influenza, Receptor β 2 adrenérgico

ABSTRACT

The Influenza virus (IAV) is a constant surveillance pathogen that can infect a wide range of hosts. In humans, it can cause asymptomatic or severe respiratory disease. IAV infection is responsible for causing around 5 million serious cases worldwide, causing approximately 650,000 deaths annually, causing an overload on the health system and impacting the world economy. The innate immune response has myeloid components (macrophages, monocytes, dendritic cells) and lymphoid components (Natural Killer cells, Lymphocytes $\gamma\delta$, and innate lymphoid cells – ILCs), which make a resident niche in lung tissues that orchestrate inflammatory and repair responses tissue during viral infection. The Sympathetic Nervous System (SNS) plays an important role in adrenergic signaling, through the release of catecholamines that act on adrenergic receptors that perform different functions in the body, among them, impact on the immune response. Therefore, the present study aimed to analyze the immunomodulatory impact of adrenergic signaling through the β 2-adrenergic receptor during experimental infection by the IAV virus. For this, wild-type (WT) and knockout mice for the B2AR receptor (B2AR^{-/-}) were infected intranasally with 250 PFU of the A/PR/8/34 virus and monitored for 7 days. We evaluated leukocyte subpopulations in bronchoalveolar lavage by FACS, mouse survival, histopathological changes, inflammatory mediators by CBA array and humoral immune response by ELISA. B2AR^{-/-} mice had greater numbers of eosinophils, neutrophils, monocytes, macrophages and dendritic cells when compared to WT mice. Furthermore, they presented a deregulated ILCs response, with an increase in the populations of ILC1, ILC2, ILC3 and ILCreg, differently than WT mice that mounted a mixed response, with expansion of ILC1 and ILC2. B2AR^{-/-} mice presented severe histopathological changes characterized by septal and alveolar neutrophilic inflammatory infiltrate, edema and congestion. Consequently, causing a greater impairment of ventilatory functions compared to WT mice. Furthermore, increased levels of IFN-g, IL-6 and TNF were observed in B2AR^{-/-} mice. B2AR^{-/-} mice had higher specific IgA titers compared to WT mice, however, without differences in lung viral load, but B2AR^{-/-} succumbed to infection early and had higher mortality. Thus, this finding indicates the importance of the B2AR receptor during the inflammatory response during influenza A virus infection.

KEYWORDS: Innate lymphoid cells, Influenza, β 2 adrenergic receptor.

LISTA DE IMAGENS

Imagem 1: Desenho esquemático do vírus influenza A.	15
Imagem 2: Esquema do ciclo de replicação do vírus Influenza A.	16
Imagem 3: Esquema de variação antigênica do IAV.	18
Imagem 4: Distribuição dos receptores de ácido siálico nas principais espécies hospedeiras.	19
Imagem 5: Sinalizações imunológicas desencadeadas durante a infecção pelo vírus IAV.....	21
Imagem 6: Sinalização através dos receptores do tipo Toll-like (TLR).....	22
Imagem 7: Sinalização imunológica via RIG-1.	23
Imagem 8: Ativação da via do inflamassoma NLRP3.	24
Imagem 9: Vias autonômicas de sinalização.	26
Imagem 10: Receptores sistema nervoso autonômico e seus respectivos neurotransmissores.....	27
Imagem 11: Sinalização adrenérgica.	28

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Caracterização do perfil de células linfoides inatas no BAL de camundongos selvagens infectados com o vírus influenza A.....	40
Figura 2: Caracterização do perfil de células linfoides inatas no BAL de camundongos infectados com o vírus influenza A.	42
Figura 3: Caracterização do perfil de células inatas de origem mieloide em camundongos infectados com o vírus influenza.	43
Figura 4: Avaliação de espirometria de camundongos infectados com vírus influenza.	45
Figura 5: Alterações histopatológicas das vias aeres de camundongos infectados com o vírus Influenza.	47
Figura 6: Caracterização dos mediadores solúveis durante a infecção pelo vírus Influenza. ..	48
Figura 7: Caracterização da resposta humoral, mediada por anticorpos específicos anti-influenza durante a infecção.	49
Figura 8: Caracterização fenotípica, carga viral, Bradford e contagem de leucócitos..	51

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	12
2.1. Influenza A	14
2.1.1. Aspectos gerais do vírus.....	14
2.1.2. Replicação Viral.....	15
2.1.3. Infecções por Influenza	16
2.1.4. Variação antigênica do vírus Influenza A	17
2.1.5. Resposta imune inata.....	20
2.1.6. Resposta Inata Celular.....	24
3.1. Sistema nervoso simpático (SNS).....	25
3.2. Receptores adrenérgicos	27
4. OBJETIVOS.....	30
4.1. Objetivo geral	30
4.2. Objetivos específicos	30
5. METODOLOGIA.....	31
5.1. Cultivo celular.....	31
5.2. Utilização e inspeção de animais	31
5.3. Infecção dos animais: Mortalidade A/PR/8/34	31
5.4. Infecção dos animais: Avaliação 7 DPI.....	32
5.5. Coleta de lavado bronco-alveolar (BAL).....	33
5.6. Mensuração de proteínas no BALF	33
5.7. Avaliação da carga viral nos pulmões	33
5.8. Avaliação da mecânica respiratória	34
5.9. Citometria de Fluxo	34
5.10. Avaliação de citocinas solúveis por CBA (Cytometric Bead Array)	37
5.11. Detecção de anticorpos séricos específicos	37
5.12. Análises histopatológicas.....	38
5.13. Análises estatísticas	38
6. RESULTADOS	39
6.1. Caracterização da resposta imune linfocitária inata e adaptativa frente ao vírus Influenza A.	39
6.2. Avaliação do impacto causado pela deficiência em ADRB2 sobre o perfil de células linfoides durante infecção pelo vírus Influenza A.	40
6.3. Avaliação do impacto causado pela deficiência em ADRB2 sobre o perfil de células mieloides durante infecção pelo vírus Influenza A.....	42
6.4. Impacto da deficiência em ADRB2 sobre a mecânica pulmonar durante infecção pelo vírus Influenza A.	44

6.5. Análise histopatológica dos pulmões de camundongos infectados com vírus Influenza A.....	46
6.6. Caracterização do perfil de mediadores solúveis.....	47
6.7. Caracterização da resposta imune humoral.....	48
6.8. Caracterização fenotípica.....	50
7. DISCUSSÃO.....	52
8. CONCLUSÃO.....	57
9. REFERÊNCIAS.....	58

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Os vírus influenza são pertencentes a família *Orthomyxoviridae*, e são divididos em quatro gêneros principais, sendo que, o Influenza A (IAV) é o de maior relevância clínica. Os vírus IAV são responsáveis por causar aproximadamente 650 mil mortes anuais no mundo e consequentemente, impacto no sistema de saúde e na economia global (Davidson, 2018; Wang et al., 2022). Os IAV podem infectar uma gama de espécies, incluindo os humanos, suínos, aves e animais aquáticos devido à afinidade pelos receptores de ácido siálico dos tipos $\alpha 2-6$ AS e $\alpha 2-3$ SA que estão presentes no trato respiratório destes animais (Long et al., 2019). Infecções restritas ao trato respiratório superior são caracterizadas pelo desenvolvimento de doença leve. Contudo, esta infecção pode atingir o trato respiratório inferior, levando ao desenvolvimento de pneumonia e um maior comprometimento do pulmão (Krammer et al., 2018; Long et al., 2019). Os IAV são divididos em vários subtipos de acordo com o tipo de glicoproteína presente na superfície viral, denominadas, Hemaglutinina (HA) e Neuraminidase (NA), sendo os principais alvos de anticorpos capazes de neutralizar as partículas infecciosas (Shao et al., 2017). Esta diversidade de subtipos ocorre devido a eventos de deriva genética, caracterizado por mutações pontuais no genoma viral ou recombinações de RNAs entre os subtipos de IAV, ocasionando modificação nas glicoproteínas, favorecendo o surgimento de partículas virais distintas, levando à evasão de uma resposta imunológica pré-existente (Krammer et al., 2018; Long et al., 2019; Shao et al., 2017). Vários fatores podem estar associados ao desenvolvimento de quadros graves de infecção pelo vírus IAV, podendo mencionar, a infecção no trato respiratório inferior, acompanhado de uma resposta inflamatória desregulada com excesso de células do sistema imunológico, levando um comprometimento das funções vitais do órgão (Arankalle et al., 2010; Iwasaki; Pillai, 2014).

E neste sentido, a resposta imunológica do hospedeiro, desempenha um papel crucial de proteção ou patogênica durante a infecção. (Iwasaki; Pillai, 2014; Nypaver; Dehlinger; Carter, 2021). Sendo a primeira linha de defesa do organismo, a resposta inata desempenha um papel importante no reconhecimento do patógeno através de receptores específicos de reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados a dano (DAMPs), desencadeando uma série de sinalizações intracelulares, que orquestram a resposta inflamatória inicial (Gu et al., 2021; Malik; Zhou, 2020). A resposta imune inata também conta com células inatas que atuam na proteção do hospedeiro, são elas: os neutrófilos, eosinófilos e monócitos, realizando a secreção de citocinas, opsonização e degranulação no sítio de infecção; os macrófagos e células dendríticas, atuam na

fagocitose e apresentação de antígenos para os linfócitos, iniciando uma resposta adaptativa importante para expansão de células T e B e conseqüentemente a produção de anticorpos específicos (Iwasaki; Pillai, 2014; Krammer et al., 2018); Células Linfoides Inatas (ILCs) compõe a resposta imune inata e possuem um papel primordial na proteção e patogênese durante a infecção causada pelo vírus influenza. Essas células são residentes do tecido pulmonar, compondo a resposta imune inata, mediada por patógenos e componentes endógenos de stress celular com DAMPs, e quando ativadas, desempenham funções efetoras frente a estímulos, além de orquestrar a resposta imune atuando como secretoras de citocinas com potencial de modular o curso da infecção (Hartshorn, 2020; Monticelli *et al.*, 2011).

O sistema nervoso central (SNC) possui um papel importante no controle das funções fisiológicas e motoras do organismo através de vias hormonais e neuronais (Gibbons, 2019; Wehrwein; Orer; Barman, 2016). Da mesma forma, o sistema nervoso simpático, responde ao stress inibindo ou ativando funções motoras e fisiológicas no organismo através da liberação de catecolaminas. E neste sentido, os receptores beta 2 adrenérgico (ADRB2), são receptores acoplados a proteína G, que respondem a família de catecolaminas (Neto; Rascado; Bendhack, 2006). Sendo expressos em maior número nos pulmões, quando ativados promovem a broncodilatação, sendo este o motivo de ser um receptor amplamente estudado como importante alvo farmacológico, para estudos de Asma e Doença Obstrutiva Pulmonar Crônica (COPD) (Barnes, 2008; Shore; Moore, 2003). Atualmente, vem sendo demonstrado na literatura o papel imunomodulador dos ADRB2, sendo expresso em diversas células do sistema imune e desempenhando a ativação de vias de resposta a patógenos na imunidade inata (Moriyama *et al.*, 2018). Sendo assim, avaliar o papel imunomodulador do ADRB2 durante a infecção pelo IAV é de extrema importância, para entender seu papel fisiológico no organismo e assim contribuir para o desenvolvimento de estratégias de terapêuticas utilizando esta via de sinalização.

Segundo Moriyama et al., (2018), camundongos ADRB2 Knockouts infectados por *Nippostrongylus brasiliensis*, desenvolve uma resposta imunológica robusta mediada por ILC2 no intestino, favorecendo a eliminação do patógeno. No contexto de infecção viral, espera-se o desenvolvimento de uma resposta imunológica clássica antiviral mediada por células inatas linfoides do tipo 1 (ILC1), que se assemelham-se com as Th1, capazes de contribuir para o controle da infecção (Kumar *et al.*, 2021). Portanto, se infectarmos camundongos ADRB2 knockouts com o vírus IAV, estes camundongos vão apresentar maior dano tecidual e maior comprometimento do pulmão. Tendo em vista o desvio de uma resposta imunológica clássica antiviral para uma maior expansão de ILC2.

2 REFERÊNCIAL TEÓRICO

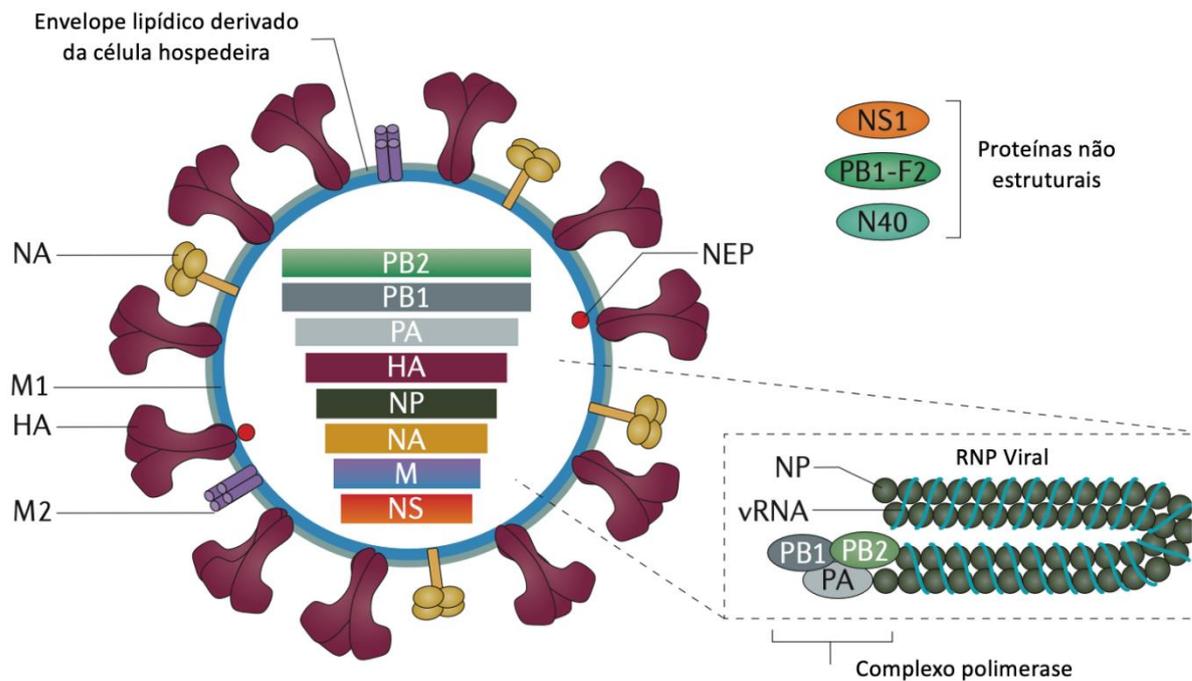
2.1. Influenza A

2.1.1. Aspectos gerais do vírus

A família *Orthomyxoviridae* é composta por quatro gêneros de vírus influenza, denominados: Influenza A, Influenza B, Influenza C e Influenza D. Dentre esses, o vírus Influenza A (IAV) é o de maior relevância clínica, podendo infectar humanos, aves, porcos, cavalos e outros animais, sinalizando um risco recorrente de eventos “*spill over*” com potencial pandêmico (Krammer *et al.*, 2018; Webster; Govorkova, 2014). Sendo que, apenas neste gênero existem cerca de 18 subtipos diferentes descritos (Wang *et al.*, 2021), que são formados devido às diversas combinações que podem ocorrer nas glicoproteínas Hemaglutinina (HA) e Neuraminidase (NA), e uma extensa possibilidade de recombinações e surgimento de partículas virais distintas (Kim; Webster; Webby, 2018; Long *et al.*, 2019).

Os vírus Influenza possui morfologia esférica ou filamentosa, medindo aproximadamente 100 e 300 nanômetros de diâmetro respectivamente (Bouvier; Palese, 2008). A partícula viral é composta por um envelope, derivado da membrana lipídica da célula hospedeira infectada, uma matriz formada pela proteína de matriz, envolvendo o genoma viral, composto por oito segmentos de RNA de fita única e polaridade negativa envolto por nucleoproteína. Este genoma viral codifica pelo menos dez proteínas virais, sendo elas as três subunidades: polimerase ácida (PA), polimerase básica 1 (PB1) e polimerase básica 2 (PB2), responsáveis pelo processo de transcrição e tradução no núcleo celular; HA, responsável pelo processo de ancoragem na célula, através da ligação com os receptores específicos; NA, que atua na liberação das partículas virais, através da remoção do ácido siálico; Nucleoproteína (NP), Proteína da matriz 1 (M1), que participa na regulação da interação da ribonucleoproteína viral, exportação nuclear e brotamento; Proteína de matriz 2 (M2), que regula e acidificação do interior da partícula viral; Proteínas não estruturais NS1 e NS2, responsáveis principalmente pela evasão do sistema imunológico, através da limitação da produção de interferons (IFNs); Nuclear export protein (NEP), que atua a exportação dos RNPs do núcleo para membrana celular (imagem 1) (Bouvier; Palese, 2008; Hale et al., 2008; Iwasaki; Pillai, 2014; Luo, 2012; Te Velthuis; Fodor, 2016).

Imagem 1: Desenho esquemático do vírus influenza A. O vírus Influenza é constituído por duas glicoproteínas, hemaglutinina (HA) e Neuraminidase (NA). No envelope viral também contém a proteína de Matriz (M1) e a proteína transmembrana de canal iônico (M2). No interior do vírus encontra-se os complexos ribonucleoproteicos (RNP) constituídos de 8 segmentos de RNA fita única e polaridade negativa.



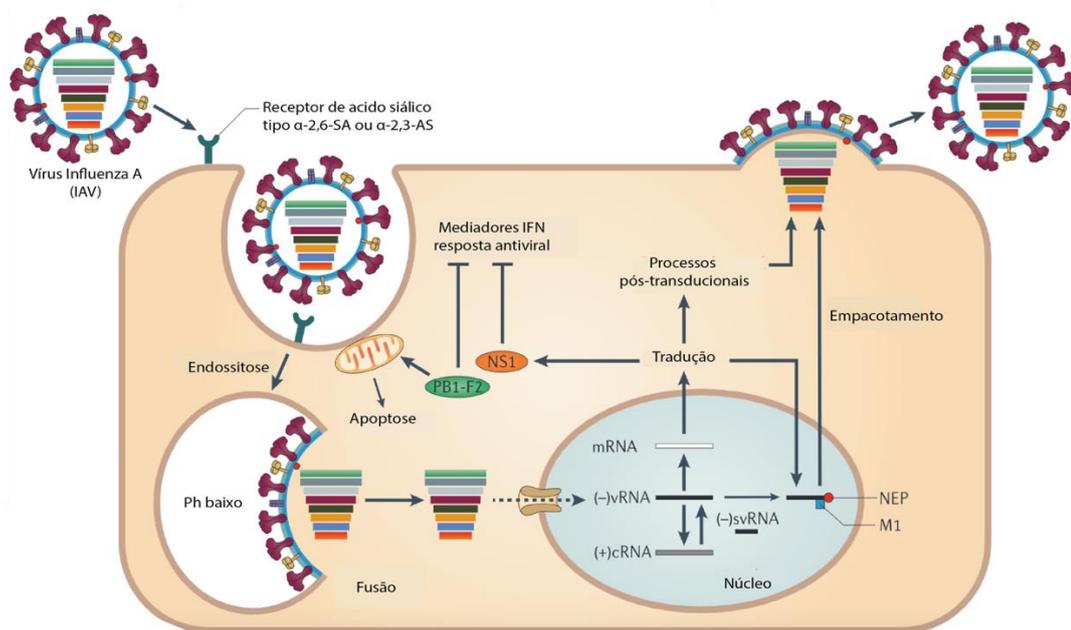
Fonte: Adaptado de Medina & García-Sastre, 2011.

2.1.2. Replicação Viral

A replicação do vírus Influenza A se inicia com o evento de ancoragem do vírus às células epiteliais do trato respiratório, através da interação e clivagem do receptor de ácido siálico (SA) do tipo α -2,6-SA ou α -2,3-SA com a glicoproteína viral HA, promovendo a internalização do vírus pelo processo de endocitose (Bouvier; Palese, 2008; Krammer *et al.*, 2018). Após internalizado, no citoplasma ocorre a acidificação do endossomo através da abertura dos canais de íons (M2), promovendo a mudança conformacional da Hemaglutinina, induzindo a fusão da membrana endossomal com o envelope viral. Esta fusão é responsável pela liberação dos oito segmentos de RNA viral (vRNPs) no citoplasma, sendo direcionados para o núcleo celular, onde ocorre o processo de transcrição e replicação (Long *et al.*, 2019; Luo, 2012). A transcrição resulta em fragmentos de mRNAs que são exportados para o citoplasma para tradução das proteínas virais (PB1, PB2 e PA) que são direcionadas ao núcleo novamente para formação dos vRNPs e (HA, HE e M2) que são transportadas pela via secretora

Trans-Golgi para a membrana plasmática. As proteínas virais NEP e M1 que estão localizadas no núcleo, se acoplam ao vRNPs e são exportados para o citoplasma, onde reciclam o endossomo e migram para membrana plasmática da célula hospedeira, onde ocorre o empacotamento dos oito segmentos de vRNPs, resultando em uma nova partícula viral. Por fim, ocorre o brotamento das novas partículas virais através da interação da NA com o SA da célula. (imagem 2) (Krammer et al., 2018; Medina; García-Sastre, 2011).

Imagem 2: Esquema do ciclo de replicação do vírus Influenza A. Inicialmente os IAV se ligam aos receptores de ácido siálico, presente na superfície celular e entram na célula através de endocitose. Posteriormente a membrana endossomal se funde com a membrana viral e ocorre a liberação do material genético do vírus no citoplasma, sendo direcionados para o núcleo para replicação e tradução das proteínas virais. Após o processo de replicação e tradução, as proteínas são transportadas através do golgi para membrana plasmática das células e os RNPs são direcionados para o mesmo local, onde ocorre o brotamento das novas partículas virais, que são liberadas através da interação da Neuraminidase com o receptor de ácido siálico.



Fonte: Adaptado de Medina & García-Sastre, 2011.

2.1.3. Infecções por Influenza

Os vírus Influenza são responsáveis por causar quadros de infecções respiratórias leves e graves. As infecções leves são restritas ao trato respiratório superior, causando

manifestações clínicas como febre, tosse, congestão nasal, dor de cabeça e fadiga. Já as infecções graves, acometem o trato respiratório inferior, possibilitando ao desenvolvimento de quadros de pneumonia, podendo levar o hospedeiro a óbito (Long et al., 2019; Medina; García-Sastre, 2011).

A infecção pelo vírus da Influenza se inicia na invasão do sistema respiratório superior através das cavidades orais e nasais, sendo combatido pelo muco que recobre epitélio nasal. Caso o vírus consiga driblar esta primeira barreira, atravessando a camada mucosa, pode ocorrer a ligação de seus receptores às células epiteliais respiratórias, às moléculas de ácido siálico e a penetração das células, através da ligação da hemaglutinina aos receptores celulares e iniciar o processo de replicação (Horimoto; Kawaoka, 2001; Luo, 2012).

Tanto a resposta inata quanto adquirida exercem um papel importante durante a infecção pelo vírus influenza. E se tratando da resposta adquirida os anticorpos mais importantes são aqueles dirigidos contra a hemaglutinina e a neuraminidase, sendo que os anticorpos anti-hemaglutinina são capazes de neutralizar as partículas virais. Já a resposta celular é dirigida preferencialmente contra proteínas mais conservadas do vírus, conferindo melhor proteção contra diferentes variantes e subtipos de vírus influenza (Arankalle et al., 2010; Davidson, 2018; Miller; Lithgow; Hoogenraad, 1999; Xiong et al., 2015).

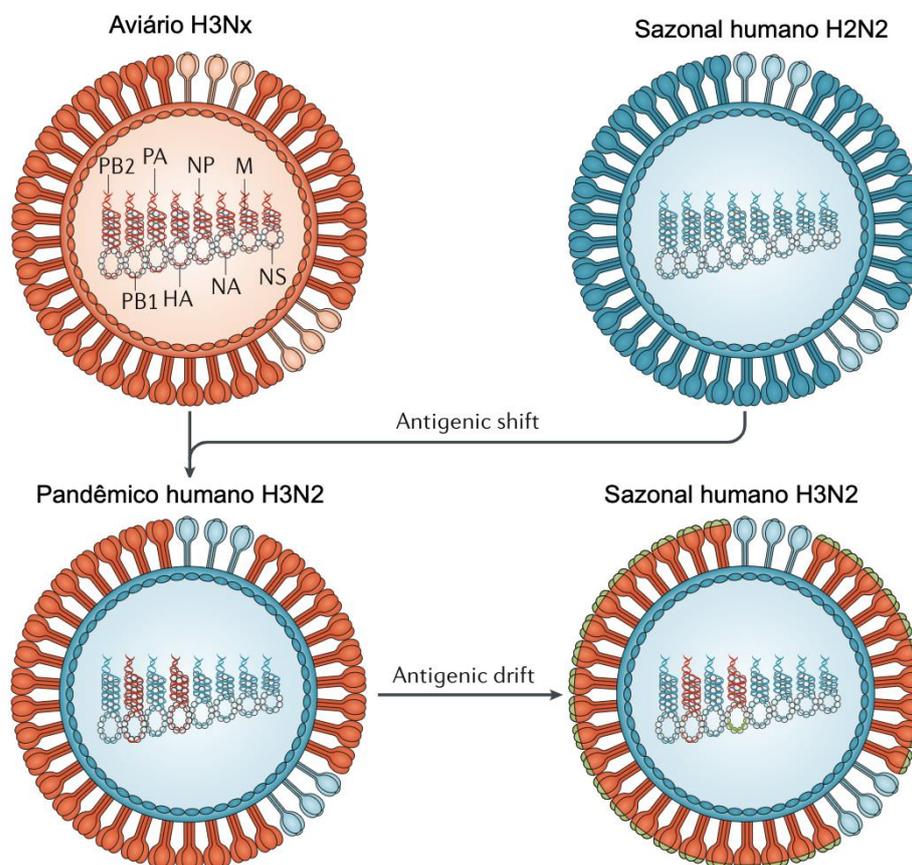
2.1.4. Variação antigênica do vírus Influenza A

Os vírus Influenza possuem dois mecanismos principais que contribuem para rápida evolução viral, que são: Deriva antigênica (*antigenic drift*) e mudança antigênica (*antigenic shift*) (imagem 3). Estas mutações podem ser responsáveis por promover a evasão do sistema imunológico, que em sua maior parte, é mediado por anticorpos específicos, adquiridos por infecções anteriores ou pela vacinação. Por tanto, o vírus influenza é considerado então um patógeno de ameaça contínua (Krammer *et al.*, 2018; Wu; Wilson, 2020)

A deriva genética (*antigenic drift*), ocorre de forma discreta e é caracterizada por mutações pontuais no genoma viral, podendo causar pequenas alterações nos principais epítomos virais. Naturalmente, durante a multiplicação, os vírus influenza sofrem mutações a todo momento, devido principalmente a ausência do mecanismo de revisão. Essas mutações proporcionadas no genoma podem resultar em: (1) partículas virais defectivas, que não conseguem se estabelecer, ou, (2) causar mutações em regiões antigênicas, que alteram os epítomos virais, resultando em partículas virais capazes de evadir o sistema imunológico de uma memória pré-existente (Kim; Webster; Webby, 2018). Este processo requer com que as vacinas

sejam atualizadas anualmente com as cepas circulantes na população (Kim; Webster; Webby, 2018; Webster; Govorkova, 2014).

Imagem 3: Esquema de variação antigênica do IAV. Eventos de “antigenic shift” ocorre através de recombinações dos RNPs virais, promovendo substituição completa do tipo de glicoproteína presente na superfície viral, resultando em uma nova partícula viral distinta. Já eventos de “antigenic drift” são caracterizados por mutações pontuais no genoma viral, promovendo pequenas modificações nas glicoproteínas presentes na superfície viral. Ambos os eventos podem causar evasão do sistema imunológico pela memória pré-existente de infecções anteriores.

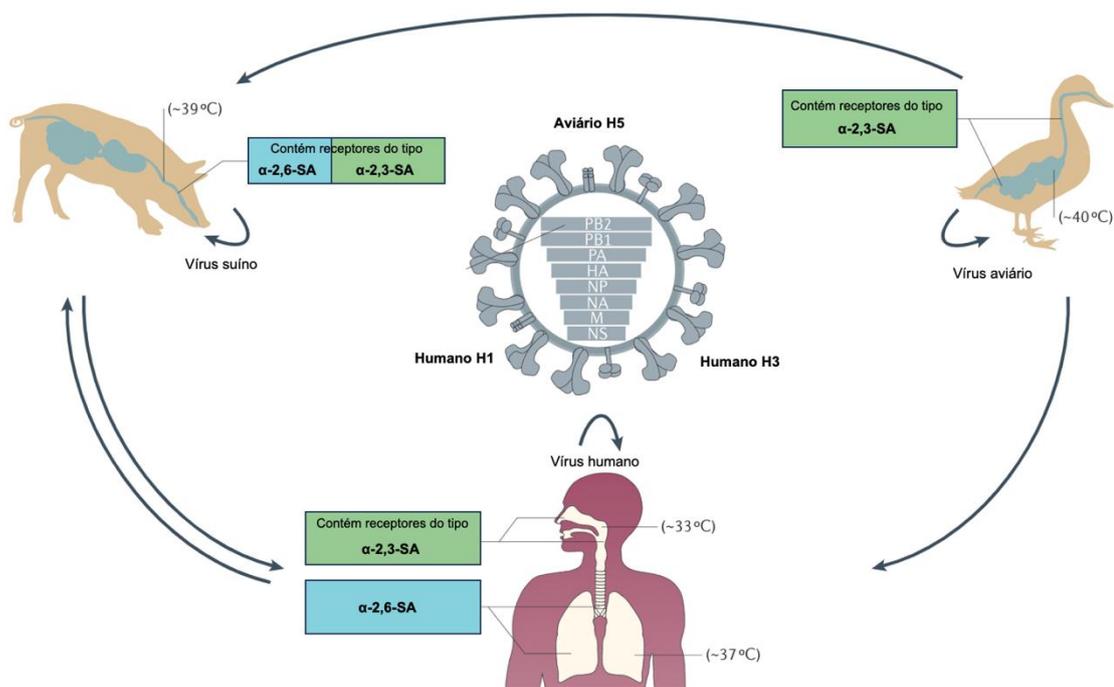


Fonte: Adaptado de Krammer, f., et al., 2018.

Já a mudança antigênica (*antigenic shift*) está associado ao genoma segmentado do IAV, possibilitando recombinações de RNPs que codificam as glicoproteínas HA e NA, proporcionando a mudança completa do tipo de glicoproteína, resultando em uma partícula viral distinta (Wu; Wilson, 2020). O IAV possui uma grande diversidade de hospedeiros possíveis, tendo relação direta com os padrões de expressão anatômica dos receptores de ácido siálico.

Suínos, possuem receptores do tipo α -2,6-SA e α -2,3-SA sendo expressos na traqueia, permitindo a ligação de diferentes subtipos de IAV no mesmo sítio, levantando a hipótese de serem potenciais reservatórios de mistura (imagem 4) (Medina; García-Sastre, 2011).

Imagem 4: Distribuição dos receptores de ácido siálico nas principais espécies hospedeiras. Os IAV têm uma afinidade pelos receptores de ácido siálico dos tipos tipo α -2,6-SA e α -2,3-AS. Aves selvagens expressam os receptores o tipo α -2,3-AS no intestino e no trato respiratório. Já suínos expressam ambos os tipos α -2,6-SA e α -2,3-AS no trato respiratório, sendo considerados assim potenciais reservatórios de misturas de subtipos de IAV. Os humanos expressam ambos os receptores, os α -2,6-AS predominantemente no trato respiratório inferior e os α -2,3-AS no trato respiratório superior, possibilitando a infecção tanto via aves, quanto de suínos.



Fonte: Adaptado de Medina & García-Sastre., 2011.

Estas mutações podem levar o surgimento de vírus com potencial pandêmico. Portanto, estão intrinsecamente relacionados a pandemia de influenza A, onde, promovem a extinção das cepas circulantes anteriormente, e se estabelecem na população de forma rápida e eficiente (Kim; Webster; Webby, 2018). Com isso, existem programas de vigilância e monitoramento do vírus influenza no mundo, onde são detectados o surgimento de novos subtipos com potenciais pandêmicos, e também, caracteriza eventos de deriva genética para

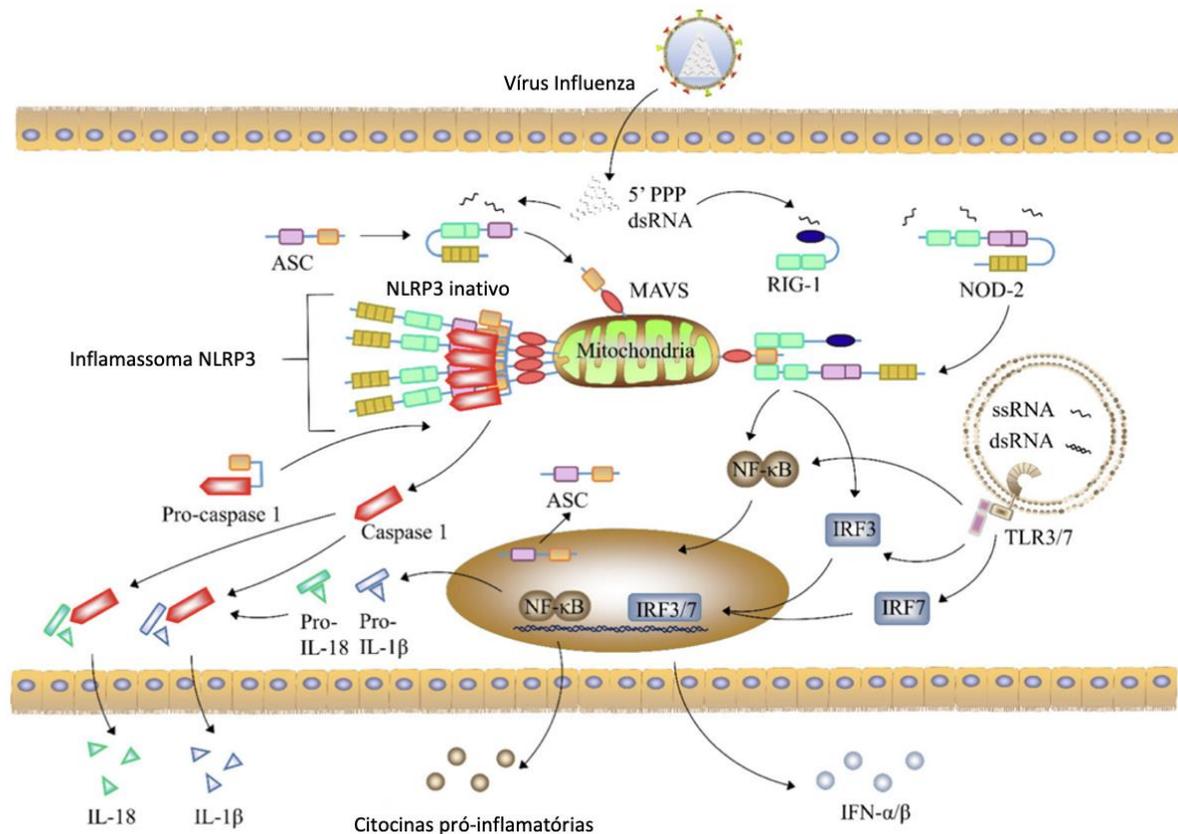
detecção das principais cepas circulantes no ano, e assim, produzir uma nova vacina. Este processo é realizado anualmente, a fim de atualizar a imunidade sobre as novas mutações (Nypaver; Dehlinger; Carter, 2021; Webster; Govorkova, 2014).

2.1.5. Resposta imune inata

O vírus IAV possui uma alta variabilidade genética, devido a diferentes possibilidades de rearranjos gênicos, que podem alterar a estrutura das principais proteínas imunogênicas do vírus, causando a evasão do sistema imunológico, principalmente no contexto de uma resposta imune adaptativa. Portanto, a resposta imune inata é um mecanismo de defesa de extrema importância no controle de infecções causadas pelo vírus da Influenza A (Bouvier; Palese, 2008; Iwasaki; Pillai, 2014; Krammer et al., 2018). O vírus Influenza é detectado através de Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs) por diferentes Receptores de Reconhecimento Padrão (PRRs), como por exemplo, Receptores do tipo toll (TLRs), RIG-I, receptores do tipo NOD, NLRP3 e ZBP1, orquestrando principalmente a produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias, como, interferons (IFN) e IL-1 β (imagem 5) (Gu *et al.*, 2021; Hartshorn, 2020).

Imagem 5: Sinalizações imunológicas desencadeadas durante a infecção pelo vírus IAV.

O sistema imune inato possui um papel importante durante infecções no organismo. Reconhecendo PAMPs e DAMPs através de receptores específicos, desencadeando uma série de sinalizações intracelulares, induzindo principalmente a secreção de citocinas pró-inflamatórias.

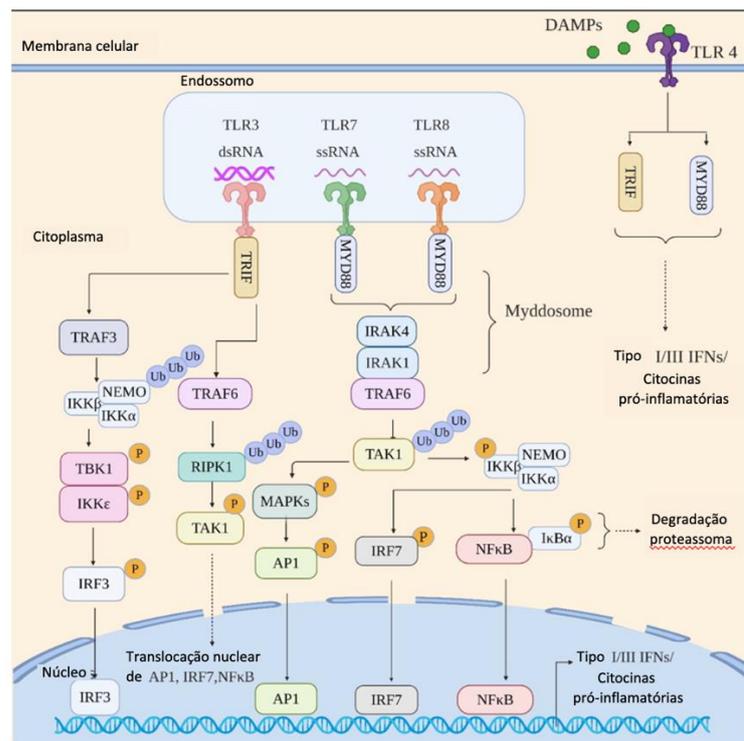


Fonte: Adaptado de Gu, Y. et al., 2021.

O RNA viral é reconhecido principalmente pelos receptores Toll dos tipos 3, 7 e 8. Os TRLs 7 e 8, ao reconhecerem seus agonistas, desencadeiam uma resposta dependente de MyD88, levando à fosforilação de quinases MAP ou IKK. Enquanto a ativação de IKK leva a ativação dos fatores NF- κ B e IRF7, e a sinalização da MAPK atua na ativação dos fatores da família AP-1 (Malik; Zhou, 2020). Já o reconhecimento por TLR 3 está ligado exclusivamente a via de sinalização TRIF, que pode resultar na ativação de IRF3 ou na ativação dos fatores NF- κ B, AP-1 e IRF7, consequentemente, diversas citocinas, como, IFN I e III, são produzidas e secretadas. Além disso, tanto a via MyD88, quanto TRIF, são ativadas após o reconhecimento de DAMPs pelo TLR3, TLR7 e TLR8, resultantes da infecção pelo IAV através de suas ligações com o receptor TLR4 (Gu *et al.*, 2021; Malik; Zhou, 2020). No contexto de uma resposta contra o IAV, o reconhecimento por TLRs 3 de células epiteliais do trato respiratório desencadeia

principalmente a produção das citocinas IL-8 e IL-6, que estão envolvidas na proteção contra infecção viral (imagem 6) (Ronan Le Goffic *et al.*, 2007)

Imagem 6: Sinalização através dos receptores do tipo Toll-like (TLR). O RNA viral é reconhecido principalmente pelos receptores TLR 3, 7 e 8, desencadeando uma série vias imunológicas induzindo produção e secreção de citocinas pró-inflamatórias. Os receptores TLR 4 podem ainda, reconhecer DAMPs extracelulares e desencadear vias imunológicas para produção de citocinas.

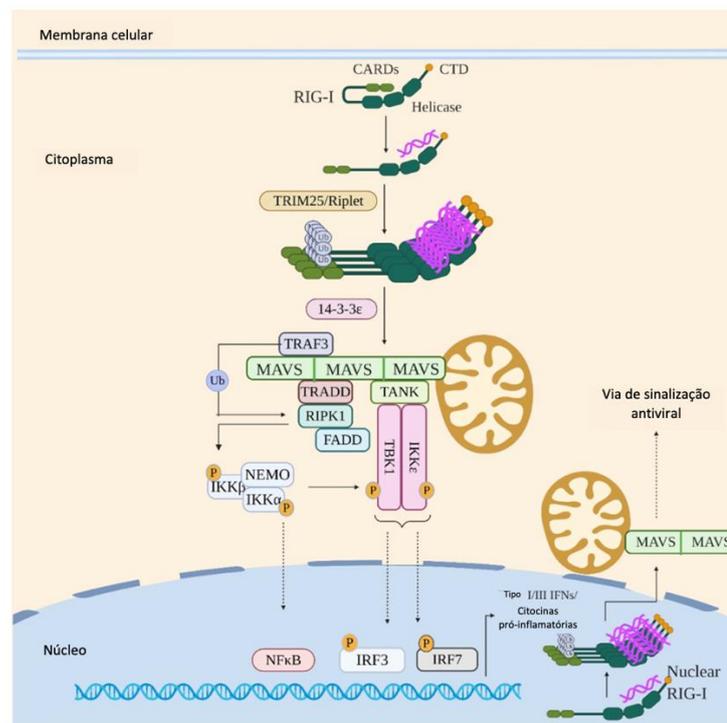


Fonte: Adaptado de Malik, G; Zhou, Y. 2020.

O receptor RIG-1, também é um importante sinalizador da infecção viral, capaz de desencadear uma cascata de sinalizações intracelulares, induzindo a produção de IFN1 e citocinas pró-inflamatórias. Ao se ligar ao RNA viral, seu domínio CARD é ubiquitinado, resultando na ativação de MAVS. Ao final da cascata, ocorre a ativação de RIPK-1, o qual ativa o complexo quinase, IKK. Este leva diretamente à ativação de NF-κB e à ativação de IRF3 e IRF7, através da fosforilação de TBK1/IKK, induzindo a produção de citocinas e interferons I e III. Apesar da localização de RIG-I ser majoritariamente no citoplasma, sua existência no núcleo contribui para o reconhecimento do genoma viral, já que este adentra o núcleo durante a replicação do vírus. Através do reconhecimento de regiões panhandle e das posteriores sinalizações, RIG-I desencadeia a estimulação de IFN e regulação da resposta imune adaptativa,

contribuindo para o controle da replicação e clearance viral (imagem 7) (Di Giorgio; Xodo, 2022; Malik; Zhou, 2020; Xu; Jin; Weng, 2022).

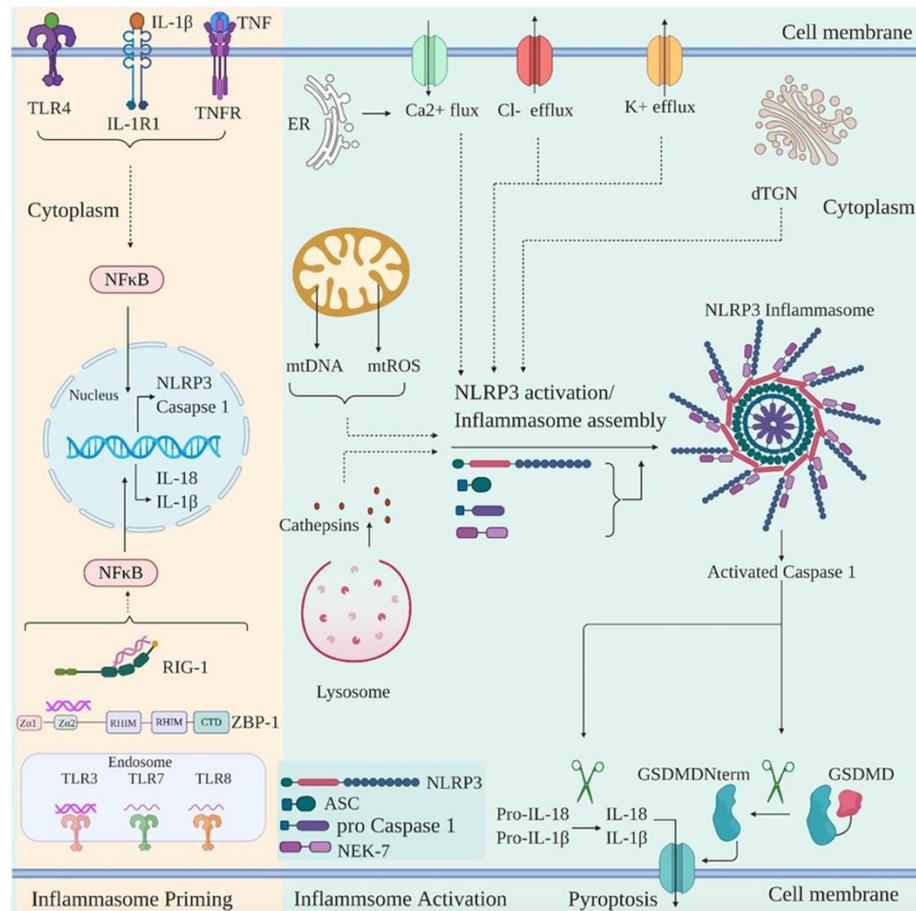
Imagem 7: Sinalização imunológica via RIG-1. Ao se ligar ao RNA viral o domínio RIG-1 é clivado levando a ativação de MAVS e conseqüentemente desencadeando a ativação de vias imunes através da interação com TBK1 e IKK. O produto desta sinalização é a indução de produção de citocinas pró-inflamatórias.



Fonte: Adaptado de Malik, G; Zhou, Y. 2020.

Por fim, a via NLRP3, pertencente a família NLR, e pode ser iniciada pelo reconhecimento dos Receptores de Reconhecimento Padrão (PRRs) ou por citocinas como TNF- α e IL- β , que induzem a ativação de NF- κ B e conseqüentemente transcrição dos genes NLRP3, IL-1 β e IL-18. Em seguida, diferentes sinais medeiam a ativação do inflamassoma, sendo algum destes o efluxo de potássio e cálcio devido à abertura de canais na membrana celular ou liberação pelo retículo endoplasmático, liberação de ROS e DNA mitocondrial resultante do rompimento da membrana mitocondrial, ruptura lisossomal e liberação de catepsinas, entre outros. A ativação de NLRP3 resulta na subsequente ativação de caspase-1. Esta é responsável por clivar pro-IL-1 e pro-IL-18 em suas formas maduras, além de clivar GSMD, o qual permeabiliza a membrana celular, induzindo piroptose (imagem 8) (Broz; Dixit, 2016; Malik; Zhou, 2020; Rathinam; Fitzgerald, 2016).

Imagem 8: Ativação da via do inflamassoma NLRP3. O complexo inflamassoma pode ser ativado por diferentes agonistas, incluindo citocinas ($\text{TNF}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$) ou através de PRRs. Desencadeando uma variedade de sinais intracelulares, levando a clivagem de pró-caspase 1 gerando a forma ativada de caspase 1, que interagem com as formas imaturas de pró- $\text{IL-1}\beta$ e pró- IL-18 clivando-as em sua forma madura.



Fonte: Adaptado de Malik, G; Zhou, Y. 2020.

2.1.6. Resposta Inata Celular

O sistema imune inato é composto por diversas células responsivas a patógenos, desencadeando uma resposta inespecífica como primeira linha de defesa. E esta rápida identificação e eliminação de patógeno caracteriza a importância e eficiência destas células no contexto de resposta imunológica. Composto as células inatas, podemos citar: macrófagos alveolares (AMs), neutrófilos, células dendríticas (DCs), células natural killer (NK), eosinófilos, monócitos e as células inatas linfoides (ILCs) (Kumar, 2020; Zhang et al., 2021).

As células linfoides inatas (ILCs) são células que compõem o sistema inato, e tem como característica a ausência de receptores de antígenos rearranjados e a produção de citocinas

(Artis; Spits, 2015). Sendo assim, são responsivas de forma inespecífica através do reconhecimento de alarminas liberadas por patógenos e componentes endógenos de stress celular, como as DAMPs, e quando ativadas, desempenham importante papel efetor de secreção de citocinas e conseqüentemente modulação do curso da infecção (Artis; Spits, 2015; Starkey *et al.*, 2019).

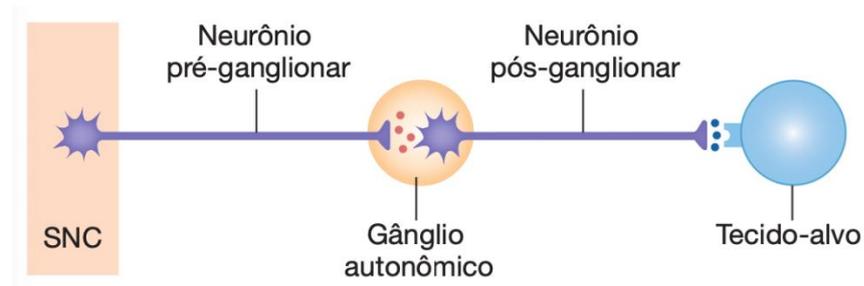
Atualmente, são descritos três grupos principais de ILCs, sendo estas: as células linfoides inatas do tipo 1 (ILC1); células linfoides inatas do tipo 2 (ILC2); células linfoides inatas do tipo 3 (ILC3). As ILC1, expressam o fator de transcrição T-bet+, e são classicamente relacionadas a infecções intracelulares (como vírus e bactérias) e em doenças crônicas, desencadeando uma resposta análoga às células CD4+ helper do tipo 1 (Th1), que se caracteriza pela produção de interferon gama (IFN-g). Já as ILC2, expressam o fator de transcrição GATA3+, e estão intrinsecamente relacionadas à resposta frente a infecções helmínticas, doenças alérgicas e asma, desencadeando uma resposta análoga às CD4+ helper do tipo 2 (Th2), que expressam citocinas como, IL-4, IL-5, IL-9 e IL-13. Por fim, as ILC3 expressam o fator de transcrição ROR γ t+, e estão relacionadas à infecções extracelulares e doenças inflamatórias crônicas, orquestrando um tipo de resposta semelhante às células CD4+ helper do tipo 17 (Th17), produzindo principalmente as citocinas IL-17 e IL-22 (Akama *et al.*, 2020; Artis; Spits, 2015; Kumar, 2020).

3.1. Sistema nervoso simpático (SNS)

O sistema nervoso autônomo é subdividido em sistema nervoso simpático (SNS) e sistema nervoso parassimpático (SNP), podendo ser diferenciados anatomicamente em função ao ponto de origem no Sistema Nervoso Central (SNC) e a localização dos gânglios autonômicos, e mesmo que enervando os mesmos órgãos, são caracterizadas com o tipo de ação vivenciado pelo organismo, e geralmente possuindo efeitos contrários uns aos outros, e conseqüentemente desencadeiam uma cascata de reações nos órgãos alvos (Gibbons, 2019; Silverthorn, 2017).

O sistema nervoso simpático está relacionado a situações de stress que preparam o organismo para “luta ou fuga”, em contrapartida, o sistema nervoso parassimpático está mais ligado a situações de tranquilidade “repouso e digestão”. Esta sinalização autonômica acontece por neurônios pré-ganglionares que fazem conexões entre o SNC e gânglios autonômicos, nestes gânglios contêm neurônio pós-ganglionares que fazem conexões com os tecidos alvo. Estes, captam estímulos sinápticos nos gânglios autonômicos e sinalizam tecidos alvos através de receptores específicos (figura 9).

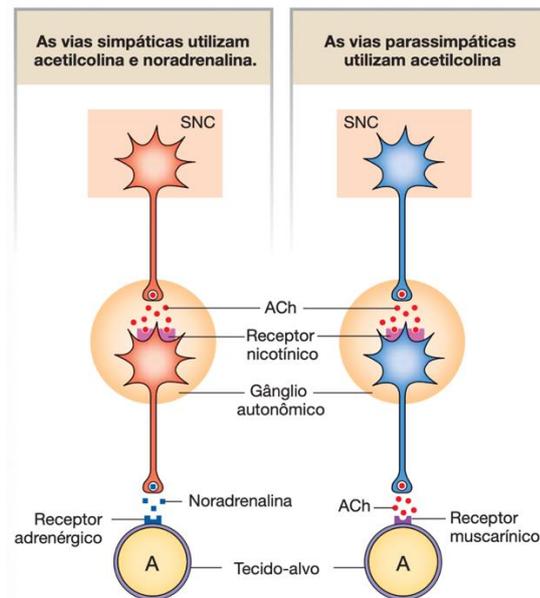
Imagem 9: Vias autonômicas de sinalização. A comunicação da via autonômica é formada por dois neurônios, um deles partindo do sistema nervoso central atingindo os gânglios autonômicos e o outro neurônio presente nos gânglios que se distende até os tecidos alvos. A comunicação entre esses neurônios acontece nos gânglios através de eventos de sinapse.



Fonte: (Silverthorn, 2017)

Esta sinalização pode ainda ser distinguida neuroquimicamente de acordo com seus neurotransmissores e receptores. Os neurônios pré-ganglionares simpáticos e parassimpáticos liberam acetilcolina como neurotransmissor, que atua nos receptores colinérgicos nicotínicos dos neurônios pós-ganglionares. Após esta sinalização, em sua maioria, neurônios pós-ganglionares sinápticos secretam noradrenalina que vai interagir com os receptores do tipo adrenérgicos. Já os neurônios pós-ganglionares parassimpáticos vão secretar acetilcolina, que vai atuar nos receptores do tipo colinérgicos muscarínicos. Vale ressaltar a existência de alguns neurônios pós-ganglionares simpáticos que podem secretar acetilcolina (figura 10) (Silverthorn, 2017; Wehrwein; Orer; Barman, 2016), neste estudo focaremos na sinalização simpática pela via adrenérgica.

Imagem 10: Receptores sistema nervoso autônomo e seus respectivos neurotransmissores. Os receptores nicotínicos são ativados através da ligação da acetilcolina nos gânglios autônômicos e respondem a sinapse com a secreção de noradrenalina (SNS) que se liga nos receptores adrenérgicos presentes nos tecidos alvo, e acetilcolina (SNP) que se liga nos receptores muscarínicos nos tecidos alvo.



Fonte: (Silverthorn, 2017).

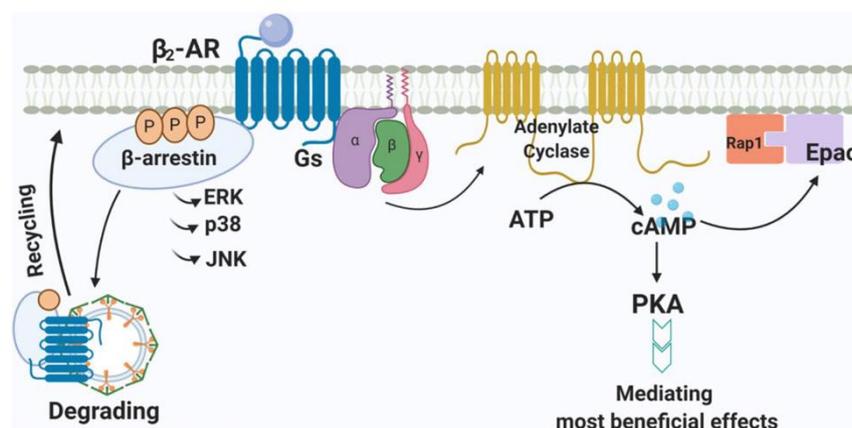
3.2. Receptores adrenérgicos

Os receptores adrenérgicos são receptores acoplados à proteína G, que respondem às moléculas da família de catecolaminas (adrenalina e noradrenalina) durante estímulos simpáticos, desempenhando diversas funções fisiológicas no organismo. Estes receptores são classificados como: (1) α -adrenérgico 1, 2 e (2) β -adrenérgico 1, 2 e 3, sendo diferenciados de acordo com suas funções fisiológicas nos tecidos (Graham, 1990). Os receptores adrenérgicos do tipo α 1 estão intrinsecamente relacionados contração do tecido, estão presentes nos vasos sanguíneos, bexiga, útero, dentre outros. Por outro lado, os receptores do tipo α 2 estão presentes nos neurônios pré-sinápticos e estão relacionados ao controle da ativação e liberação de adrenalina e noradrenalina e ativação do estímulo (Silverthorn, 2017; Velmurugan; Baskaran; Huang, 2019). Por outro lado, os receptores do tipo β -adrenérgicos são subdivididos em: (1) β 1, prevalente no miocárdio, onde, tem função de inotropismo e cronotropismo. (2) β 2, presente predominantemente nos músculos lisos, esqueléticos e nos pulmões, e é responsável pelo relaxamento muscular e pela broncodilatação. (3) β 3, que esta presente no tecido adiposo e está relacionado a lipólise (Barnes, 2008; Dorotea; Ha, 2021; Mutlu; Factor, 2008).

Os receptores ADRB2, são expressos amplamente no tecido pulmonar, estando localizados: (1) no músculo liso das vias aéreas; (2) epitélio; (3) músculo liso vascular; (4) parede alveolar. Onde, nesses sítios, desempenham um importante papel na broncodilatação, o tornando, um receptor de extrema relevância na farmacologia, sendo um dos principais alvos no tratamento de doenças alérgicas inflamatórias, principalmente no contexto de asma e doença crônica obstrutiva pulmonar (COPD), onde ocorre um maior comprometimento das vias aéreas mais comprometidas (Barnes, 2004; Ippolito; Benovic, 2021).

A cascata de sinalização ADRB2 se inicia através interação da molécula ligante no receptor ADRB2 acoplado a proteína G. Esta interação, converte o complexo da proteína G em sua forma ativada, levando a ativação de adelinato ciclase (AC) que por sua vez converte ATP em cAMP, e conseqüentemente a ativação de PKA (Proteína Kinase A), promovendo assim o relaxamento do músculo liso. Esta sinalização chega ao fim quando cAMP é degradado por fosofodiesterase (PDEs) (Dorotea; Ha, 2021; Velmurugan; Baskaran; Huang, 2019). Além disto, o acoplamento β -arrestina medeia a internalização do receptor para posterior reciclagem ou degradação do mesmo (Dorotea; Ha, 2021) (imagem 11).

Imagem 11: Sinalização adrenérgica. A sinalização adrenérgica ocorre, a partir da ligação da molécula ligante ao receptor, iniciando uma cascata de sinalização intracelular que resulta principalmente no relaxamento da musculatura lisa.



Fonte: adaptado de (Dorotea; Ha, 2021)

Respondendo à família de catecolaminas, os receptores ADRB2 podem ser ativados por moléculas clássicas de adrenalina e noradrenalina liberadas no organismo em momentos de stress fisiológicos pelo sistema nervoso simpático. E também, podem ser ativados por moléculas agonistas que podem possuir curta ou longa duração, sendo amplamente utilizados

na farmacoterapia no contexto de doenças. Antagonistas também são utilizados, contudo, estas moléculas vão atuar na inibição da ação desencadeada pelo agonista (Peter. J. Barnes, 1999).

Inalação de agonistas do ADRB2 são usualmente utilizados (por prescrição médica) para desobstrução das vias aéreas em adultos e crianças (Ippolito; Benovic, 2021). A princípio, foi descoberto o primeiro agonista de ADRB2, sendo não seletivo, e neste primeiro momento era amplamente utilizado no tratamento de asma. Posteriormente descrita a epinefrina, albuterol, fenoterol e terbutalina, com potencial terapêutico para asma aguda, contudo, estes antagonistas possuíam uma curta ação, atuando cerca de apenas 4/6 horas, sendo assim, considerados menos eficazes no tratamento. Posteriormente, foram sendo descritos agonistas mais eficientes como, formoterol, salmeterol e arformoterol que possuíam um potencial de ação de 12 horas (Barnes, 2013; Velmurugan; Baskaran; Huang, 2019).

Atualmente, vem sendo descrito na literatura, o papel dos receptores ADRB2 atuando como imunomodulador no organismo, sendo demonstrado como um regulador negativo de ILCs no contexto de infecção helmíntica, e *in vitro* em células imunes adaptativas e inatas, podendo intervir na resposta imunológica do organismo modulando o curso da infecção (Johnson, 2002; Moriyama *et al.*, 2018; Sanders, 2012).

4 OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Investigar a relevância e o papel da sinalização adrenérgica sobre o sistema imunológico por meio do receptor ADRB2 durante o curso da infecção pelo vírus influenza A.

4.2. Objetivos específicos

- Analisar a influência do ADRB2 em parâmetros respiratórios de camundongos infectados;
- Determinar o perfil de resposta imunes no BAL de camundongos infectados;
- Examinar a influência do ADRB2 na susceptibilidade e sobrevivência de camundongos desafiados com o vírus A/PR/8/34;
- Avaliar o dano pulmonar causado pela infecção do vírus Influenza em camundongos;
- Avaliar a produção de anticorpos específicos e mediadores inflamatórios em camundongos desafiados com o vírus A/PR/8/34;
- Identificar a carga viral pulmonar em camundongos infectados.

5 METODOLOGIA

5.1. Cultivo celular

Células MDCK (*Madin-Darby canine kidney cells*) foram cultivadas em frascos de cultivo celular em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), completo com alta concentração de glicose (DMEM High Glucose, 4500 mg/L, SIGMA) suplementado com bicarbonato de sódio (SIGMA), HEPES (SIGMA), 1% de penicilina e estreptomicina (SIGMA) e com 10% de soro fetal bovino (SFB) (GILBICO), atingindo um pH 7,2. A cultura celular foi mantida á 37° sob 5% de CO₂.

5.2. Utilização e inspeção de animais

O projeto foi submetido a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da instituição e aprovado sob a licença LW29.20. Camundongos da linhagem C57BL/6 e B2AR knockout (ADRB2^{-/-}) de 8 a 12 semanas de idade foram obtidos do Biotério de Produção (BIOP) do Instituto de Pesquisa René Rachou e mantidos sob condições padrão recomendadas pela instituição. Os animais foram monitorados rotineiramente durante a realização dos experimentos. Além disso os animais foram submetidos ao enriquecimento ambiental das gaiolas, a fim de garantir o mínimo de stress e proporcionando o bem-estar destes animais.

5.3. Infecção dos animais: Mortalidade A/PR/8/34

Camundongos C57BL/6 e ADRB2^{-/-} knockout machos e fêmeas de 8 a 12 semanas foram anestesiados por via subcutânea com 80 a 100 µL/animal de uma solução de PBS (1x, pH 7.4, sem adição de antibióticos) contendo 1,4 mg/mL de cloridrato de xilazina (Sytenc) e 10,3 mg/mL de cloridrato cetamina (Sytenc) disponibilizadas no Biotério de Experimentação.

Dez camundongos C57BL/6 e oito Adrb2^{-/-} knockout receberam por via intranasal a dose de 250 PFU do vírus A/PR/8/34, diluídos em 40 µL de PBS e os respectivos controles (dois animais) receberam o mesmo volume de PBS. Após as inoculações os animais foram mantidos sob observação até que se recuperassem completamente da ação do anestésico. Os camundongos foram acompanhados ao longo de 15 dias e mensurados a perda/ganho de peso e eventos de mortalidade.

Tabela 1: Protocolo de infecção do experimento de desafio: Camundongos selvagens e camundongos Knockouts para o receptor ADRB2 foram infectados por via intranasal (IN) com 250 PFU do vírus A/PR/8/34 e seus respectivos controles foram inoculados PBS.

PROTOCOLO DE INFECÇÃO DESAFIO A/PR8/34				
GRUPO	IDENTIFICAÇÃO	INÓCULO	Nº	VIA
1	C57BL/6	PBS	2	IN*
2	C57BL/6	FLU	10	IN*
3	ADRB2-/-	PBS	2	IN*
4	ADRB2-/-	FLU	8	IN*

5.4. Infecção dos animais: Avaliação 7 DPI

Camundongos C57BL/6 e ADRB2-/- knockout machos e fêmeas de 8 a 12 semanas foram anestesiados por via subcutânea com 80 a 100 µL/animal de uma solução de PBS (1x, pH 7.4, sem adição de antibióticos) contendo 1,4 mg/mL de cloridrato de xilazina (Sytenc) e 10,3 mg/mL de cloridrato cetamina (Sytenc) disponibilizadas no Biotério de Experimentação.

Oito camundongos C57BL/6 e oito ADRB2-/- knockout receberam por via intranasal a dose de 250 PFU do vírus A/PR/8/34, diluídos em 40 µL de PBS e os respectivos controles (seis animais) receberam o mesmo volume de PBS. Após as inoculações os animais foram mantidos sob observação até que se recuperassem completamente da ação do anestésico. Os camundongos foram acompanhados ao longo de sete dias e mensurados a perda/ganho de peso e eventos de mortalidade. Após o período, os animais foram submetidos ao experimento de mecânica pulmonar eutanasiados, e assim coletado: BAL, soro e pulmão para posteriores análises.

Tabela 2: Protocolo de infecção do experimento de cinética: Camundongos selvagens e camundongos Knockouts para o receptor ADRB2 foram infectados por via intranasal (IN) com 250 PFU do vírus A/PR8/34 e seus respectivos controles foram inoculados PBS.

PROTOCOLO DE INFECÇÃO CINÉTICA A/PR8/34				
GRUPO	IDENTIFICAÇÃO	INÓCULO	Nº	VIA
1	C57BL/6	PBS	6	IN*
2	C57BL/6	FLU	8	IN*
3	ADRB2-/-	PBS	8	IN*
4	ADRB2-/-	FLU	6	IN*

5.5. Coleta de lavado bronco-alveolar (BAL)

O BAL foi coletado por meio da introdução de uma cânula (1,7 mm) acoplada em uma seringa de 1,0 mL na traqueia dos camundongos. Os pulmões foram lavados duas vezes com 1 mL de PBS gelado. O líquido recuperado foi mantido no gelo até centrifugação (180 x g por 10 minutos a 4 C). O pellet de células formado após centrifugação, foi utilizado para contagem total de leucócitos e citometria de fluxo.

5.6. Mensuração de proteínas no BALF

Os níveis de proteínas totais no BALF foram mensurados utilizando o kit Bio- Rad Protein Assay®, conforme instruções do fabricante. O ensaio é fundamentado no método de Bradford, de modo que adicionados 20 µL da amostra em 180 µL do reagente. Após 5 minutos de incubação os valores de absorbância são lidos em espectrofotômetro (595 nm) e comparados com a curva padrão. A curva padrão é preparada a partir da diluição seriada (1:2) de BSA, onde o primeiro ponto da curva tinha concentração de 2 mg/mL e o último ponto 0,063 mg/mL.

5.7. Avaliação da carga viral nos pulmões

Para mensuração da carga viral no pulmão dos animais, as amostras foram submetidas a maceração (50 hertz por 2 minutos) em solução Inibidora de protease, após a maceração as amostras foram centrifugadas por 10 min a 6.500g a 4° C. Após a centrifugação as amostras foram alíquotadas e congeladas a -80° C.

As alíquotas foram diluídas sucessivamente em meio DMEM Low Glucose. Em seguida, as monocamadas de células MDCK em placas de cultura (seis poços) foram infectadas com 400 µL das diluições e incubadas em estufa com CO₂ durante uma hora para adsorção,

sendo homogeneizadas a cada 10 minutos. Após esse período, foram adicionados 4 mL de meio de cultura DMEM Low Glucose suplementado com 0,3% de BSA, 1µg/mL de tripsina e 1% de agarose. As placas foram incubadas a 37°C e 5% de CO₂ por 72 horas. Após a incubação as placas foram fixadas e coradas com uma solução de formaldeído tamponado contendo cristal violeta proporcionando a visualização e contagem das placas de lise formadas na monocamada.

5.8. Avaliação da mecânica respiratória

Sete dias após a inoculação viral os camundongos foram anestesiados com uma injeção subcutânea de Ketamina (8,5 mg/kg) e Xilazina (130 mg/kg) para manter a respiração espontânea durante a anestesia. A profundidade anestésica foi avaliada por meio da presença ou ausência de sinais como reflexo da cauda, reflexo palpebral e corneal e das frequências cardíaca e respiratória. Os camundongos anestesiados foram desinfetados com solução de etanol 70% para incisão na pele e separação da glândula submaxilar e a camada muscular que o recobria. Foi realizado um corte entre dois anéis de cartilagem da traqueia em seu terço superior próximo a laringe para adequada inserção da cânula (1,7 mm) e adequação na câmara, com superfície aquecida, para manter a temperatura corpórea, no pletismógrafo acoplado ao software que usa a pressão negativa para impulsionar a expiração forçada (Forced Pulmonary Maneuver System®, Buxco Research Systems, Wilmington, North Carolina USA). Durante o procedimento o animal foi alinhando ao ventilador, garantindo que a cânula traqueal estivesse no mesmo nível do ventilador para evitar oclusão da cânula ou torção traqueal. Esse experimento mensurou diretamente o fluxo de ar e pressão pulmonar para computar a resistência e complacência pulmonar dos grupos experimentais.

5.9. Citometria de Fluxo

As células recuperadas do BAL do camundongos infectadas, foram divididas para possibilitar a avaliação de dois painéis distintos de marcação celular por citometria de fluxo, um linfoide (gráfico 1) e o outro mieloide (gráfico 2). Desta forma, a análise do perfil fenotípico das células imunes nos pulmões foi realizada empregando anticorpos monoclonais conjugados a diferentes fluorocromos.

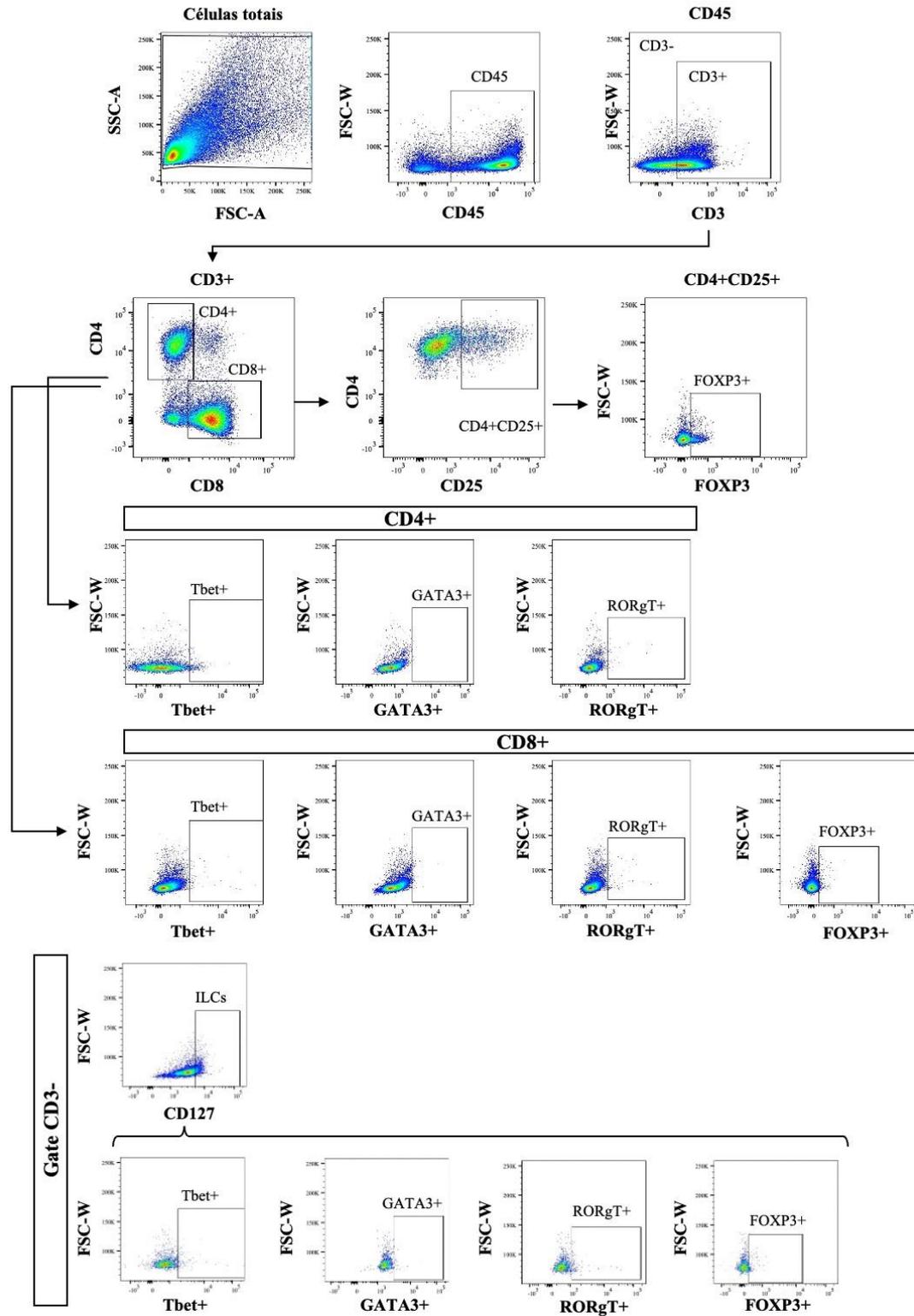
Painel de marcação Linfoide:

- ILC1: lin (CD3, CD4, CD8, CD14, CD16, CD19, CD11c, FceR1a)-CD45+cKit+IL7Ra+Tbet+ (IL12R+)

- ILC2: lin (CD3, CD4, CD8, CD14, CD16, CD19, CD11c, FceR1a)-CD45+cKit+IL7Ra+ GATA3+ (T1/ST2+)
- ILC3: lin (CD3, CD4, CD8, CD14, CD16, CD19, CD11c, FceR1a)-CD45+cKit+IL7Ra+RORgT+
- Th1: CD3+CD4+Tbet+
- Th2: CD3+CD4+GATA3+T1/ST2+
- Th17: CD3+CD4+ ROR γ T+
- Macrófagos: Mac3+

Estratégia de Gate: Células Linfoides

Gráfico 1: Estratégia de gate para citometria de células linfoides no BAL de camundongos infectados pelo Vírus A/PR/8/35. As setas indicam o sentido da estratégia de análise para a segregação de diferentes subpopulações celulares.



5.10. Avaliação de citocinas solúveis por CBA (Cytometric Bead Array)

O ensaio CBA utiliza microesferas fluorescentes para mensurar simultaneamente diversas citocinas, empregando pequenos volumes de amostra. Para isso, alíquotas de 26 μL de macerado de pulmão (puro), 27 μL dos padrões de citocinas, submetidos à diluição seriada (razão 1:2) em diluente G (“Top Standard” – 5.000pg/mL, 1:2 - 2500pg/mL, 1:4 - 1250pg/mL, 1:8 - 625pg/mL, 1:16 - 312,5pg/mL, 1:32 - 156pg/mL, 1:64 - 80pg/mL, 1:128 - 40pg/mL e 1:256 - 20pg/mL) e 27 μL de diluente G (Controle Negativo), foram transferidos para placa de 96 poços (DB). Em seguida, a cada poço foram adicionados 3 μL de cada esfera de captura com diferentes intensidades de fluorescência e conjugadas a anticorpos monoclonais anticitocinas e 17 μL do reagente de detecção B, que corresponde a um coquetel de anticorpos anticitocinas murinas conjugadas com PE. As placas foram incubadas por 3h sob agitação leve, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após incubação, as esferas de captura foram lavadas com 160 μL /poço da solução de lavagem F, as placas centrifugadas 200xg por 10min a 18° C e o sobrenadante descartado. Por fim, as esferas foram ressuspensas em 200 μL de reagente F e um total de 2.000 eventos foram adquiridos no BD FACSVerserTM e analisados no software FCAP Array.

5.11. Detecção de anticorpos séricos específicos

Para determinar o título de anticorpos induzidos contra o vírus influenza, amostras de sangue e BAL foram colhidas, 7 dias após a infecção, e centrifugadas a aproximadamente 700 x g durante 10 min a 18° C para obtenção do soro. Posteriormente, os anticorpos específicos foram detectados utilizando o método imunoenzimático (ELISA) indireto. Assim, microplacas de poliestireno de 96 poços (Nunc MaxiSorpTM - Thermo ScientificTM) foram sensibilizadas “overnight” a 4 °C com 0,5 μg de vírus A/PR/8/34 purificado, em tampão carbonato/bicarbonato (0,1 M pH 9.6). No dia seguinte, as placas foram lavadas três vezes com PBS-T (PBS pH 7.4 contendo 0,05% de Tween-20) e foram bloqueadas com solução de bloqueio (PBS contendo 1% de albumina de soro bovino), durante 1 hora a 37° C. Posteriormente, as placas foram novamente lavadas três vezes com PBS-T, 50 μL de soro de todos os grupos foram adicionados aos poços em duplicata e as placas incubadas durante 1 hora a 37° C. Após quatro lavagens com PBS-T, foram adicionados 50 μL de anticorpo de camundongo conjugado à peroxidase e a placa novamente incubada a 37° C, durante 2 horas. Em seguida, as placas foram lavadas 4 vezes com PBS-T e a reação foi revelada com 50 μL solução de revelação contendo o substrato 3,3,5,5-tetra metil benzidina (50 μL de TMB 10 mg/mL e 15 μL de H₂O₂ 3% em 5 mL de tampão citrato-fosfato 0,1 M pH 5,0), durante 15

minutos. Por fim, a reação foi interrompida com 25 μ L de solução de ácido sulfúrico 1N e a absorvância foi determinada a 450 nm em leitor de placas (Thermo Scientific- Multiskan™ GO).

5.12. Análises histopatológicas

Para as análises histopatológicas, realizada em colaboração, o lobo esquerdo dos pulmões foi fixado em solução tamponada de formaldeído a 10%, conforme mencionado. Os tecidos foram processados e embebidos em parafina em equipamento automatizado para então ser realizados os cortes de 0,5 micrômetro nos blocos de parafina para confecção das lâminas histológicas, que foram coradas com hematoxilina e eosina (H&E). Os tecidos foram avaliados de acordo com os seguintes parâmetros: a) Vias aéreas (brônquios e bronquíolos) - descamação/destruição epitelial, edema e congestão, hemorragia, infiltrado inflamatório, metaplasia escamosa, membrana hialina; b) Parênquima pulmonar (alvéolos) – edema e congestão, hemorragia alveolar, infiltrado inflamatório septal, infiltrado inflamatório alveolar, trombose e membrana hialina.

5.13. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando os programas Excel (Microsoft) para tabulação e organização dos dados obtidos nos experimentos, para a plotagem dos gráficos e análises estatísticas, será utilizado o GraphPad Prism 10.0.0 (GraphPad Software, Inc. San Diego, CA, USA), onde os resultados foram submetidos a testes de variância e múltiplas comparações.

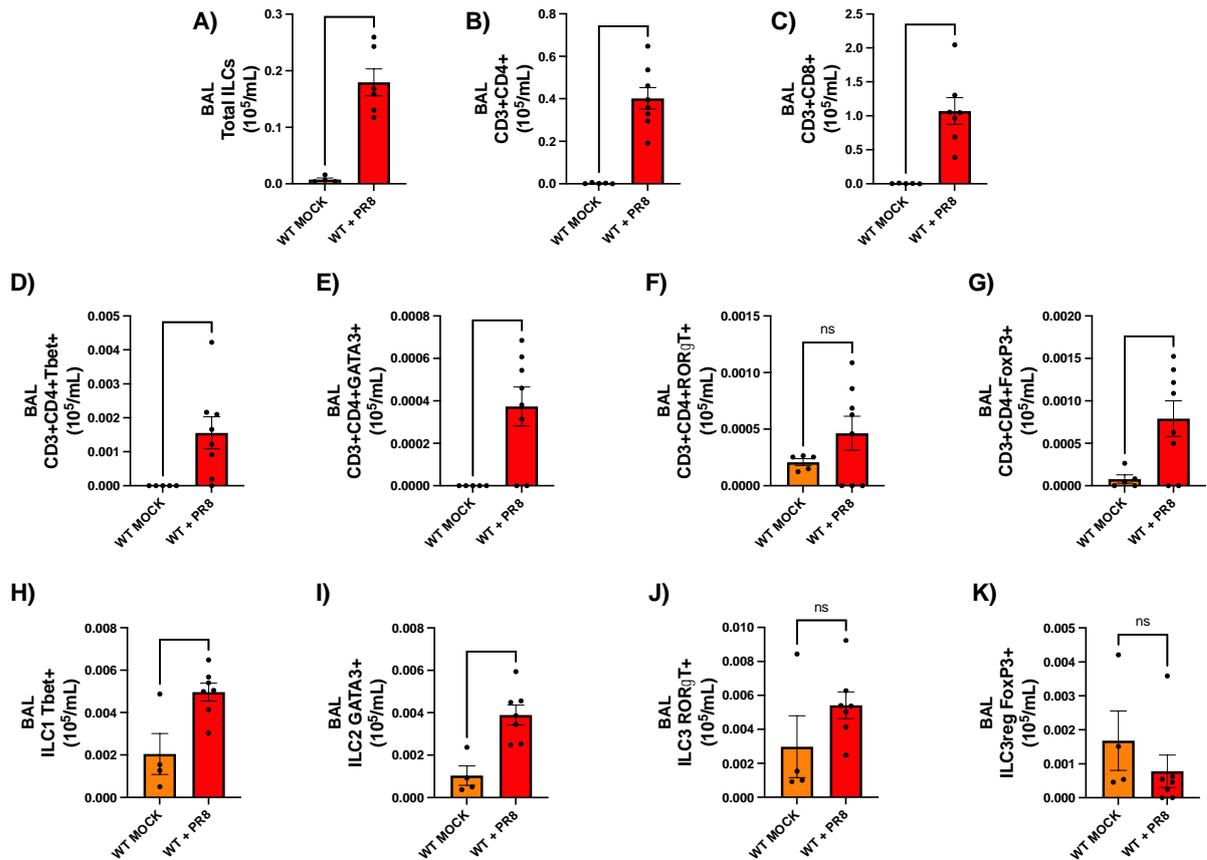
6. RESULTADOS

6.1. Caracterização da resposta imune linfocitária inata e adaptativa frente ao vírus Influenza A.

Através da análise utilizando a técnica de citometria, realizamos a caracterização do perfil de células linfoides inatas (ILCs) presente no BAL de camundongos selvagens infectados pelo vírus Influenza A, e no grupo controle que recebeu inóculo de PBS. Observamos que os camundongos selvagens infectados, apresentaram maior número de ILCs totais $0,1789 \times 10^5$ (mL) quando comparados com o grupo controle $0,0042 \times 10^5$ (mL) (figura 1 - A). E de maneira semelhante, um aumento significativo das subpopulações de CD4+ $0,4020 \times 10^5$ (mL) e CD8+ $1,0706 \times 10^5$ (mL) comparados com o grupo controle que apresentou $0,0024 \times 10^5$ (mL) e $0,0050 \times 10^5$ (mL) respectivamente (figura 1 - B e C).

Sabendo da existência de subpopulações de ILCs de acordo com seus fatores de transcrição específicos, realizamos a caracterização destas subpopulações através da marcação dos seguintes fatores transcricionais: Tbet+ para ILC1, GATA3+ para ILC2, RORgT+ para ILC3 e FoxP3+ para ILCreg. Com isso, foi possível observar que os camundongos selvagens infectados, desenvolvem uma resposta imune mediada por ILC1 e ILC2. Caracterizado pelo aumento significativo destas populações celulares $0,0049 \times 10^5$ (mL) e $0,0038 \times 10^5$ (mL) respectivamente, quando comparado com o grupo controle $0,0020 \times 10^5$ (mL) e $0,0010 \times 10^5$ (mL) (figura 1- H e I). Podemos observar também, a expansão significativa de células Th1 $0,0015 \times 10^5$ (mL), Th2 $0,003 \times 10^5$ (mL) e Treg $0,0007 \times 10^5$ (mL), quando comparado com o grupo controle, onde não foi encontrado a presença destes tipos celulares (figura 1- D, E e G).

Figura 1: Caracterização do perfil de células linfoides inatas no BAL de camundongos selvagens infectados com o vírus influenza A. Grupo de oito camundongos selvagens infectados com 250 PFU do vírus A/PR/8/34 e seis animais controles (PBS) foram monitorados por sete dias, após este período foram coletados o BAL. As células foram marcadas com os marcadores de interesse que caracterizava o painel de células linfoides e lidas em citômetro de fluxo. O teste one-way ANOVA foi aplicado seguido de pós-teste de Tukey's.



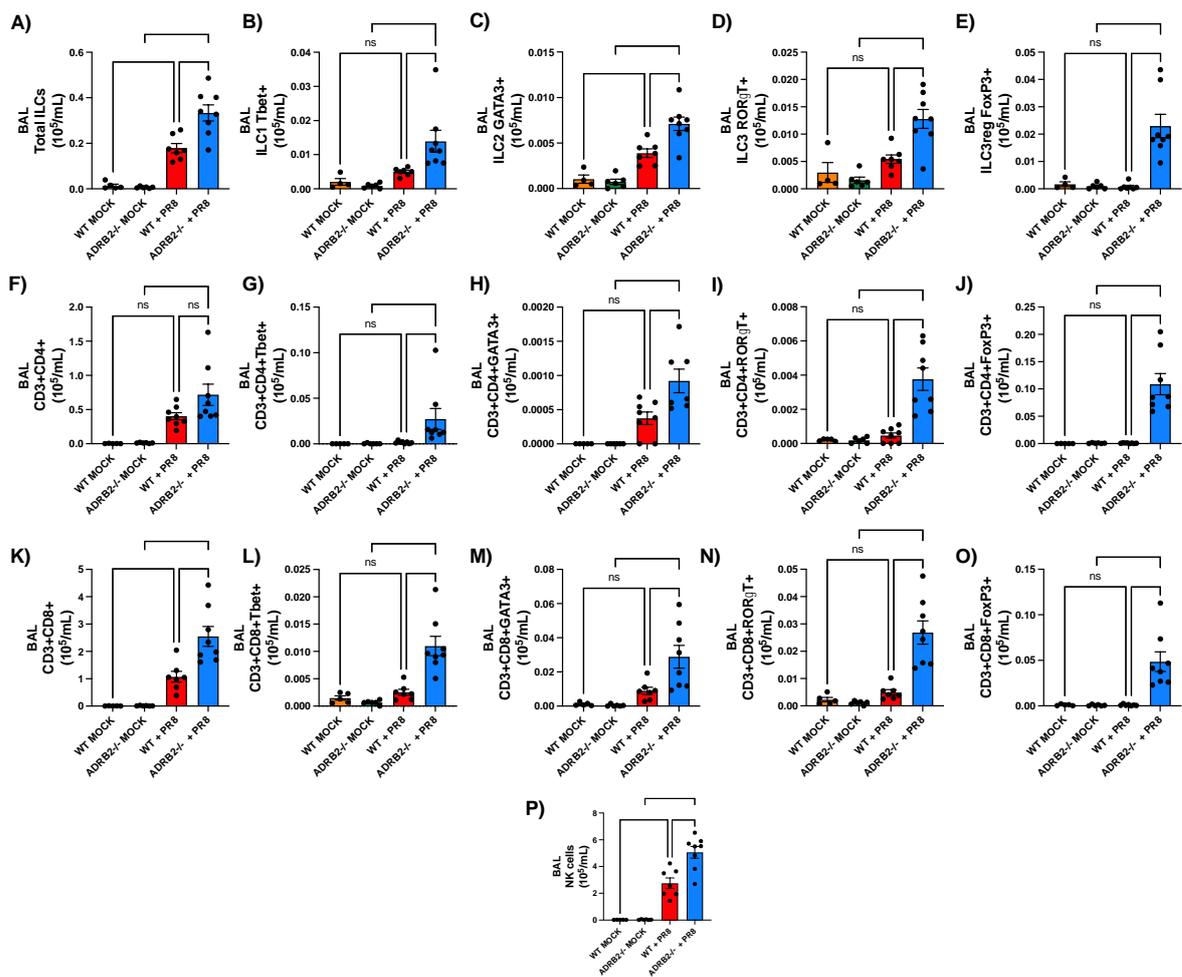
6.2. Avaliação do impacto causado pela deficiência em ADRB2 sobre o perfil de células linfoides durante infecção pelo vírus Influenza A.

As células linfoides inatas possuem um importante papel na modulação da resposta imune de forma inespecífica. Tendo isso em vista, utilizando a técnica de citometria de fluxo, caracterizamos o perfil de células inatas no BAL dos camundongos infectados com vírus A/PR/8/34. Para avaliar o impacto causado pela deficiência em ADRB2 sobre o perfil de células linfoides inatas durante infecção pelo vírus Influenza A, utilizamos camundongos ADRB2^{-/-}. De forma geral, observamos que, camundongos ADRB2^{-/-} possuem uma maior expansão de ILCs totais $0,3335 \times 10^5$ (mL) quando comparado com o grupo selvagem $0,1789 \times 10^5$ (mL) (figura 2 - A). Da mesma forma, os camundongos ADRB2^{-/-} apresentaram uma expansão

significativamente maior $2,5487 \times 10^5$ (mL) de células TCD8⁺ quando comparado com o grupo de camundongos selvagens $1,0706 \times 10^5$ (mL) (figura 2 - K). Por outro lado, não foi observado diferença estatística entre os grupos na expansão de células TCD4⁺ totais (figura 2 - F). Nossos resultados mostraram uma expansão significativa de células natural killers nos camundongos ADRB2^{-/-} $5,0644 \times 10^5$ (mL) quando comparado com o grupo de camundongos selvagens $2,7541 \times 10^5$ (mL) figura x O).

Ao analisarmos as subpopulações de ILCs presentes no BAL, observamos que a ausência do receptor ADRB2^{-/-} expande todas as células linfoides inatas, ILC1 $0,0139 \times 10^5$ (mL), ILC2 $0,0071 \times 10^5$ (mL), ILC3 $0,0127 \times 10^5$ (mL) e ILCreg $0,0229 \times 10^5$ (mL), quando comparado com o grupo de camundongos selvagens $0,0049 \times 10^5$ (mL), $0,0038 \times 10^5$ (mL), $0,0054 \times 10^5$ (mL) e $0,0000 \times 10^5$ (mL) respectivamente (figura 2 - B, C, D e E). Observamos também, a expansão significativa das populações de células Th1 $0,0273 \times 10^5$ (mL), Th2 $0,0009 \times 10^5$ (mL), Th17 $0,0037 \times 10^5$ (mL) e Treg $0,1089 \times 10^5$ (mL) nos camundongos ADRB2^{-/-} quando comparado com os camundongos selvagens $0,0021 \times 10^5$ (mL), $0,0003 \times 10^5$ (mL), $0,0004 \times 10^5$ (mL), $0,0013 \times 10^5$ (mL) respectivamente (figura 2 - G, H, I e J). De maneira similar, também ocorreu expansão de células TCD8⁺ Tbet⁺ $0,0109 \times 10^5$ (mL), TCD8⁺ GATA3⁺ $0,0288 \times 10^5$ (mL), TCD8⁺ RORgT⁺ $0,0268 \times 10^5$ (mL) e TCD8⁺ FoxP3⁺ $0,0484 \times 10^5$ (mL) em camundongos ADRB2^{-/-}, comparados com os camundongos selvagens $0,0025 \times 10^5$ (mL), $0,0089 \times 10^5$ (mL), $0,0049 \times 10^5$ (mL) e $0,0005 \times 10^5$ (mL) respectivamente (figura 2 - L, M, N e O). Curiosamente observamos uma proporção visivelmente significativa na expansão de ILCreg nos camundongos ADRB2^{-/-} $0,0229 \times 10^5$ (mL) quando comparados ao grupo de camundongos selvagens $0,0005 \times 10^5$ (mL) (figura 2 - E, J e O). Por fim, observamos um aumento significativo de células NK no BAL dos camundongos ADRB2^{-/-} $5,0644 \times 10^5$ (mL), quando comparado com os camundongos selvagens $2,7541 \times 10^5$ (mL) (figura 2 - P).

Figura 2: Caracterização do perfil de células linfoides inatas no BAL de camundongos infectados com o vírus influenza A. Grupo de oito camundongos selvagens e 8 camundongos knockouts para o receptor ADRB2 infectados com 250 PFU do vírus A/PR/8/34 e seis animais controles de cada grupo (PBS) e monitorados ao longo de sete dias, ao final do período, foram coletados o BAL. As células foram marcadas com os marcadores de interesse que caracterizava o painel de células linfoides e lidas em citômetro de fluxo. O teste one-way ANOVA foi aplicado seguido de pós-teste de Tukey's.



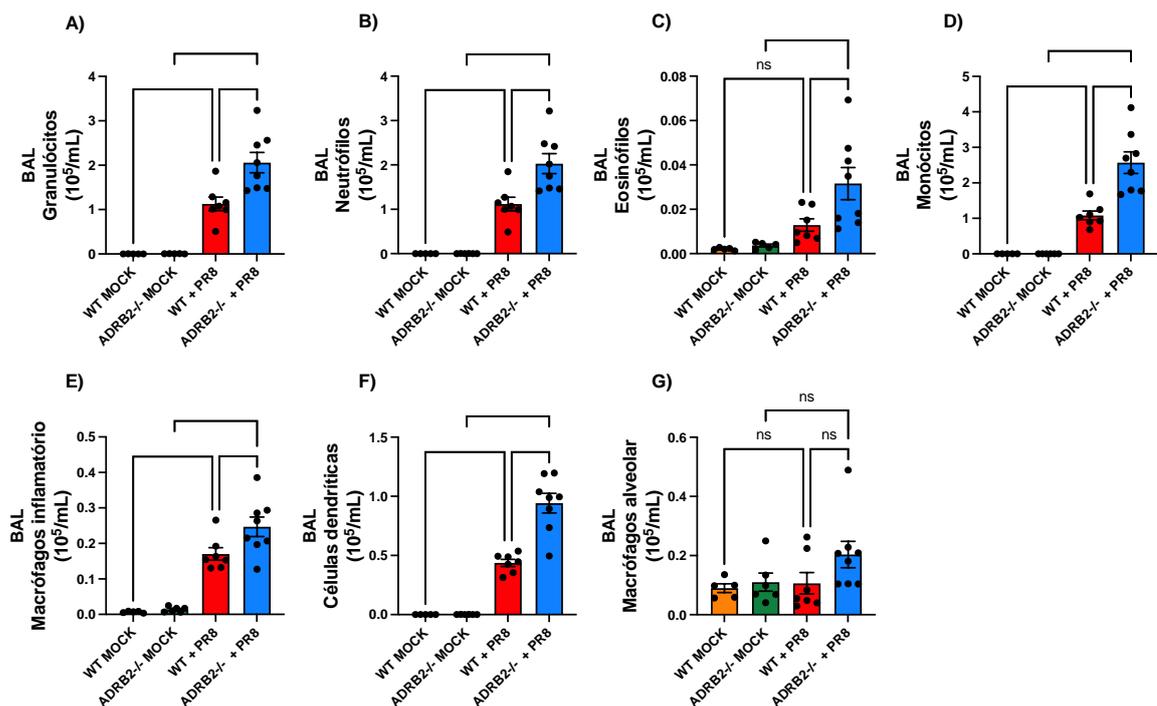
6.3. Avaliação do impacto causado pela deficiência em ADRB2 sobre o perfil de células mieloides durante infecção pelo vírus Influenza A.

Sabendo que as células inatas possuem um importante papel na resposta imune do hospedeiro, caracterizamos o perfil da resposta imune inata celular utilizando a técnica de citometria de fluxo. Dentre elas, foram analisadas: granulócitos, macrófagos, eosinófilos, neutrófilos, monócitos e células dendríticas. Conjuntamente, estes tipos celulares desempenham funções distintas durante a resposta imune, tanto na secreção de citocinas,

grânulos e apresentação de antígenos para células T. Contudo, uma resposta desregulada, e o excesso da atividade destes tipos celulares, podem intensificar uma resposta imunológica e um maior dano tecidual. Nossos resultados mostraram um predomínio de todos os tipos celulares (com exceção de macrófagos alveolares) nos camundongos *ADRB2*^{-/-} quando comparados com o grupo selvagem. Apresentando expansão significativa de granulócitos totais $2,0584 \times 10^5$ (mL), neutrófilos $2,0293 \times 10^5$ (mL), eosinófilos $0,0316 \times 10^5$ (mL) e monócitos $2,5684 \times 10^5$ (mL) quando comparados com o grupo de camundongos selvagens $1,1289 \times 10^5$ (mL), $1,1169 \times 10^5$ (mL), $0,0049 \times 10^5$ (mL) e $1,0824 \times 10^5$ (mL) respectivamente (figura 3 - A, B, C e D).

Observamos aumento na população de macrófagos inflamatórios $0,2467 \times 10^5$ (mL) no grupo de camundongos *ADRB2*^{-/-} quando comparados com o grupo de camundongos selvagens $0,1703 \times 10^5$ (mL) (figura 4 - E). Os resultados também demonstraram a expansão de células dendríticas $0,9421 \times 10^5$ (mL) nos camundongos *ADRB2*^{-/-} quando comparados com os camundongos selvagens $0,4368 \times 10^5$ (mL) (figura 3 - F). Por fim, não observamos em nenhum dos grupos a expansão de macrófagos alveolares (figura 3 - G).

Figura 3: Caracterização do perfil de células inatas de origem mieloide em camundongos infectados com o vírus influenza. Camundongos knockouts para o receptor *ADRB2* foram capazes de expandir significativamente todos os tipos celulares da imunidade inata quando comparados com camundongos selvagens.



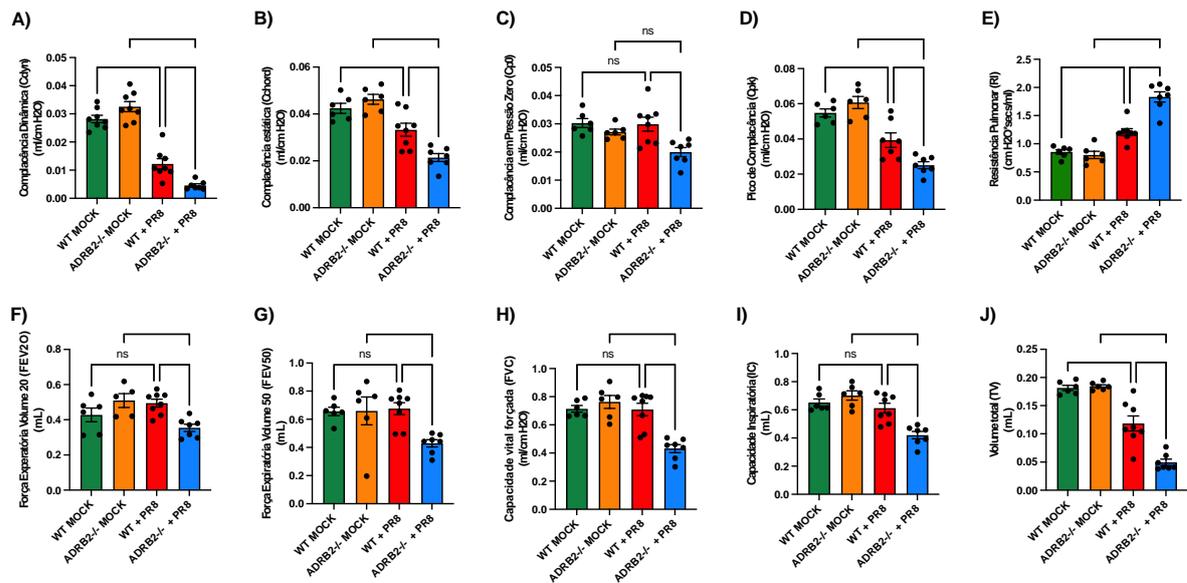
6.4. Impacto da deficiência em ADRB2 sobre a mecânica pulmonar durante infecção pelo vírus Influenza A.

Com intuito de entender o impacto da ausência do receptor ADRB2 no trato respiratório, os camundongos foram submetidos a análises de espirometria, que proporciona a mensuração da complacência, resistência e fluxos de ar no pulmão destes camundongos. Possibilitando o entendimento do funcionamento do órgão durante patologia causada pelo vírus influenza. A complacência pulmonar é caracterizada pela capacidade de extensão e distensão do órgão, podendo ser subdividida em: (1) Complacência dinâmica (C_{dyn}), mensurada pela medida contínua durante a respiração rítmica; (2) complacência estática (Chord), representada pelo volume fixo quando não há presença de fluxo de ar; (3) complacência em pressão zero (C_{p0}), caracterizada pelo volume fixo em pressão zero; (4) pico de complacência, caracterizado pelo maior pico de complacência durante a respiração rítmica.

Os resultados evidenciaram que camundongos knockouts para o receptor ADRB2, infectados com o vírus A/PR/8/34, apresentaram piora significativa em todos os parâmetros de complacência analisados, quando comparados com camundongos selvagens. Apresentando uma menor na complacência dinâmica 0,0045 cm H₂O x mL/cm, menor complacência estática 0,0213 H₂O x mL/cm e menor pico complacência 0,0250 H₂O x mL/cm, quando comparados com o grupo de camundongos selvagens 0,0122 cm H₂O x mL/cm, 0,0332 H₂O x mL/cm, 0,0332 H₂O x mL/cm respectivamente (figura 4 - A, B e D). Já para complacência sob pressão zero, os camundongos knockouts apresentaram menores valores 0,0332 H₂O x mL/cm quando comparado com os camundongos selvagens, contudo, não apresentou diferença estatística com seu respectivo grupo controle (figura 4 - C). Por outra via, podemos observar que camundongos ADRB2^{-/-} apresentaram um aumento significativo na resistência pulmonar 1,8313 H₂O x mL/cm quando comparado com camundongos selvagens 1,2060 H₂O x mL/cm (figura 4 - E).

Figura 4: Avaliação de espirometria de camundongos infectados com vírus influenza.

Grupo de oito camundongos selvagens e 8 camundongos knockouts para o receptor ADRB2 infectados com 250 PFU do vírus A/PR/8/34 e seis animais controles de cada grupo (PBS) foram submetidos a análise de espirometria após 7 dpi. Foi analisado a mecânica pulmonar desses animais. O teste one-way ANOVA foi aplicado seguido de pós-teste de Tukey's.



De maneira similar, também observamos uma perda de volumes respiratórios totais e volumes de correntes, nos camundongos ADRB2^{-/-} infectados, em todos os parâmetros analisados, quando comparados com o grupo de camundongos selvagens. Apresentando um volume expiratório forçado a 20 milissegundos e volume expiratório forçado a 50 milissegundos significativamente menor 0,3541 mL, 0,4293 mL respectivamente, quando comparado com camundongos selvagens 0,4946 mL, 0,6760 mL (figura 4 - F e G). Nos mesmos parâmetros, os camundongos ADRB2^{-/-} apresentaram uma diferença significativa quando comparado com seu grupo controle saudável, contudo essa mesma diferença não foi observada entre o grupo selvagem infectado e seu respectivo controle (figura 4 - F e G).

Observamos, que camundongos ADRB2^{-/-} apresentaram uma redução da capacidade vital forçada (FVC) 0,4315 H₂O x mL/cm e capacidade inspiratória 0,4202 mL quando comparado com o grupo de camundongos selvagens 0,7091 H₂O x mL/cm, 0,6123 mL, respectivamente (figura 4 - H e I). De forma semelhante nos mesmos parâmetros, foi observado que camundongos ADRB2^{-/-} apresentaram diferença estatística significativa quando comparados com seu respectivo grupo controle saudável, o que não foi observado com a comparação do grupo selvagem infectado com seu respectivo controle (figura 4 - H e I). Por

fim, camundongos ADRB2^{-/-} apresentaram redução significativa do volume total 0,0494 mL quando comparado com o grupo selvagem 0,1184 mL (figura 4 - H).

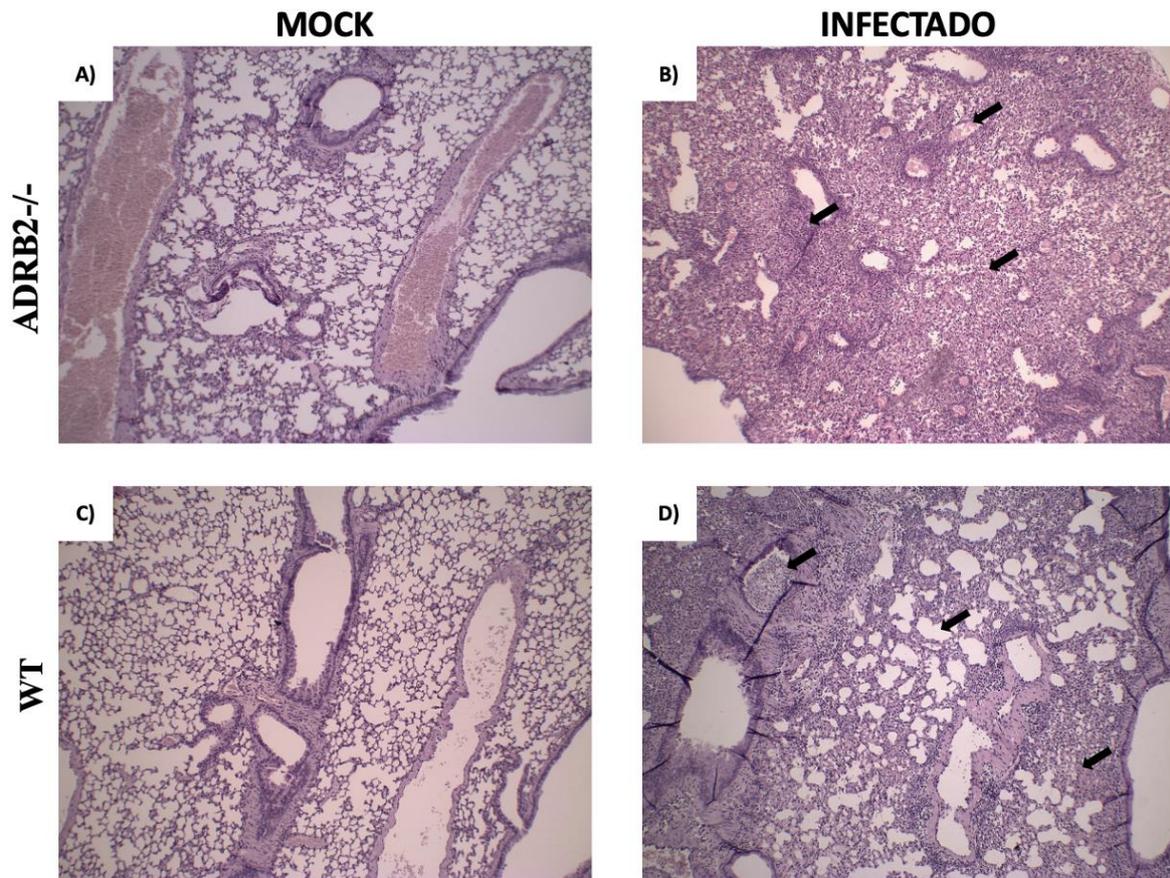
Com esses dados, evidenciamos que camundongos deficientes para o receptor ADRB2 apresentam maior comprometimento das funções mecânicas do pulmão, quando comparados com o grupo de camundongos selvagens. Este maior comprometimento pode ser explicado devido às funções fisiológicas do receptor ADRB2 nas vias aéreas, exercendo o papel de broncodilatação, o que favorece o fluxo de ar pelo órgão e conseqüentemente na sua função vital.

6.5. Análise histopatológica dos pulmões de camundongos infectados com vírus

Influenza A.

A fim de correlacionar os achados obtidos na espirometria, o pulmão dos camundongos infectados foram coletados após 7 dias de infecção. Posteriormente foram fixados, corados com H&E e analisados em microscópio ótico (Figura 5). Nas análises do parênquima pulmonar (alvéolos), observamos um infiltrado inflamatório septal e alveolar intenso (difuso) comprometendo o funcionamento do órgão nos camundongos ADRB2^{-/-} (figura 5 - B). Já nos camundongos selvagens, observamos a presença de um infiltrado inflamatório de forma mais discreta (multifocal) com sítios de infecções delimitados, evidenciando uma melhor visualização dos sacos alveolares (figura 5 - D). Também foi observado de forma mais severa nos camundongos ADRB2^{-/-}, a presença edema e congestão no parênquima pulmonar, com a presença de focos de hemorragia, sendo observado de forma mais discreta nos camundongos selvagens. Diferentemente do que foi observado nos respectivos controles, onde é possível visualizar de forma perfeita sacos alveolares sem nenhum tipo de obstrução, com ressalva de alguns focos de hemorragia, que julgamos ser provindo do manuseio dos camundongos para intubação, na realização da espirometria (figura 5 - A e C). Esses achados histopatológicos sugerem uma piora da lesão pulmonar em camundongos ADRB2^{-/-} devido ao comprometimento maior do órgão e conseqüentemente causando disfunção mecânica.

Figura 5: Alterações histopatológicas das vias aeres de camundongos infectados com o vírus Influenza. Grupo de oito camundongos selvagens e 8 camundongos knockouts para o receptor ADRB2 infectados com 250 PFU do vírus A/PR8/34 e seis animais controles de cada grupo (PBS) tiveram o pulmão coletado 7 dias após a infecção e foram fixados em solução de formaldeído a 10% e posteriormente processadas em blocos de parafina, cortados e corados com H&E e analisadas a microscópio.



6.6. Caracterização do perfil de mediadores solúveis

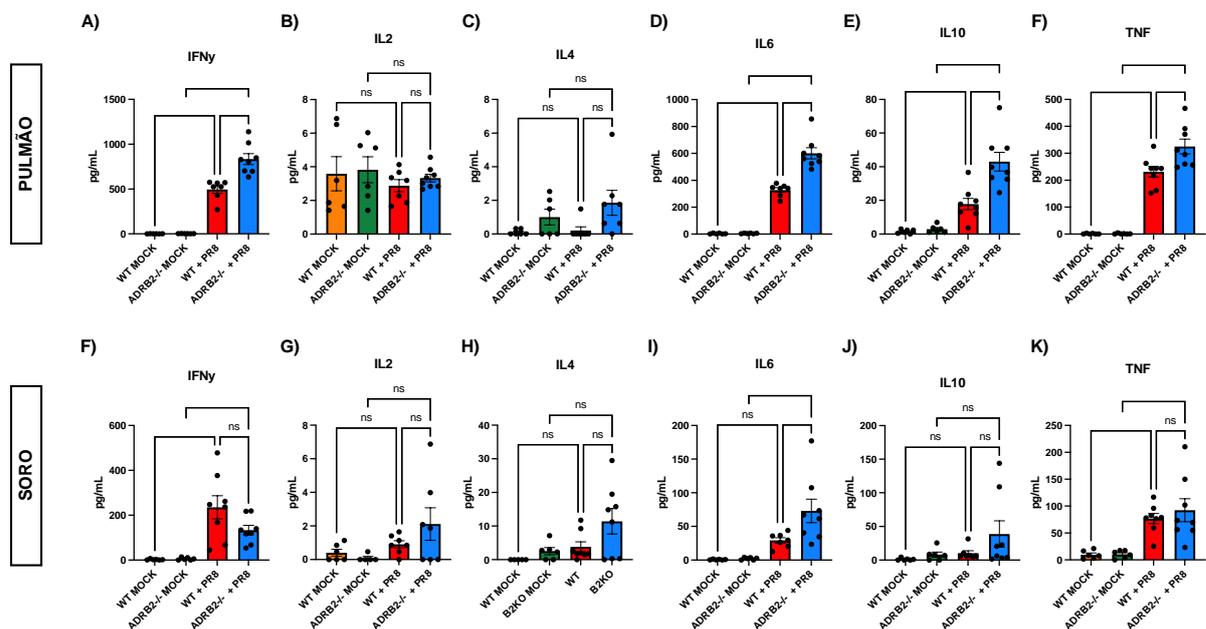
Para caracterização dos mediadores solúveis, foi realizado a maceração do pulmão dos grupos de camundongos e também o soro dos animais. Estas amostras foram submetidas a citometria de fluxo por CBA (Cytometric Bead Array) Th1, Th2 e Th17. Observamos que os camundongos ADRB2^{-/-} apresentaram um aumento significativo de citocinas pró-inflamatórias no macerado pulmonar, IFN-g (833,9 pg/mL), TNF-alpha (325,1 pg/mL), IL-6 (600,6 pg/mL), quando comparado com os camundongos selvagens (495,1 pg/mL), (231,3 pg/mL), (327,4 pg/mL) respectivamente (figura 6 - A, D e F). Também observamos o aumento substancial da

citocina reguladora IL-10 (43,00 pg/mL), quando comparado com o grupo de camundongos selvagens (17,80 pg/mL) no macerado pulmonar (figura 6 - E). Contudo não houve diferença estatística em nenhum dos grupos estudados nas citocinas IL-2 e IL-4 (figura 6 - B e C).

Já no soro destes animais, observamos um singelo aumento significativo de citocinas IL-6 (73,11 pg/mL) nos camundongos ADRB2^{-/-}, comparado com camundongos selvagens (29,30 pg/mL) (figura 6 - I). Para as demais citocinas não houve diferença significativa entre os grupos, evidenciando um tipo de resposta mais localizada, não desenvolvendo uma resposta sistêmica em sete dias após infecção (figura 6 - F, G, H, J e K).

Figura 6: Caracterização dos mediadores solúveis durante a infecção pelo vírus Influenza.

Grupo de oito camundongos selvagens e 8 camundongos knockouts para o receptor ADRB2 infectados com 250 PFU do vírus A/PR/8/34 e seis animais controles de cada grupo (PBS) foram coletados o BAL após 7 dpi. Os mediadores solúveis foram marcados pelo kit comercial CBA BD. O teste one-way ANOVA foi aplicado seguido de pós-teste de Tukey's.

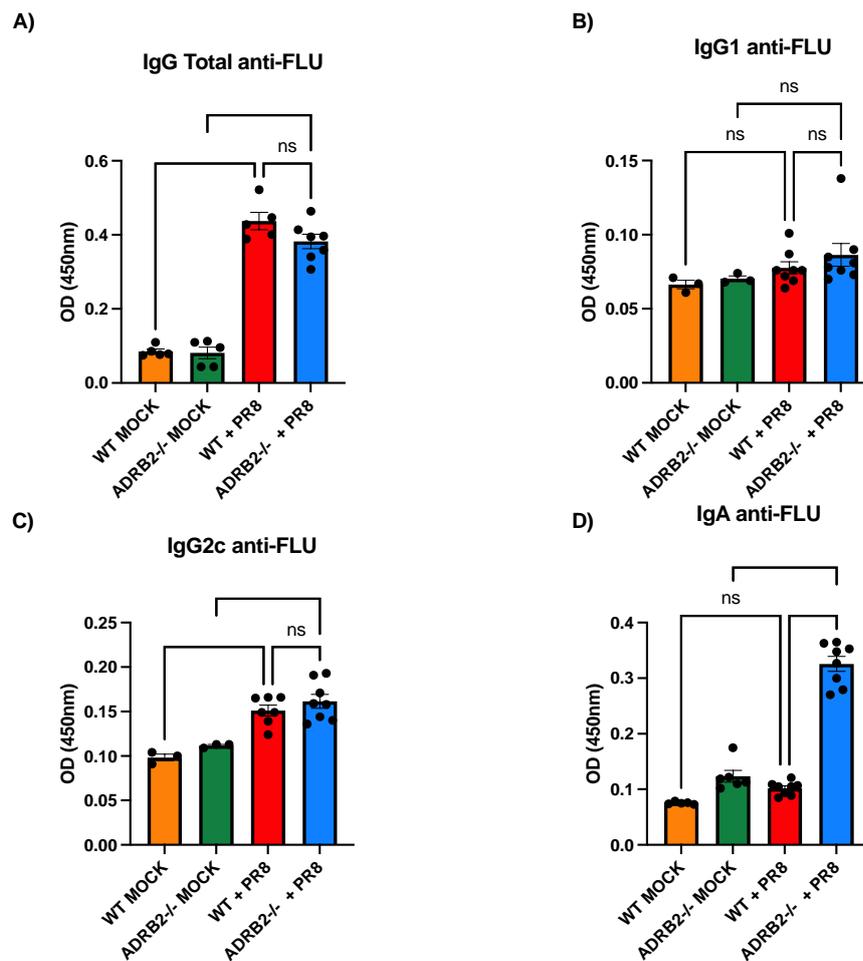


6.7. Caracterização da resposta imune humoral

Anticorpos IgG total, IgG1 e IgG2c anti-influenza foram mensurados no soro dos camundongos pela técnica de ELISA, para averiguar impactos na resposta humoral sistêmica. Já IgA anti-influenza, foi quantificada no BAL destes camundongos, a fim de caracterizar impactos na resposta imune humoral de mucosa. Com os resultados obtidos, não observamos

impacto direto na resposta imune humoral sistêmica ao analisar IgG total, IgG1 e IgG2c, não apresentando diferença estatísticas significante nos níveis destas Imunoglobulinas no soro entre os grupos estudados (figura 7 - A, B e C). Contudo, foi observado um aumento significativo nos níveis de IgA anti-influenza nos camundongos ADRB2^{-/-} (0,3256) quando comparado com o grupo de camundongos selvagem (0,1018) (figura 7 - D). Evidenciando assim, uma resposta imunológica concentrada no tecido pulmonar e não sistêmica no sétimo dia após a infecção.

Figura 7: Caracterização da resposta humoral, mediada por anticorpos específicos anti-influenza durante a infecção. Grupo de oito camundongos selvagens e 8 camundongos knockouts para o receptor ADRB2 infectados com 250 PFU do vírus A/PR8/34 e seis animais controles de cada grupo (PBS) foram coletados o BAL e soro após 7 dpi. A quantificação dos anticorpos específicos foi feita pela técnica de ELISA e medida a densidade ótica a 450 nm. O teste one-way ANOVA foi aplicado seguido de pós-teste de Tukey's.

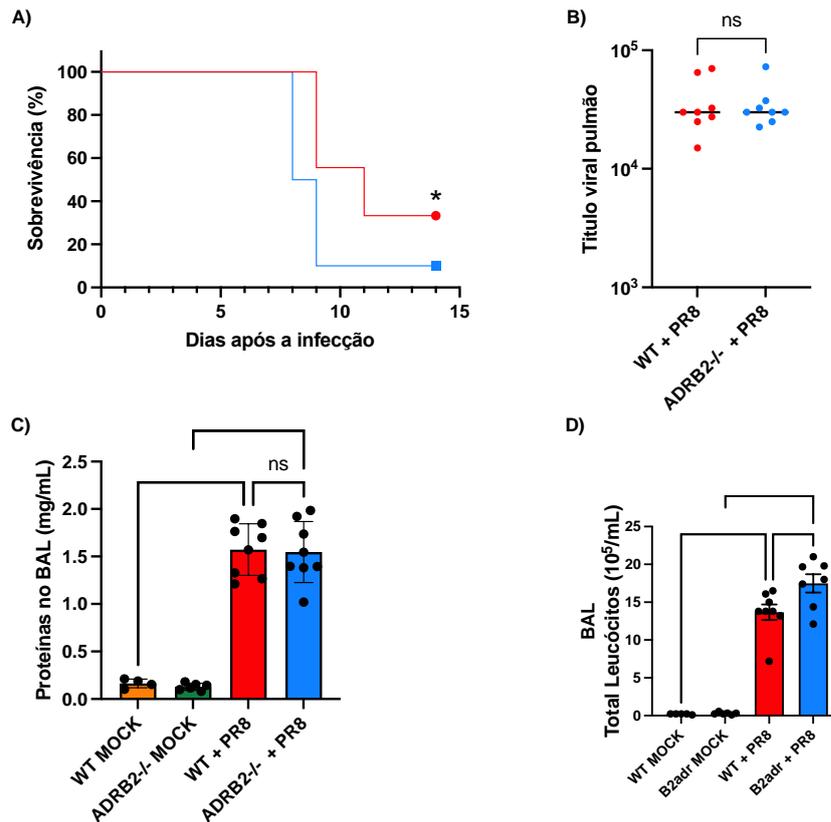


6.8. Caracterização fenotípica e suscetibilidade, carga viral pulmonar e contagens de leucócitos totais

Em paralelo, camundongos ADRB2^{-/-} e camundongos selvagens foram desafiados com 250 PFU do vírus A/PR/8/34 e acompanhados ao longo de 15 dias para avaliação do fenótipo de mortalidade. Os dados obtidos evidenciam que os camundongos ADRB2^{-/-} apresentam um fenótipo de mortalidade precoce, sucumbindo a infecção no oitavo dia, apresentando uma taxa de sobrevivência de 10%, diferentemente dos camundongos selvagens que apresentavam eventos de mortalidade no nono dia e taxa de sobrevivência de 33%, valor significativamente maior quando comparado com os camundongos ADRB2^{-/-} (figura 8 - A).

Curiosamente, os camundongos ADRB2^{-/-} e selvagens não apresentaram diferença estatística significativas quando analisado a carga viral pulmonar (figura 8 - B), além disso, os grupos apresentaram valores similares de exsudado proteico no BAL, diferindo apenas dos seus respectivos controles saudáveis que apresentaram baixos níveis de proteína no BAL (figura 8 - C). Contudo, a contagem total de leucócitos no BAL evidenciou um aumento significativo $17,7188 \times 10^5$ (mL) de células leucocitárias nos camundongos ADRB2^{-/-} quando comparado com os camundongos selvagens $13,675 \times 10^5$ (mL) (Figura 8 - D).

Figura 8: Caracterização fenotípica, carga viral, Bradford e contagem de leucócitos. Camundongos knockouts para o receptor ADRB2 e camundongos selvagens, foram desafiados com 250 PFU do vírus A/PR8/34 e acompanhado a suscetibilidade frente a infecção. Em paralelo, foram quantificados a carga viral pulmonar, presença de exsudato proteico e contagem total de leucócitos em camundongos desafiados por sete dias.



7. DISCUSSÃO

O IAV é um importante patógeno respiratório humano, se tornando um problema de saúde pública no mundo devido o sucesso de infecção as vias respiratórias e facilidade de transmissão. Sendo responsáveis por causar cerca 800 mil hospitalizações e cerca de 650 mil mortes anualmente em todo globo, acometendo principalmente crianças, idosos, gestantes e imunossuprimidos devido estarem mais susceptíveis a infecção (Medina; García-Sastre, 2011). O vírus influenza pode causar infecções leves ou infecções graves, tendo relação direta com o sítio de infecção no trato respiratório. Infecções restritas ao trato respiratório superior, tendem a manifestar quadros de doença leve e muitas vezes assintomática, por outro lado, a infecção do trato respiratório inferior, tende a desenvolver quadros de doença grave, com maior comprometimento das funções das vias aéreas, levando uma maior taxa de mortalidade (Long *et al.*, 2019; Te Velhuis; Fodor, 2016). A virulência da doença pode ser caracterizada por diversos fatores, como por exemplo, condições de saúde hospedeiro, resposta inflamatória exacerbada e virulência viral, sobretudo relacionada as proteínas HA, PB2 e NS, responsáveis pelo sucesso de infecção das células, competência de replicação do vírus e driblarem o sistema imune (Krammer *et al.*, 2018; Medina; García-Sastre, 2011). Sendo assim, o IAV é um dos principais patógenos de vigilância contínua, causando infecções sazonais e potenciais riscos de pandemias, sobrecarregando o sistema de saúde mundial e conseqüentemente impacto financeiro (Nypaver; Dehlinger; Carter, 2021; Te Velhuis; Fodor, 2016). E neste sentido, entender os mecanismos da resposta imune inata desencadeada pelo vírus influenza, é de essencial importância para o entendimento da doença e para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas.

As células do sistema imune adaptativo são extremamente importantes para o controle e destruição do vírus. Células TCD4+ desempenham um importante papel durante a resposta imune contra a influenza, sendo a mais importante fonte de produção de IFN γ , citocina que dispara diversas vias antivirais (Krammer *et al.*, 2018). Além disso, a participação das células TCD4+ é essencial para a mudança de isótipo dos anticorpos e por uma reposta de memória efetora de células TCD8+ (Hufford *et al.*, 2015; Krammer *et al.*, 2018; McMichael, 2018). Já as células TCD8+ são importantes na depuração do vírus influenza, através do reconhecimento de peptídeos virais apresentados pelas células infectadas, que se ligam aos receptores das células TCD8+ (DEY *et al.*, 2023). Já é demonstrado a participação das células TD8+ na redução da gravidade e na melhor recuperação após a infecção por vírus influenza sazonal e pandêmico (Hillaire *et al.*, 2011; Koutsakos; Kedzierska; Subbarao, 2019; Sridhar *et*

al., 2013). A resposta imune mediada por células B, produzem e secretam anticorpos específicos induzidos tanto pela infecção pelo vírus influenza, quando pela vacinação. Os anticorpos específicos anti-influenza são importantes para opsonização do vírus e proteção do hospedeiro. Esta resposta humoral é direcionada principalmente para as glicoproteínas HA e NA o que limita uma resposta eficiente contra influências futuros (Krammer *et al.*, 2018). Neste sentido, os vírus influenza são capazes de driblar a resposta imune adaptativa específica celular e a mediada por anticorpos, principalmente pela variabilidade gênica de suas glicoproteínas, sendo assim, necessário o desenvolvimento de vacinas anuais que conferem proteção as principais cepas circulantes no ano (Nypaver; Dehlinger; Carter, 2021; Webster; Govorkova, 2014).

Com isso, a resposta imune inata se torna um importante aliado na proteção contra o IAV. A resposta imune inata responde de forma inespecífica, e ao reconhecer PAMPS e DAMPS, orchestra uma serie de sinalizações intracelulares, desencadeando a produção de citocinas que vão sinalizar e recrutar células imunes inatas importantes para o controle da infecção inicial (Xu; Xie, 2023; Zhang *et al.*, 2021). Os Macrófagos desempenham uma importante função em infecções respiratórias, atuando como fagocito de patógenos inalados. Além disso, os macrófagos possuem um importante papel na manutenção da homeostase tecidual e indução de mecanismos de defesa. Durante na infecção pelo vírus influenza os macrófagos atuam também na produção de citocinas inflamatórias que podem modular o curso da infecção (Wang; Labzin, 2023). Já os neutrófilos, estão envolvidos na remoção de detritos celulares exógenos e endógenos. No contexto de infecção por influenza, a ausência de neutrófilos em camundongos knockouts apresentou um desfecho grave da doença, corroborando com a ideia da importância desta célula no contexto antiviral (Zhang *et al.*, 2022). As células dendríticas (DC), atuam principalmente na apresentação de antígeno para os linfócitos T, desencadeando a resposta adaptativa (Hargrave; MacLeod; Worrell, 2022).

As células natural killer (NK), constituem a primeira linha de defesa contra patógenos no pulmão, respondendo de forma imediata e eficaz na eliminação de patógenos e mantendo a homeostase do pulmão. No contexto de infecção pelo IAV, as células NK são responsivas na destruição de células epiteliais infectadas pelo vírus, induzindo apoptose (Frank; Paust, 2020). De forma semelhante, as células T $\gamma\delta$, podem inibir a replicação do vírus através da secreção de IFN γ , além de atuarem na eliminação direta do vírus, através da eliminação de células epiteliais infectadas pelo vírus (Li *et al.*, 2013; Sabbaghi *et al.*, 2020). Já as células linfoides inatas desempenham funções importantes durante infecções e doenças crônicas. No contexto de infecção pelo IAV seu papel é pouco descrito na literatura, estando relacionado

com a exacerbação da doença com a ampliação da população de ILC2, levando ao maior recrutamento de eosinófilos para o trato respiratório, causando quadros de hiper-reatividade das vias aéreas e maior dano tecidual (Fonseca *et al.*, 2021).

Nossos resultados mostraram que camundongos selvagens infectados pelo vírus A/PR/8/34 desenvolvem uma resposta mediada por células TCD4+, TCD8+, ILC1 Tbet+ e ILC2 GATA3+ no sétimo dia após infecção. Sabe-se que as ILC1 desempenham um importante papel na imunidade inata local, sendo residente no tecido esse tipo celular produz rapidamente IFN γ no sítio de infecção antes de outros linfócitos inatos e adaptativos conhecidos, levando a uma resposta rápida e controle da infecção viral (Weizman *et al.*, 2017). Além disso, durante a infecção por influenza ocorre a produção de TNF α pelas ILC1 desempenhando efeito antiviral direto nas células epiteliais do pulmão e ativação de macrófagos (Vashist *et al.*, 2018). Por outro lado, as ILC2 desempenham um importante papel no reparo tecidual. Contudo, durante a infecção pelo vírus influenza elas podem levar a hiper-reatividade das vias aéreas, através da produção de IL-5, levando um maior recrutamento de eosinófilos (Kanta Barman *et al.*, 2022; Sheikh *et al.*, 2022).

As ILC2 no contexto de infecção por influenza podem desempenhar papéis benéficos e prejudiciais, contribuindo para a reparação da integridade epitelial das vias aéreas e auxiliando na homeostase do tecido pulmonar. Por outro lado, podem secretar citocinas capazes de recrutar eosinófilos, que quando em excesso nas vias aéreas podem causar hiper-reatividade (Monticelli *et al.*, 2011). Sabe-se que as ILC2 são reguladas pelo receptor ADRB2, com isso levantamos a hipótese de que a ausência do receptor ADRB2 é capaz de modular o tipo de resposta imunológica. Nossos dados sugerem que a deficiência para ADRB2 desvia o curso de uma resposta classicamente antiviral (Th1) para uma resposta exacerbada mista de linfócitos Th1/Th2/Th17/Treg, causa impacto nas populações de ILC1/ILC2/ILC3/ILCreg no contexto de infecção por influenza.

Foi observado que a ausência do receptor ADRB2 foi capaz de impactar em todas as populações de ILCs (ILC1, ILC2, ILC3 e ILCreg). Foi evidenciado um aumento significativamente maior em todas estas populações nos camundongos ADRB2^{-/-} quando comparados com os camundongos selvagens. De forma semelhante, foi observado aumento significativo de células Th1, Th2, Th17 e Treg nos camundongos ADRB2^{-/-}. Sabe-se que a resposta de ILC3 é análogo a uma resposta Th17, sendo benéfica no contexto de patógenos extracelulares. No contexto de influenza, uma resposta do tipo Th17 podem ser protetoras no contexto de coinfeção bacteriana (Li *et al.*, 2023). Segundo Moriyama *et al.*, (2018), a ausência do receptor ADRB2 no contexto de infecção parasitária no intestino, funcionava como um

regulador negativo de ILC2, que neste contexto, desencadeava uma resposta mediada por ILC2 mais robusta, favorecendo a eliminação do patógeno e controle da infecção. Sabe-se que, repostas de ILC2 durante infecções respiratórias podem levar a hiper-reatividade das vias áreas, além do acúmulo de eosinófilo, causando um maior dano tecidual (Fonseca *et al.*, 2021).

E o aumento dessas populações de ILCs desreguladas, refletem diretamente nos mediadores solúveis com perfil inflamatório presente no tecido dos camundongos ADRB2^{-/-} infectados. Podemos observar uma expansão da tríade de citocinas classicamente pró-inflamatórias nos camundongos ADRB2^{-/-}, dentre elas IFN γ , IL-6 e TNF. ILC1 contribui com o tipo de reposta análoga à Th1 e classicamente com perfil antiviral através da produção de IFN γ , já as ILC3 respondem de forma análoga às Th17 com ativação neutrofílica e a produção clássica de TNF, sendo eficaz contra patógenas extracelulares (Artis; Spits, 2015). No contexto de influenza, a produção de IFN γ pode ser benéfica, contribuindo para resistência antiviral inata e participação direta na promoção de uma resposta adaptativa robusta, o que favorece o *clearance* viral (Iwasaki; Pillai, 2014). Houve também níveis maiores de IL-10 nos camundongos ADRB2^{-/-}, o que corrobora com o aumento da população de ILCreg e Treg, que são classicamente secretoras de IL-10 e TGF- β , atuando na remodelação epitelial, contribuindo para a homeostase e controle da infecção. Porém, ineficiente para conter o dano tecidual nos camundongos ADRB2^{-/-}.

O aumento destas citocinas pró-inflamatórias nos camundongos ADRB2^{-/-}, reflete diretamente no recrutamento de células CD4⁺ e CD8⁺ com os diferentes perfis de reposta imune (Th1, Th2, Th17 e Treg), na prevalência de células NK, e também em todos os tipos celulares de origem mieloide, com exceção de macrófagos alveolar. A presença elevada de todas essas células no ambiente inflamatório por causa de uma resposta imune desregulada, levando ao eventos de “citokines storm” causando uma resposta inflamatória exacerbada e com maior dano tecidual (Gu *et al.*, 2021).

Por outro lado, ao analisarmos a resposta imune humoral específica contra o Influenza A, observamos uma expressão de IgA anti-influenza muito alta no BAL de camundongos ADRB2^{-/-}. As imunoglobulinas do tipo A, são específicas das mucosas, amplamente protetoras e com potencial de opsonização do patógeno (Kehagia; Papakyriakopoulou; Valsami, 2023), estas são produzidas pelos linfócitos B frente a estímulos, sobretudo, pela presença de IL-10, sendo um importante indutor de produção de IgA (Bribre *et al.*, 1993). No pulmão em contextos inflamatórios, pode haver uma produção exacerbada desta imunoglobulina devida à formação de tecido linfoide associado ao brônquio (iBALT), onde, está presente diversas células do sistema imune, dentre elas células B que respondem de forma

precoce a infecções (Silva-Sanchez; Randall, 2020). Porém, apesar do aumento de IgA específica, não foi o suficiente para contribuição em redução do título viral, dano tecidual e mortalidade nos animais ADRB2^{-/-} comparado aos selvagens. Classicamente, a IgA desempenha um importante papel na proteção frente a infecções virais em geral, capazes de opsonizar as partículas virais e impedir a infecção das células, sem desencadear uma resposta inflamatória deletéria levando a dano tecidual (Pilette *et al.*, 2001; Quinti *et al.*, 2021).

Contudo, mesmo observado uma resposta humoral local, de forma robusta e específica anti-influenza, podemos julgar não ser uma resposta protetora quando observamos o dano tecidual causado pela infecção, resultando em uma disfunção na mecânica pulmonar desses animais ADRB2^{-/-}, onde, observamos perda de complacência, e de volumes pulmonares e um aumento da resistência do órgão, refletindo diretamente com a inflamação do tecido. E também ineficiente no *clearance* viral, onde, mesmo com uma resposta humoral específica, não reduz o título viral no tecido e não evita a morte dos animais ADRB2^{-/-}.

8 CONCLUSÃO

Os achados obtidos neste trabalho, indicam a importância do receptor β 2-adrenérgico na regulação das ILCs, e diferentemente do que foi descrito nos trabalhos anteriores sugerindo que o receptor β 2-adrenérgico é um regulador negativo de ILC2, nossos dados vão além e apontam que o receptor β 2-adrenérgico pode ser um regulador negativo da expansão das populações de ILCs de forma geral, contribuindo para respostas mediadas por ILC1, ILC2, ILC3 e ILCreg. Assim, o receptor ADRB2 também se mostrou importante para controlar a exacerbação da resposta imunológica mediada por ILCs e outras células inatas, que em conjunto orquestram as respostas imunológica robusta no contexto da infecção pelo vírus influenza, causando um maior dano tecidual do pulmão, modificando a ventilação e funcionamento fisiológico pulmonar e determinando o padrão da resposta inflamatória. Coletivamente, nossos dados sugerem que o receptor β 2-adrenérgico funciona como regulador negativo da expansão desta população linfóide inata ILCs, desviando o curso natural de uma resposta clássica antiviral eficiente para uma forma mal adaptada, que estão envolvidas nas manifestações graves da doença e mortalidade. É possível que agonistas do receptor β 2-adrenérgico usados para o tratamento da asma podem influenciar não somente as células musculares lisas causando relaxamento, mas também modular as atividades das subpopulações de ILCs residentes no tecido pulmonar e conseqüentemente o curso da resposta frente a infecção causada pelo vírus influenza A.

9 REFERÊNCIAS

- AKAMA, Yuichi *et al.* The role of innate lymphoid cells in the regulation of immune homeostasis in sepsis-mediated lung inflammation. **Diagnosics**, v. 10, n. 10, 808, 2020. doi: 10.3390/diagnostics10100808
- ARANKALLE, Vidya A. *et al.* Role of host immune response and viral load in the differential outcome of pandemic H1N1 (2009) influenza virus infection in indian patients. **PLoS One**, v. 5, n. 10, 2010. doi.org/10.1371/journal.pone.0013099
- ARTIS, David; SPITS, Hergen. The biology of innate lymphoid cells. **Nature**, v. 517, n. 7534, p. 293-301, 2015. doi: 10.1038/nature14189.
- BARNES, Peter J. Distribution of receptor targets in the lung. **Proc Am Thorac Soc**, v. 1, n. 4, p. 345-51, 2004. doi: 10.1513/pats.200409-045MS.
- BARNES, Peter J. Immunology of asthma and chronic obstructive pulmonary disease. **Nat Rev Immunol**, v. 8, n. 3, p. 183-92, 2008. doi: 10.1038/nri2254.
- BARNES, Peter J. New anti-inflammatory targets for chronic obstructive pulmonary disease. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 12, n. 7, p. 543–559, 2013.
- BOUVIER, Nicole M; PALESE, Peter. The biology of influenza viruses. **Vaccine**, v. 4, Suppl 4, D49-53, 2008.
- BRIBRE, F *et al.* Interleukin 10 Induces B Lymphocytes from IgA-deficient Patients to Secrete IgA. **The American Society of Clinical Investigation**, v.94, n. 1, p. 97-104, 1994.
- BROZ, Petr; DIXIT, Vishva M. Inflammasomes: Mechanism of assembly, regulation and signalling. **Nature Publishing Group**, v. 16, n. 7, p. 407-20, 2016. doi: 10.1038/nri.2016.58.
- DAVIDSON, Sophia. Treating influenza infection, from now and into the future. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 1946, 2018.
- DEY, Piyush *et al.* Immune Control of Avian Influenza Virus Infection and Its Vaccine Development. **Vaccines**, v. 11, n. 3, p. 593, 2023.
- DI GIORGIO, Eros; XODO, Luigi E. Endogenous Retroviruses (ERVs): Does RLR (RIG-I-Like Receptors)-MAVS Pathway Directly Control Senescence and Aging as a Consequence of ERV De-Repression? **Frontiers Immunol**, v. 13, 917988, 2022.
- DOROTEA, Debra; HA, Hunjoo. Activation of β 2 adrenergic receptor signaling modulates inflammation: a target limiting the progression of kidney diseases. **Archives of Pharmacal Research**, v. 44, n. 1, p. 49–62, 2021.
- FONSECA, Wendy *et al.* Role of ILC2 in Viral-Induced Lung Pathogenesis. **Frontiers in Immunology**, v. 12, 675169, 2021. DOI: 10.3389/fimmu.2021.675169
- FRANK, Kayla; PAUST, Silke. Dynamic Natural Killer Cell and T Cell Responses to Influenza Infection. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 10, 425, 2020.

GIBBONS, Christopher H. Basics of autonomic nervous system function. **Handb Clin Neurol**, v. 160, p. 407-418, 2019. doi: 10.1016/B978-0-444-64032-1.00027-8.

GOFFIC, Ronan L *et al.* Cutting Edge: Influenza A Virus Activates TLR3-Dependent Inflammatory and RIG-I-Dependent Antiviral Responses in Human Lung Epithelial Cells. **J Immunol**, v. 178, n. 6, p. 3368-72, 2007. doi: 10.4049/jimmunol.178.6.3368.

GRAHAM, Robert M. Adrenergic receptors: structure and function. **Cleveland Clinic Journal Of Medicine**, v. 57, n. 5, p. 481-91, 1990.

GU, Yinuo *et al.* The mechanism behind influenza virus cytokine storm. **Viruses**, v. 13, n. 7, 1362, 2021. doi: 10.3390/v13071362

HALE, Benjamin G. *et al.* The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. **J Gen Virol**, v. 89, Pt 10, p. 2359-2376, 2008. doi: 10.1099/vir.0.2008/004606-0.

HARGRAVE, Kerrie E.; MACLEOD, Megan K.L.; WORRELL, Julie C. Antigen presenting cells: Professionals, amateurs, and spectators in the “long game” of lung immunity. **Int. J. Biochem. Cell Biol**, v. 153, 106331, 2022.

HARTSHORN, Kevan L. Innate Immunity and Influenza A Virus Pathogenesis: Lessons for COVID-19. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 10, 563850, 2020. doi: 10.3389/fcimb.2020.563850.

HILLAIRE, M. L. B. *et al.* Characterization of the Human CD8 + T Cell Response following Infection with 2009 Pandemic Influenza H1N1 Virus. **Journal of Virology**, v. 85, n. 22, p. 12057–12061, 2011.

HORIMOTO, T.; KAWAOKA, Y. Pandemic threat posed by avian influenza A viruses. **Clinical Microbiology Reviews**, [v. 14, n. 1, p. 129–149, 2001.

HUFFORD, Matthew M. *et al.* The effector t cell response to influenza infection. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 386, p. 423–455, 2015.

IPPOLITO, Michael; BENOVIC, Jeffrey L. Biased agonism at β -adrenergic receptors. **Cellular Signalling**, v. 80, 109905, 2021.

IWASAKI, Akiko; PILLAI, Padmini S. Innate immunity to influenza virus infection. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 5, p. 315–328, 2014.

JOHNSON, Malcolm. Effects of β 2-agonists on resident and infiltrating inflammatory cells. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 110, n. 6 Supl, S282-90, 2002.

KANTA BARMAN, Tarani *et al.* Viral PB1-F2 and host IFN- γ guide ILC2 and T cell activity during influenza virus infection. **PNAS**, v. 119, p. 1–12, 2022.

KEHAGIA, Eleni; PAPAKYRIAKOPOULOU, Paraskevi; VALSAMI, Georgia. Advances in intranasal vaccine delivery: A promising non-invasive route of immunization. **Vaccine**, v. 41, n. 24, p. 3589–3603, 2023.

- KIM, Hyunsuh; WEBSTER, Robert G.; WEBBY, Richard J. Influenza Virus: Dealing with a Drifting and Shifting Pathogen. **Viral Immunology**, v. 31, n. 2, p. 174–183, 2018.
- KOUTSAKOS, Marios; KEDZIERSKA, Katherine; SUBBARAO, Kanta. Immune Responses to Avian Influenza Viruses. **The Journal of Immunology**, v. 202, n. 2, p. 382–391, 2019.
- KRAMMER, Florian *et al.* Influenza. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, p. 1–21, 2018.
- KUMAR, Amrita *et al.* Innate lymphoid cells (ILC) in SARS-CoV-2 infection. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 80, 101008, 2021.
- KUMAR, Vijay. Pulmonary Innate Immune Response Determines the Outcome of Inflammation During Pneumonia and Sepsis-Associated Acute Lung Injury. **Front Immunol**, v. 11, 1722, 2020.
- LI, Hong *et al.* Human V γ 9V δ 2-T cells efficiently kill influenza virus-infected lung alveolar epithelial cells. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 10, n. 2, p. 159–164, 2013.
- LI, Yong *et al.* Memory Th17 cell-mediated protection against lethal secondary pneumococcal pneumonia following influenza infection. **MBio**, v. 14, n. 4, p. e0051923, 2023. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/37222516>.
- LONG, Jason S. *et al.* Host and viral determinants of influenza A virus species specificity. **Nat Rev Microbiol**, v. 17, n. 2, p. 67-81, 2019. doi: 10.1038/s41579-018-0115-z.
- LUO, Ming. Influenza virus entry. **Adv Exp Med Biol**, v. 726, p. 201-21, 2012. doi: 10.1007/978-1-4614-0980-9_9.
- MALIK, Gaurav; ZHOU, Yan. Innate immune sensing of influenza a virus. **Viruses**, v. 12, n. 7, 755, 2020. doi: 10.3390/v12070755.
- MCMICHAEL, Andrew J. Legacy of the influenza pandemic 1918: The host T cell response. **Biomed J**, v. 41, n. 4, p. 242–248, 2018.
- MEDINA, Rafael A.; GARCÍA-SASTRE, Adolfo. Influenza A viruses: New research developments. **Nat Rev Microbiol**, v. 9, n. 8, p. 590-603, 2011. doi: 10.1038/nrmicro2613.
- MILLER, E A; LITHGOW, T J; HOOGENRAAD, N J. Condrin for electrospray mass spectrometry and N-terminal sequencing analysis. **Nature America Inc.**, [s. l.], v. 6, 1999. Disponível em: <http://structbio.nature.com>.
- MONTICELLI, Laurel A *et al.* Innate lymphoid cells promote lung tissue homeostasis following acute influenza virus infection HHS Public Access. **Nat Immunol**, v. 12, n. 11, p. 1045–1054, 2011.
- MORIYAMA, Saya *et al.* β 2-adrenergic receptor-mediated negative regulation of group 2 innate lymphoid cell responses. **Science**, v. 359, n. 6379, p. 1056-1061, 2018. doi: 10.1126/science.aan4829.

- MUTLU, Gökhan M.; FACTOR, Phillip. Alveolar epithelial β 2-adrenergic receptors. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 38, n. 2, p. 127–134, 2008.
- NETO, Mário A; RASCADO, Ricardo R; BENDHACK, Lusiane M. Receptores β -adrenérgicos nosistema cardiovascular. **Medicina**, v. 39, n. 1, p. 3-12 2006. Disponível em: <http://www.fmrp.usp.br/revista>.
- NYPAVER, Cynthia; DEHLINGER, Cynthia; CARTER, Chelsea. Influenza and Influenza Vaccine: A Review. **J Midwifery Womens Health**, v. 66, n. 1, p. 45–53, 2021.
- PETER. J. BARNES. Effect of β -agonists on inflammatory cells. **J Allergy Clin Immunol**, v. 104, n. 2 PT 2, S10-7, 1999.
- PILETTE, C *et al.* Lung mucosal immunity: immunoglobulin-A revisited. **Eur Respir J**, v. 19, n. 4, 785, 2002
- QUINTI, Isabella *et al.* IgA Antibodies and IgA Deficiency in SARS-CoV-2 Infection. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 11, 55896, 2021. doi: 10.3389/fcimb.2021.655896.
- RATHINAM, Vijay A.K.; FITZGERALD, Katherine A. Inflammasome Complexes: Emerging Mechanisms and Effector Functions. **Cell**, v. 165, n. 4, p. 792–800, 2016. doi: 10.1016/j.cell.2016.03.046
- SABBAGHI, Ailar *et al.* Role of $\gamma\delta$ T cells in controlling viral infections with a focus on influenza virus: implications for designing novel therapeutic approaches. **Virol J**, v. 17, n. 1, 174, 2020. doi: 10.1186/s12985-020-01449-0.
- SANDERS, Virginia M. The beta2-adrenergic receptor on T and B lymphocytes: Do we understand it yet? **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 26, n. 2, p. 195–200, 2012.
- SHAO, Wenhan *et al.* Evolution of influenza a virus by mutation and re-assortment. **Int J Mol Sci**, v. 18, n. 8, 1650, 2017. doi: 10.3390/ijms18081650.
- SHEIKH, Abdalla *et al.* IL-7 induces type 2 cytokine response in lung ILC2s and regulates GATA3 and CD25 expression. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 112, n. 5, p. 1105–1113, 2022.
- SHORE, Stephanie A.; MOORE, Paul E. Regulation of β -adrenergic responses in airway smooth muscle. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, v. 137, n. 2–3, p. 179–195, 2003.
- SILVA-SANCHEZ, Aaron; RANDALL, Troy D. Role of iBALt in Respiratory Immunity. **Curr Top Microbiol Immunol**, v. 426, p. 21-43, 2020. doi: 10.1007/82_2019_191.
- SILVERTHORN, Dee Unglaub. **Fisiologia humana: uma abordagem integrada**. 7. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017
- SRIDHAR, Saranya *et al.* Cellular immune correlates of protection against symptomatic pandemic influenza. **Nature Medicine**, v. 19, n. 10, p. 1305–1312, 2013.

STARKEY, Malcolm R. *et al.* Pulmonary group 2 innate lymphoid cells: surprises and challenges. [*S. l.*]: **Nature Publishing Group**, 2019.

TE VELTHUIS, Aartjan J.W.; FODOR, Ervin. Influenza virus RNA polymerase: Insights into the mechanisms of viral RNA synthesis. [*S. l.*]: **Nature Publishing Group**, 2016.

VASHIST, Neha *et al.* Influenza-activated ILC1s contribute to antiviral immunity partially influenced by differential GTR expression. **Front Immunol**, v. 9, 505, 2018. doi: 10.3389/fimmu.2018.00505. eCollection 2018.

VELMURUGAN, Bharath Kumar; BASKARAN, Rathinasamy; HUANG, Chih Yang. Detailed insight on β -adrenoceptors as therapeutic targets. **Biomed Pharmacother**, v. 117, 109039, 2019. doi: 10.1016/j.biopha.2019.109039.

WANG, Wen Chien *et al.* Progress towards the Development of a Universal Influenza Vaccine. **Viruses**, v. 14, n. 8, 1684, 2022. doi: 10.3390/v14081684.

WANG, Dayan *et al.* The epidemiology, virology, and pathogenicity of human infections with avian influenza viruses. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 11, n. 4, 2021.

WANG, Xiaohui; LABZIN, Larisa I. Inflammatory cell death: how macrophages sense neighbouring cell infection and damage. *Biochem Soc Trans*, v. 51, n. 1, p. 303–313, 2023. doi: 10.1042/BST202208

WEBSTER, Robert G.; GOVORKOVA, Elena A. Continuing challenges in influenza. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1323, n. 1, p. 115–139, 2014.

WEHRWEIN, Erica A.; ORER, Hakan S.; BARMAN, Susan M. Overview of the Anatomy, Physiology, and Pharmacology of the Autonomic Nervous System. **Comprehensive Physiology**, v. 6, n. 3, p. 1239–1278, 2016.

WEIZMAN, Orr El *et al.* ILC1 Confer Early Host Protection at Initial Sites of Viral Infection. **Cell**, v. 171, n. 4, p. 795–808. e12, 2017.

WU, Nicholas C.; WILSON, Ian A. Influenza hemagglutinin structures and antibody recognition. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v. 10, n. 8, p. 1–20, 2020.

XIONG, Xiaoli *et al.* Structures of complexes formed by H5 influenza hemagglutinin with a potent broadly neutralizing human monoclonal antibody. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 30, p. 9430–9435, 2015.

XU, Suowen; JIN, Tengchuan; WENG, Jianping. Endothelial Cells as a Key Cell Type for Innate Immunity: A Focused Review on RIG-I Signaling Pathway. **Front Immunol**, v. 13, 951614, 2022. doi: 10.3389/fimmu.2022.951614.

XU, Jianqiao; XIE, Lixin. Advances in immune response to pulmonary infection: Nonspecificity, specificity and memory. **Chronic Dis Transl Med**, v. 9, n. 2, p. 71–81, 2023. doi: 10.1002/cdt3.71.

ZHANG, Yuning *et al.* Neutrophil subsets and their differential roles in viral respiratory diseases. **J Leukoc Biol**, v. 111, n. 6, p. 1159-1173, 2022.

ZHANG, Huihui *et al.* The Role of Innate Immunity in Pulmonary Infections. **Biomed Res Int**, 2021, 6646071, 2021.