

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

Efeito do vírus influenza recombinante carreando o gene da interleucina 22 (Flu-IL22) na infecção pelo vírus influenza selvagem (H1N1- A/PR8/34) e na infecção por *Streptococcus pneumoniae*, em modelo murino

por

Rayanne Rosa Do Nascimento Macário

Belo Horizonte

2022

DISSERTAÇÃO MSC – IRR

R.R.N. MACÁRIO

2022

RAYANNE ROSA DO NASCIMENTO MACÁRIO

Efeito do vírus influenza recombinante carreando o gene da interleucina 22 (Flu-IL22) na infecção pelo vírus influenza selvagem (H1N1- A/PR8/34) e na infecção por *Streptococcus pneumoniae*, em modelo murino

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciências na área de concentração Biologia celular e Molecular.

Orientação: Dr. Alexandre de Magalhães Vieira Machado

Coorientação: Dra. Sarah Giarola da Silva Messias

Belo Horizonte

2022

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do IRR
CRB 6 3740/00

M118e Macário, Rayanne Rosa do Nascimento.
2022

Efeito do vírus influenza recombinante carregando o gene da interleucina 22 (Flu-IL22) na infecção pelo vírus influenza selvagem (H1N1- A/PR8/34) e na infecção por *Streptococcus pneumoniae*, em modelo murino/ Rayanne Rosa Do Nascimento Macário – Belo Horizonte, 2022

XIX, 103 f., il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 96-102

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

1. Interleucina 22 2. Influenza humana 3. Genética reversa 4. *Streptococcus pneumoniae* I. Título. II. Machado, Alexandre de Magalhães Vieira (Orientação). III. Messias, Sarah Giarola da Silva (Coorientação)

CDD – 22. ed. – 616.2

RAYANNE ROSA DO NASCIMENTO MACÁRIO

Efeito do vírus influenza recombinante carreando o gene da interleucina 22 (Flu-IL22) na infecção pelo vírus influenza selvagem (H1N1- A/PR8/34) e na infecção por *Streptococcus pneumoniae*, em modelo murino

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para a obtenção do título de mestre em Ciências na área de concentração Biologia celular e Molecular.

Orientação: Dr. Alexandre de Magalhães Vieira Machado

Coorientação: Dra. Sarah Giarola da Silva Messias

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Alexandre de Magalhães Vieira Machado (IRR – Fiocruz - Minas) Presidente

Prof. Dra. Jaqueline Germano de Oliveira (IRR – Fiocruz - Minas) Titular

Prof. Dra. Jordana Graziela Alves Coelho dos Reis (UFMG) Titular

Prof. Dra. Jacqueline Araujo Fiuza (IRR – Fiocruz - Minas) suplente

Dissertação defendida e aprovada em Belo Horizonte, 23/09/2022

COLABORADORES

Este trabalho foi desenvolvido no Instituto René Rachou – FIOCRUZ/ MG - Grupo de Pesquisa em Imunologia de Doenças Virais (IDV) e contou com a colaboração de:

- Alexandre de Magalhães Vieira Machado
- Ana Paula Faria Gonçalves
- Deyse Júlia de Jesus
- Fernanda Gambogi de Oliveira
- Ketyllen Reis Andrade de Carevalho
- Kimberly Freitas Cardoso
- Leonardo de Paula Pereira
- Marcelo Antônio Pascoal Xavier
- Márcio Sobreira Silva Araújo
- Rosângela Aparecida Pereira
- Sarah Giarola da Silva Messias

DEDICATÓRIA

*“Arrependimentos, eu tive alguns
Mas ainda assim, tão poucos para mencionar
Eu fiz o que eu tinha que fazer
E persisti, sem exceção*

*Eu planejei cada caminho do mapa
Cada cuidadoso passo ao longo da estrada
E mais, muito mais que isso
Eu fiz do meu jeito*

*Eu amei, eu sorri e chorei
Tive minhas falhas, minha parte de derrotas
E agora, enquanto as lágrimas caem
Eu acho tudo tão incrível”*

Frank Sinatra

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por iluminar todos os meus passos e ter permitido que eu vivesse essa experiência.

Aos meus pais, Idelonita (*in memoriam*) e Rodney, as pessoas mais importantes da minha vida. Obrigada por todo carinho, apoio, conselhos e inspiração, se hoje estou escrevendo esses agradecimentos, é por vocês. Amo vocês incondicionalmente.

A Pricylla, minha terapeuta, que tanto me auxiliou nesse período de desafios e incertezas.

A FIOCRUZ MINAS, por todos esses anos de crescimento e aprendizagem.

Ao Dr. Alexandre Machado, pela orientação.

A Dra. Sarah Giarola e Dra. Ana Paula Gonçalves, pela coorientação.

A Msc. Kimberly Freitas, que foi o meu braço direito durante toda a trajetória da pós-graduação. Agradeço pelos momentos compartilhados, ensinamentos, parceria, paciência e amizade. Sua participação nesse projeto foi ímpar para mim.

Ao Dr. Márcio Sobreira e ao Dr. Marcelo Pascoal, pela colaboração, apoio e ensinamentos.

Aos integrantes do IDV que somaram nesse projeto, em especial a Fernanda, Ketyllen e Leonardo.

A Deyse Júlia, amiga de longa data, que em sua trajetória no IDV tanto me ajudou.

A Rosângela e ao Sr. Carlos, que são pessoas iluminadas e sempre alegam meus dias quando nos encontramos nos corredores do IRR.

Aos amigos e colaboradores do NUPAD, pelo incentivo e apoio na conclusão deste trabalho.

Aos meus amigos de longa data que me acompanharam e apoiaram durante essa trajetória.

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

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

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

- CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa)
- CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)
- FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais)
- FIOCRUZ (Fundação Oswaldo Cruz)
- PPG-CS (Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde - IRR)

A todos que de alguma forma ajudaram na construção desse trabalho e deixaram essa trajetória mais leve. Muito obrigada!

RESUMO

O vírus Influenza possui a capacidade de infectar uma ampla gama de hospedeiros, sendo responsável por importantes epidemias e pandemias ao longo da história. A infecção por esse vírus leva a uma desregulação das respostas imunológicas e danos à barreira epitelial pulmonar, predispondo o hospedeiro à infecção bacteriana secundária, sendo o *Streptococcus pneumoniae* um dos principais patógenos envolvidos. Diante disso, por meio da técnica de genética reversa, foi construído um vírus influenza recombinante defeutivo para a replicação carreando o gene da IL-22 murina (Flu-IL22). O vírus Flu-IL22 construído foi caracterizado de forma genotípica, fenotípica e funcional. A capacidade de produzir a IL-22 foi avaliada tanto *in vitro* quanto *in vivo*. O impacto imunomodulatório do Flu-IL22 foi avaliado através de coinfeções subletais do vírus recombinante com o vírus influenza selvagem (A/PR/8/34:H1N1) ou com *S. pneumoniae* (ATCC6303), através do acompanhamento da perda de peso e contagem bacteriana pulmonar, respectivamente. Além disso, também foi realizada análises histopatológicas de pulmões dos animais coinfectados com o vírus Flu-IL22 e *S. pneumoniae*. Nossos resultados demonstraram que o vírus Flu-IL22 apresenta estabilidade genética do inserto heterólogo e produz de forma satisfatória a IL-22 tanto *in vitro* quanto *in vivo*. No contexto de coinfeção com o vírus influenza selvagem, nosso vírus recombinante não apresentou impacto na perda de peso dos animais. Todavia, o principal achado está correlacionado a coinfeção do Flu-IL22 com *S. pneumoniae*, que apresentou redução da contagem bacteriana no BALF. Além do mais, as análises histopatológicas também oriundas de uma coinfeção entre o vírus recombinante e *S. pneumoniae*, apresentou um maior infiltrado neutrofílico septal e alvear. Diante do exposto, foi possível analisar um mecanismo de ação do Flu-IL22 durante a coinfeção com *S. pneumoniae*, através de um maior infiltrado neutrofílico e redução da contagem bacteriana no microambiente pulmonar. De um modo geral, este trabalho poderá contribuir para o enriquecimento de informações no que diz respeito a novas tecnologias terapêuticas/imunomoduladoras de modo inovador utilizando vetores virais capazes de reduzir as infecções bacterianas secundárias, representando um grande avanço para o enfrentamento dessas complicações de interesse médico.

Palavras chaves: Interleucina 22, Influenza, Genética reversa, *Streptococcus pneumoniae*.

ABSTRACT

The Influenza virus has the ability to infect a wide range of hosts, being responsible for important epidemics and pandemics throughout history. The infection by this virus leads to a deregulation of immune responses and damage to the lung epithelial barrier, predisposing the host to secondary bacterial infection, being *Streptococcus pneumoniae* one of the main pathogens involved. In view of this, by means of reverse genetics technique, a recombinant replication-deficient influenza virus carrying the murine IL-22 gene (Flu-IL22) was constructed. The constructed Flu-IL22 virus was characterized genotypically, phenotypically and functionally. The ability to produce IL-22 was evaluated both *in vitro* and *in vivo*. The immunomodulatory impact of Flu-IL22 was evaluated by sublethal co-infections of the recombinant virus with wild-type influenza virus (A/PR/8/34:H1N1) or with *S. pneumoniae* (ATCC6303) by monitoring weight loss and lung bacterial counts, respectively. In addition, histopathological analysis of lungs from animals coinfecting with Flu-IL22 virus and *S. pneumoniae* was also performed. Our results demonstrated that Flu-IL22 virus exhibits genetic stability of the heterologous insert and satisfactorily produces IL-22 both *in vitro* and *in vivo*. In the context of coinfection with wild-type influenza virus, our recombinant virus showed no impact on weight loss of animals. However, the main finding correlates with coinfection of Flu-IL22 with *S. pneumoniae*, which showed reduced bacterial counts in BALF. Moreover, the histopathological analyses also from a coinfection between the recombinant virus and *S. pneumoniae*, showed a greater septal and alveolar neutrophil infiltrate. In view of the above, it was possible to analyze a mechanism of action of Flu-IL22 during coinfection with *S. pneumoniae*, through a greater neutrophil infiltrate and reduction of bacterial count in the lung microenvironment. In general, this work may contribute to the enrichment of information regarding new therapeutic/immunomodulatory technologies in an innovative way using viral vectors capable of reducing secondary bacterial infections, representing a great advance for facing these complications of medical interest.

Key words: Interleukin 22, Influenza, reverse genetics, *Streptococcus pneumoniae*.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Desenho esquemático do vírus influenza A.....	22
FIGURA 2. Entrada do vírus influenza nas células.....	24
FIGURA 3. Coordenação da montagem e transporte da ribonucleoproteína viral (vRNP) para a membrana plasmática.....	26
FIGURA 4. Diagrama das gamas de hospedeiros dos 18 subtipos de (HA) dos IAV.....	28
FIGURA 5. Respostas imunes contra o vírus influenza.....	31
FIGURA 6. Corte transversal esquemático da parede celular do <i>Streptococcus pneumoniae</i>	35
FIGURA 7. O ciclo de vida do <i>Streptococcus pneumoniae</i> e a patogênese da doença pneumocócica.....	36
FIGURA 8. Modelo de suscetibilidade induzida pelo vírus influenza à infecção pneumocócica.....	38
FIGURA 9. Receptores e moléculas JAK-STAT da família de citocinas IL-10.....	41
FIGURA 10. Tecidos alvo e efeitos fisiológicos da IL-22.....	43
FIGURA 11. Representação esquemática do vírus influenza recombinante carreando o gene da interleucina 22 murina, construído por genética reversa.....	46
FIGURA 12. Desenho esquemático do plasmídeo pPR IL-22.....	51
FIGURA 13. Desenho esquemático da genética reversa dos vírus recombinantes.....	52
FIGURA 14. Padronização da produção dos estoques (semente e trabalho).....	54
FIGURA 15. Modelo de análise para TCID ₅₀	60
FIGURA 16. Padronização para a construção dos estoques (ES e ET) utilizando diferentes concentrações de TPCK e Neuraminidase nas m.o.i de 0,01 e 0,001.....	67

FIGURA 17. Padronização de amplificação do Flu-IL22 após suplementação de TPCK e/ou neuraminidase em 48h após infecção.....	68
FIGURA 18. Eletroforese do produto de PCR da NA do vírus recombinante Flu-IL22 (ES e ET).....	69
FIGURA 19. Fenótipo das placas de lise do vírus selvagem e vírus recombinante visualizadas em células MDCK.....	70
FIGURA 20. Caracterização da produção de IL-22 no sobrenadante dos estoques semente e trabalho.....	72
FIGURA 21. Cinética da produção de IL-22 e carga viral em células MDCK infectadas com o Vírus recombinantes Flu-IL22.....	73
FIGURA 22. Cinética da produção de IL-22 e carga viral (<i>in vivo</i>) utilizando os vírus recombinantes Flu-IL22 e Flu-Ct.....	76
FIGURA 23. Perda de peso dos animais coinoculados pelos vírus recombinantes (Flu-IL22 e Flu-Ct) com o vírus influenza selvagem H1N1 (A/PR/8/34).....	78
FIGURA 24. Carga bacteriana no BALF de camundongos inoculados com os vírus recombinantes (Flu-IL22 e Flu-Ct) e/ou <i>Streptococcus pneumoniae</i> (ATCC6303).....	80
FIGURA 25. Alterações histopatológicas e perfil inflamatório das vias aéreas pulmonares de camundongos coinoculados com os vírus recombinantes (Flu-IL22 e Flu-Ct) e/ou <i>S. pneumoniae</i>	82
FIGURA 26. Alterações histopatológicas das vias aéreas pulmonares de camundongos inoculados com os vírus recombinantes (Flu-IL22 e Flu-Ct) e/ou <i>S. pneumoniae</i> (ATCC6303).....	83

LISTA DE TABELA

TABELA 1. Iniciadores e seus respectivos ciclos utilizados para amplificação da neuraminidase contendo a sequência da IL-22 murina por PCR.....	56
TABELA 2. Protocolo de infecção e eutanásia para cinética de produção de IL-22 nos pulmões de camundongos infectados com os vírus recombinantes Flu-IL22.....	63
TABELA 3. Protocolo de coinfeção dos vírus recombinantes (Flu-IL22 e Flu-Ct) e/ou vírus selvagem H1N1 (A/PR/8/32).....	64
TABELA 4. Protocolo de coinfeção dos vírus recombinantes (Flu-IL22 e Flu-Ct) e/ou <i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC - 6303 sorotipo 3.....	64
TABELA 5. Título viral do Flu-IL22 analisado em três replicatas utilizando duas técnicas diferentes: Titulação de placa de lise sob agarose e TCID50.....	71

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°C: Grau Celsius

APCs: *Antigen Presenting Cells* - Células apresentadoras de antígenos

BALF: *Bronchoalveolar Lavage Fluid* – Fluido de Lavado Brônquio Alveolar

BIOT: Biotério de Produção

BSA: *Bovine Serum Albumin* - Albumina de Soro Bovino

CCL: Chemokine Ligands - Ligantes de Quimiocinas

CDC: *Center For Disease Control And Prevention* - Centros de Controle e Prevenção de Doenças

cDNA: *Complementary deoxyribonucleic acid* - Ácido desoxirribonucleico complementar

CEBIO: Centro de Bioterismo

Cél: Célula

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

CO₂: *Carbon Dioxide* - Dióxido de Carbono

CPS: *capsular polysaccharide* - Polissacarídeo capsular

cRNA: *complementary RNA* - RNA complementar

CXCR: Chemokine Receptor - Receptor de Quimiocina

DAPI: *4',6-Diamidino-2-Phenylindole* – 4',6-Diamidino-2-Fenilindol

DC: *Dendritic Cells* - Células Dendríticas

DMEM HG: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium High Glucose* - Meio Eagle Modificado por Dulbecco com Alta Concentração de Glicose

DMEM LG: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium Low Glucose* - Meio Eagle Modificado por Dulbecco com Baixa Concentração de Glicose

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* - Meio Eagle Modificado por Dulbecco

DNA: *Deoxyribonucleic acid'* - Ácido Desoxirribonucleico

DPI: Dias pós Infecção

ECP: Efeito Citopático

ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* – Ensaio Imunoenzimático

ES: Estoque Semente

ET: Estoques Trabalho

Flu-Ct: Vírus Influenza Recombinante Controle

Flu-IL22: Vírus Influenza Recombinante IL-22

Fw: *Forward* – Iniciador Senso

GR: Genética Reversa

h: Horas

H1N1: Vírus Influenza A Subtipo H1N1

H2N2: Vírus Influenza A Subtipo H2N2

H₂O₂: Hydrogen Peroxide - Peróxido de Hidrogênio

H3N2: Vírus Influenza A Subtipo H3N2

H&E: Hematoxilina e eosina

HA: Hemaglutinina

HEK-293T: *Human Embryonic Kidney 293T Cells* - Células Embrionárias de Rim Humano 293T

HEPES: *4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazineethanesulfonic Acid* - Ácido 2-Etanossulfônico

HI: Inibição da hemaglutinação

IAV: *Influenza A virus* - Vírus Influenza A

ICB/UFMG: Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais

IDV: Imunologia de doenças virais

IFN: *Interferon* - Interferon

IFN- γ : *Interferon Gamma* – Interferon Gama

IL-17: Interleucina 17

IL-22: Interleucina 22

IL-22BP: Proteína de ligação de IL-22

IL-22R: Receptor da IL-22

ILCs: *innate lymphoid cells* - Células linfoides inatas

IRR: Instituto René Rachou

Jak1: Janus quinase 1

Kb: Kilobases

m.o.i: *Multiplicity of Infection* - Multiplicidade de Infecção

M1: Proteína de Matriz

M2: Proteína Transmembrana de Canal Iônico

MAPK: *Mitogen-activated protein kinase* - Proteína Quinase de Ativação de Mitogênios

MARCO: *Macrophage receptor* – Receptor de macrófago

MDCK: *Madin-Darby Canine Kidney Cells* - Células de Rim Canino Madin-Darby

MHC: *Major Histocompatibility Complex* - Complexo Principal de Histocompatibilidade

M-MLV: *Moloney Murine Leukemia Virus* - Vírus da Leucemia Murina Moloney

mRNA: *Messenger RNA* - RNA mensageiro

NA: Neuraminidase

NCR: *Non-coding region* - regiões não codificadoras

NEP: *Nuclear Exporting Protein* - Proteína de Exportação Nuclear

NK: *Natural Killer Cell* - Célula Exterminadora Natural

NKT: *Natural Killer T Cell* – Célula T Exterminadora Natural

NP: Nucleoproteína

NS1: *Non-Structural 1* - Proteína Não-Estrutural 1

NS2: *Non-Structural 2* - Proteína Não-Estrutural 2

OMS: Organização mundial de saúde

ORF: *open reading frame* - janela aberta de leitura

PA: Polimerase Ácida

pb: Pares de Base

PB1: Polimerase Básica 1

PB2: Polimerase Básica 2

PBS: *Phosphate-Buffered Saline* - Salina Tamponada com Fosfato

PCR: *Polymerase Chain Reaction* - Reação em Cadeia da Polimerase

PCVs: Vacinas pneumocócicas conjugadas

pfu: *Plaque-Forming Unit* - Unidade Formadora de Placa

pg: Picogram - Picograma

PMN: polimorfonucleares

pol I: polimerase I humana

PVC: Policloreto de vinila

QIV: *Quadrivalent vaccine* - Vacina quadrivalente contra influenza

Rib Hδ: ribozima do vírus da hepatite δ

RNA: *Ribonucleic Acid* - Ácido Ribonucleico

RNP: Ribonucleoproteína

RT: *Reverse Transcriptase* - Transcriptase Reversa

rev: *reverse*

SDRA: Síndrome do desconforto respiratório agudo grave

SFB: Soro Fetal Bovino

SPF: *Specific Pathogen Free* - Isento de patógenos específicos

STAT: *Signal Transducers and Activators Of Transcription* - Transdutores de Sinal e Ativadores de Transcrição

Th17: T helper 17

Th22: T helper 22

TIV: Vacinas trivalentes sazonais contra influenza

TLR: *Receptor Toll-like* – Receptores do tipo toll

TNF: *Tumor Necrosis Factor* - Fator de Necrose Tumoral

TPCK: *N-Tosyl-L-Phenylalanine Chloromethyl Ketone* - N-Tosil-L-Fenilalanina Clorometil Cetona

TRS: Trato respiratório superior

Tyk2: Proteína tirosina quinase 2

UFC: Unidade Formadora de Colônias

ul: Microlitros

VN: *Viral neutralization* - Neutralização viral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	20
1.1 O vírus Influenza.....	20
1.1.1 Características e aspectos gerais.....	20
1.1.2 Replicação viral	22
1.1.3 Variação antigênica dos vírus influenza A (IAVs)	26
1.1.4 Transmissão, sintomatologia e diagnóstico	28
1.1.5 Prevenção das infecções pelo vírus influenza.....	29
1.2 A genética reversa do vírus influenza.....	31
1.3 Infecção bacteriana secundária	33
1.3.1 <i>Streptococcus pneumoniae</i> : Aspectos gerais.....	34
1.3.2 Mecanismos imunológicos que levam a superinfecção bacteriana durante a infecção por influenza	37
1.4 A interleucina 22 (IL-22)	40
2. OBJETIVOS	47
2.1 Objetivo geral.....	47
2.2 Objetivos específicos.....	47
3. METODOLOGIA.....	48
3.1 Delineamento experimental	48
3.2 Células.....	49
3.3 Camundongos	49
3.4 Construção do vírus influenza recombinante carreando o gene da IL-22 murina.....	50
3.4.1 Construção dos plasmídeos de transferência.....	50
3.4.2 A genética reversa	51
3.5 Padronização e produção dos estoques virais	53
3.6 Caracterização genotípica e avaliação da estabilidade genética dos estoques de vírus recombinantes	55
3.6.1 Extração de RNA viral	56

3.6.2	Síntese de cadeia simples de cDNA por transcrição reversa (RT M-MLV)	57
3.6.3	Purificação dos produtos de amplificação por PCR.....	57
3.6.4	Sequenciamento dos estoques virais (semente e trabalho)	58
3.7	Purificação viral em colchão de sacarose.....	58
3.8	Caracterização fenotípica dos estoques: quantificação viral e avaliação da produção da IL-22 <i>in vitro</i>	59
3.8.1	Titulação por placa de lise sob agarose (PFU).....	59
3.8.2	Titulação por análise de efeito citopático (TCID50)	59
3.8.3	Quantificação da citocina IL-22 por ELISA	61
3.8.4	Cinética da produção da citocina IL-22 e carga viral <i>in vitro</i> em células MDCK infectadas pelo vírus recombinante Flu-IL22.....	62
3.9	Caracterização do vírus recombinantes Flu-IL22 <i>in vivo</i>	62
3.9.1	Cinética de produção de IL-22 e carga viral nos pulmões de camundongos infectados com os vírus recombinantes Flu-IL22	62
3.10	Avaliação da perda de peso em animais inoculados com o vírus recombinantes (Flu-IL22 e Flu-Ct) e/ou vírus selvagem H1N1 (A/PR/8/32) ...	63
3.11	Avaliação do impacto da citocina IL-22 diante a coinfeccção do vírus recombinante Flu-IL22 e <i>Streptococcus pneumoniae</i>	64
3.11.1	Determinação da carga bacteriana pulmonar	64
3.12	Análises histopatológicas	65
3.13	Análises Estatísticas.....	65
4.	RESULTADOS	66
4.1	Padronização da construção dos estoques (semente e trabalho) do vírus recombinante Flu-IL22.....	66
4.2	Caracterização dos estoques virais quanto a estabilidade genética.....	68
4.3	Caracterização fenotípica e determinação do título infeccioso dos estoques virais por titulação em placa de lise sob agarose	69
4.4	Caracterização funcional dos estoques virais quanto a produção da citocina IL-22 por células infectadas.....	71
4.5	Cinética de produção da citocina IL-22 e carga viral (<i>in vitro</i>) em células MDCK infectadas com o vírus recombinante Flu-IL22.....	72

4.6	Cinética de produção da citocina IL-22 e multiplicação viral (<i>in vivo</i>) utilizando o modelo murino infectados com os vírus recombinantes Flu-IL22 e Flu-Ct.....	74
4.7	Ensaio de perda de peso e sobrevivência de camundongos inoculados com vírus recombinantes e/ou vírus selvagens (PR/8).....	77
4.8.1	Análise histopatológica dos pulmões de animais infectados com os vírus recombinantes e <i>Streptococcus pneumoniae</i>	80
5.	DISCUSSÃO	85
6.	CONCLUSÃO.....	94
7.	PERSPECTIVAS.....	95
8.	REFERÊNCIAS.....	96
9.	ANEXO 1 - Aprovação da Comissão de Ética de Uso de Animais	103

INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

1.1 O vírus Influenza

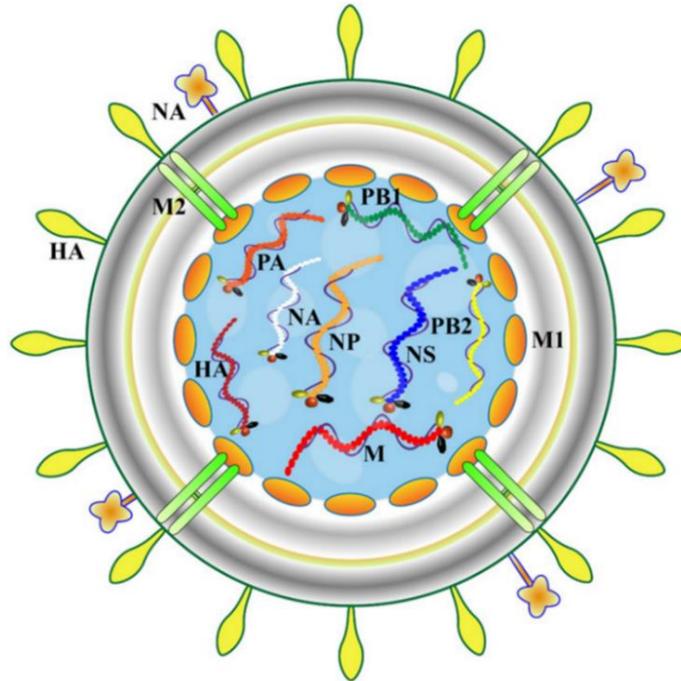
1.1.1 Características e aspectos gerais

Os vírus Influenza, são responsáveis por ocasionar infecção respiratória em várias espécies de mamíferos, gerando a doença denominada gripe, uma doença de importância clínica e epidemiológica (HAN; JEONG; JANG, 2019). Estes vírus pertencem à família *Orthomyxoviridae*, apresentam forma esférica ou filamentosa e se subdividem nos gêneros A, B, C e D (LIU *et al.*, 2020). O vírus Influenza do tipo A (IAV) é o mais relevante clinicamente para os seres humanos e possui capacidade de infectar uma ampla gama de hospedeiros, sendo responsável por importantes epidemias e pandemias ao longo da história (BOUVIER; PALESE, 2008). As infecções pelo vírus influenza geralmente causam uma doença autolimitada que varia de leve à moderada em indivíduos saudáveis, entretanto, a doença grave está associada à morbimortalidade significativa. A influenza sazonal atinge cerca de 3 a 5 milhões de casos graves e 250 a 500 mil óbitos anualmente em escala global (NYPAYER; DEHLINHER; CARTER, 2021). A gravidade das infecções por esse vírus está tanto relacionada a fatores de virulência viral quanto àqueles ligados ao hospedeiro, mais especificamente à resposta imunológica excessiva ou desbalanceada de citocinas e quimiocinas (KUIKEN *et al.*, 2012; SHORT *et al.*, 2014; ABOOD *et al.*, 2019).

No que se refere à estrutura e biologia do IAV (FIGURA 1), seu genoma viral é constituído de 8 segmentos de ácido ribonucleico (RNA) de fita única e polaridade negativa. O RNA viral encontra-se sob a forma de complexos ribonucleoproteicos (RNPs), no qual cada segmento está associado à nucleoproteína (NP) e às três proteínas do complexo polimerase, sendo: polimerase ácida (PA), polimerase básica 1 (PB1) e polimerase básica 2 (PB2); responsáveis pela replicação/transcrição viral no núcleo das células hospedeiras infectadas. Adicionalmente, os IAV codificam outras proteínas: a proteína de matriz 1 (M1), que regula a interação da ribonucleoproteína viral, a exportação nuclear e o brotamento viral; a proteína matriz

2 (M2) também se encontra inserida no envelope do vírus, sendo uma proteína transmembrana que funciona como um canal iônico para a acidificação do interior da partícula viral durante a infecção por influenza. Além das proteínas estruturais existem as proteínas não estruturais: a proteína não-estrutural 1 (NS1), que está relacionada à inibição da resposta imune do hospedeiro, mais especificamente a limitação da produção dos interferons (IFN), essa proteína também está relacionada ao processo de replicação do RNA viral, síntese de proteínas virais e modulação da fisiologia geral da célula infectada; e a *nuclear export protein* (NEP) que controla a exportação do RNPs do núcleo em direção à membrana citoplasmática, onde ocorre o processo de brotamento (HALE *et al.*, 2008; BOUVIER; PALESE, 2008; ROSSMANN; RAO, 2012) (FIGURA 1). O seu envelope viral apresenta em sua superfície duas glicoproteínas que são os principais determinantes antigênicos e os principais alvos dos anticorpos, sendo: (1) a hemaglutinina (HA), responsável pela fixação do vírus ao receptor celular (as moléculas de ácido siálico) e penetração na célula hospedeira; (2) e a neuraminidase (NA) que atua preferencialmente removendo o ácido siálico que recobre as células epiteliais do trato respiratório (onde o vírus influenza se multiplica) e do próprio vírus, evitando assim a aglutinação das partículas virais entre si e facilitando a sua propagação no meio extracelular (HALE *et al.*, 2008; BOUVIER; PALESE, 2008).

FIGURA 1. Desenho esquemático do vírus influenza A. A superfície do vírus influenza A é constituída por duas glicoproteínas HA e NA, sustentadas sobre uma bicamada lipídica, que compõe o envelope viral. Revestindo a parte interna do envelope encontra-se a proteína de matriz M1 e integrando o envelope viral encontra-se a proteína transmembrana de canal iônico M2. No interior do vírus estão localizados os RNPs constituídos de 8 segmentos de RNA fita única e polaridade negativa (PB1, PB2, PA, HA, NA, NP, M, NS) recobertos pela proteína NP e associado às proteínas do complexo de replicação (PB1, PB2 e PA).



Fonte: LI *et al.*, 2021.

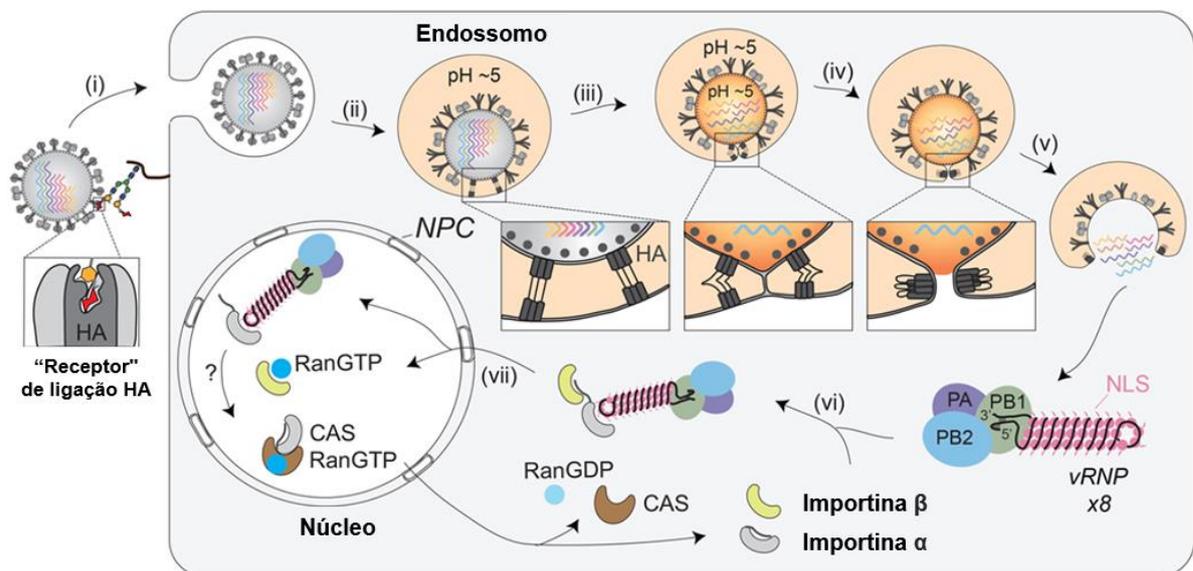
1.1.2 Replicação viral

Os IAVs iniciam o processo de infecção através das moléculas de HA presentes no envelope viral. A HA é um homotrímero que forma picos na membrana lipídica viral, esses picos se ligam preferencialmente ao ácido siálico encontrado na superfície da membrana da célula hospedeira (SKEHEL; WILEY, 2000). O precursor da HA, HA0, é composto por duas subunidades: HA1, que contém o domínio de ligação ao receptor, e HA2, que contém o peptídeo de fusão (HUANG *et al.*, 2003). Duas ligações principais são encontradas entre os ácidos siálicos e os carboidratos aos quais estão ligados nas glicoproteínas: α (2,3) e α (2,6), essas ligações são extremamente importantes para a especificidade das moléculas de HA na ligação aos receptores de ácido siálico da superfície celular encontrados em diferentes espécies. Os vírus influenza em humanos reconhecem a ligação α (2,6), enquanto em aves e equinos

reconhecem as ligações α (2,3) (DOU *et al.*, 2018). Embora essas preferências se correlacionem com as ligações de ácido siálico nos respectivos hospedeiros, estudos demonstraram que combinar as preferências de ligação do receptor HA com as ligações de ácido siálico em um determinado hospedeiro não é essencial para a infecção, mas é crítico para a transmissão (DOU *et al.*, 2018).

Após a ligação ao ácido siálico da célula hospedeira, ocorre a endocitose mediada pelo receptor celular e o vírus entra na célula hospedeira em um endossomo, esse apresenta um pH baixo em torno de 5 a 6, o que desencadeia a fusão das membranas virais e endossomais (FIGURA 2). O ambiente ácido do endossomo também abre o canal iônico M2, que atua como um canal iônico seletivo de prótons acidificando o interior viral (SAMJI, 2009). Este ambiente ácido libera o vRNP da M1 de tal forma que o vRNP fica livre para entrar no citoplasma da célula hospedeira (PINTO; LAMB, 2005).

FIGURA 2. Entrada do vírus influenza nas células. (i) IAVs iniciam a entrada na célula usando o domínio de ligação ao receptor HA (localizado na região HA1) para se associar a glicoconjugados sialilados em um receptor celular. A ligação ao receptor desencadeia a endocitose. (ii) O vírus é endocitado, e esse endossomo apresenta o pH mais baixo facilita uma mudança conformacional no HA, expondo o peptídeo de fusão (localizado na região HA2) para inserção na membrana endossomal. (iii) A conformação pré-gancho do HA começa a entrar em colapso, formando um feixe de seis hélices que promove a hemifusão do envelope viral com a membrana endossomal. O canal M2 se abre para liberar as ribonucleoproteínas virais (vRNPs) de M1 acidificando o interior viral. (iv) HA colapsa ainda em um trímero de grampos para promover a formação do poro de fusão, que (v) libera os vRNPs no citosol. (vi) Os sinais de localização nuclear expostos (NLS) nos vRNPs são reconhecidos pela proteína adaptadora importina- α , levando ao recrutamento de importina- β que (vii) facilita o transporte através do complexo de poros nucleares (NPC) e para o núcleo.



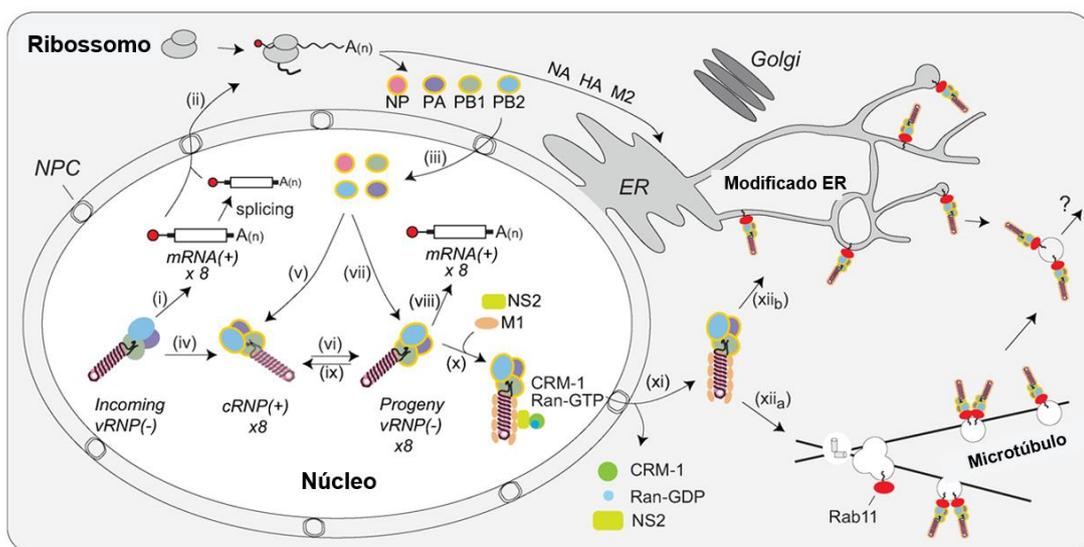
Fonte: Traduzido e adaptado de DAN *et al.*, 2018.

O tráfego do vRNP para o núcleo após o evento de fusão é altamente dependente da maquinaria da célula hospedeira e das vias de transporte importina- α e importina- β (EISFELD; NEUMANN; KAWAOKA, 2014). Apoiado por numerosos estudos, o modelo atual é que os vRNPs citoplasmáticos recém-liberados usam a via de importação nuclear importina- α –importina- β para obter entrada no nucleoplasma da célula hospedeira (DOU *et al.*, 2018). Para envolver inicialmente essa via, acredita-se que os vRNPs usem as sequências de localização nuclear expostas à superfície das numerosas moléculas de NP para recrutar a proteína adaptadora importina- α . Ao se ligar ao vRNP, a importina- α é reconhecida pelo receptor de transporte importina-

β , que direciona o vRNP para o complexo do poro nuclear, onde é transportado para o nucleoplasma (FODOR, 2013; PFLUG *et al.*, 2017).

O genoma viral do vírus influenza é composto por fitas de RNA de sentido negativo, desse modo, para que o genoma seja transcrito, primeiro ele deve ser convertido em um RNA de sentido positivo para servir de molde para a produção de RNAs virais (SAMJI, 2009). Uma vez dentro do núcleo, a RNA polimerase dependente de RNA viral heterotrimérica realiza a transcrição e replicação dos vRNAs (FODOR, 2013; PFLUG *et al.*, 2017) (FIGURA 3). A replicação do genoma do vírus influenza envolve duas etapas: transcrição de RNA complementar (cRNA), seguida de transcrição de novas cópias de vRNA usando os cRNAs como modelos. A síntese proteica do IAV é inteiramente dependente da maquinaria de tradução da célula hospedeira. Após a exportação nuclear, a tradução dos RNA mensageiros (mRNAs) virais é dividida entre ribossomos citosólicos (para PB1, PB2, PA, NP, NS1, NS2 e M1) e ribossomos associados ao retículo endoplasmático para as proteínas de membrana (HA, NA e M2). Dentro do citoplasma, os vRNPs são trafegados em direção à membrana plasmática para montagem viral por Rab11. Rab11 facilita a interação associando-se à subunidade PB2 da polimerase viral (AMORIM *et al.*, 2011), fornecendo potencialmente um mecanismo de controle de qualidade que garante que novos vírions incorporem vRNPs (FIGURA 3). Após todos esses processos, uma das etapas mais importantes que deve ocorrer antes que a partícula viral recém-formada possa deixar a membrana plasmática é a clivagem do resíduo de ácido siálico de glicoproteínas e glicolípídios. A NA facilita a liberação viral catalisando a hidrólise da ligação glicosídica que liga o ácido siálico às moléculas de açúcar subjacentes (DOU *et al.*, 2018). Ao remover os resíduos de ácido siálico, a NA impede a ligação do HA na superfície da célula, o que facilita a liberação do vírus durante brotamento para que possa se iniciar um novo ciclo de replicação (DOU *et al.*, 2018).

FIGURA 3. Coordenação da montagem e transporte da ribonucleoproteína viral (vRNP) para a membrana plasmática. Após a entrada no núcleo da célula hospedeira, (i) a polimerase viral associada ao vRNP transcreve os mRNAs virais. (ii) Os mRNAs são diretamente, ou após splicing alternativo, exportados para tradução pelos ribossomos citosólicos. (iii) Subunidades de polimerase viral recém-sintetizadas (PA, PB1 e PB2) e nucleoproteína (NP) são importadas de volta ao núcleo. (iv) Devido à iniciação de dinucleotídeos ineficiente, a polimerase viral associada a vRNP também raramente transcreve cópias de RNA complementares (cRNA) que se montam em cRNPs *via*(v) ligação de uma polimerase viral recém-sintetizada (PA, PB1 e PB2) e NP. (vi) A polimerase transcreve cópias de RNA viral (vRNA) da fita positiva nos cRNPs e estes se montam em vRNPs por (vii) associação com uma nova polimerase viral (PA, PB1 e PB2) e NP. Uma vez montados, os novos vRNPs podem (viii) transcrever mRNAs virais adicionais, (ix) transcrever novas cópias de cRNA ou (x) associar-se às proteínas virais recém-sintetizadas M1 e NS2 para facilitar o recrutamento de CRM1, que (xi) medeia a exportação nuclear do vRNP. (xii a) Uma vez exportados, os vRNPs então se associam com Rab11 que auxilia no tráfego dos vRNPs em direção à superfície da célula. O tráfego de vRNP ocorre por vesículas contendo Rab11 associadas a microtúbulos ou (xii b) através da Rab11 localizada nas membranas do retículo endoplasmático modificada.



Fonte: Traduzido e adaptado de DOU *et al.*, 2018.

1.1.3 Variação antigênica dos vírus influenza A (IAVs)

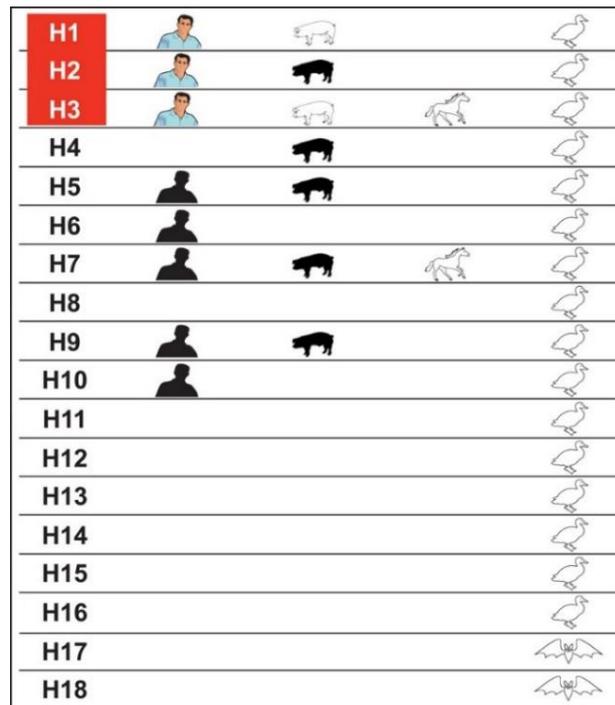
Os IAVs são responsáveis por ocasionar epidemias sazonais, isto ocorre pois o genoma viral possui alta taxa de mutação, de tal forma que os anticorpos gerados em infecções prévias ou na vacinação são incapazes de conferir proteção completa contra novas infecções. Ademais, o vírus influenza também é conhecido por ocasionar

pandemias esporádicas, as quais são resultado da transmissão direta de um vírus animal para os seres humanos, a exemplo do que ocorreu em 2009, quando um vírus suíno se adaptou aos seres humanos (SULLIVAN *et al.*, 2010). Alternativamente, pode ocorrer a troca de segmentos entre vírus humanos e animais e o surgimento de um terceiro vírus, o qual se adaptado aos seres humanos, pode provocar pandemias, como ocorreu em 1957 (gripe asiática: H2N2) e em 1968 (gripe de Hong Kong: H3N2) (HONIGSBAUM, 2020).

Um modo pelo qual as mutações podem alterar as proteínas de superfície (HA e NA) é denominada deriva antigênica ou *antigenic drift*, caracterizada por mutações pontuais e cumulativas inseridas durante o processo replicativo viral (DUFFY; SHACKELTON; HOLMES, 2008; MCHARDY; ADAMS, 2009). Esse processo permite a evolução antigênica viral pela seleção de novas variantes contendo alterações de aminoácidos nas proteínas HA e/ou NA. Outro modo pelo qual essa mudança genética pode ocorrer é denominada rearranjo antigênico ou *antigenic shift*, em que ocorre troca de um ou mais segmentos entre vírus diferentes, o que pode levar ao surgimento de um novo subtipo de influenza (SHINDE *et al.*, 2009; SMITH *et al.*, 2009).

Até o momento, três subtipos HA dos IAV (H1N1, H2N2 e H3N2) foram os únicos responsáveis por ocasionar pandemias em seres humanos no último século conforme (FIGURA 4). A literatura apresenta a transmissão ocasional de gripe aviária para humanos com as HA (H5, H6, H7, H9 e H10), essa transmissão pode ocasionar doença variando de leve a moderada, mas não apresentam transmissão consistente estabelecida de humano para humano (FIGURA 4). A passagem do IAV estabelecido em aves para mamíferos requer diversas adaptações do vírus de modo que favoreça a sua multiplicação e disseminação, essas mudanças incluem a temperatura ótima de replicação do vírus diminuindo de 40°C (aviário) para 37°C (mamífero); o local de replicação mudando de intestinal para respiratório; e a especificidade do receptor mudando de ácido siálico α 2,3 para ácido siálico α 2,6. Desse modo, estudos se intensificam para evitar que essas transferências interespecies de IAV ocorram, a fim de reduzir potenciais novos vírus pandêmicos (WEBSTER; GOVORKOVA, 2014).

FIGURA 4. Diagrama das gamas de hospedeiros dos 18 subtipos de (HA) dos IAV. Os desenhos abertos indicam hospedeiros nos quais linhagens estáveis são estabelecidas. Os desenhos preenchidos indicam hospedeiros nos quais ocorreu a transmissão esporádica, mas não consistente. Os subtipos de HA destacados em vermelho indicam subtipos de IAV que causaram influenza pandêmica ou epidêmica em humanos. As transmissões esporádicas de H4, H5, H6, H7, H9 e H10 para humanos porcos aumentaram desde meados da década de 1990, mas nenhuma transmissão consistente entre hospedeiros ocorreu.



Fonte: WEBSTER; GOVORKOVA, 2014.

1.1.4 Transmissão, sintomatologia e diagnóstico

A transmissão do vírus ocorre através do contato próximo com pessoas contaminadas que ao tossir, espirrar ou até mesmo falar, liberam nas gotículas e secreções de origem respiratória uma grande carga viral. A transmissão também pode acontecer de forma indireta através do contato das mãos com superfícies contaminadas por secreções respiratórias de uma pessoa infectada, nessa situação, o indivíduo leva as partículas virais das mãos diretamente para as mucosas (GIRARD *et al.*, 2010). Além do mais, tem sido implicada a transmissão por via aérea (partículas ≤ 5 microns que permanecem suspensas no ar através de aerossolização de gotículas

que podem ocorrer com cantos, gritos e procedimentos médicos específicos, por exemplo, processo de intubação orotraqueal, uma vez que, os IAV podem permanecer infecciosos em superfícies que não sejam o corpo por longos períodos, podendo variar de dias a semanas (NYPAVER; DEHLINGER; CARTER, 2021). O período de incubação do vírus endêmico H1N1, por exemplo, é de 2 a 7 dias, grande parte dos indivíduos contaminados já começam a eliminar o vírus um dia antes do início dos sintomas (GAITONDE; MOORE; MORGAN, 2019). Pessoas de todas as idades são suscetíveis à infecção pelo vírus influenza, porém alguns grupos estão mais propensos a desenvolver formas graves da doença (pneumonia viral ou bacteriana, bronquite, sinusite, infecções de ouvido e agravamento de problemas crônicos de saúde preexistentes), nesse sentido, destacam-se as gestantes, puérperas, idosos, crianças com menos de cinco anos, imunossuprimidos, indivíduos que apresentam doenças crônicas (asma, insuficiência cardíaca congestiva, diabetes, etc. e obesidade (GAITONDE; MOORE; MORGAN, 2019; UYEKI *et al.*, 2018). Os sinais e sintomas aparecem na maioria dos casos de forma abrupta, sendo mais comum o aparecimento de tosse seca, febre de aproximadamente 38°C (a febre geralmente é mais elevada e persistente em crianças), dor de garganta, mal-estar e dor de cabeça, as queixas respiratórias tornam-se mais evidentes com a progressão da doença e mantêm-se, em geral, por três a quatro dias após o desaparecimento da febre (BRASIL, 2017). O diagnóstico da gripe é sobretudo clínico, baseado em sinais e sintomas. A confirmação laboratorial também é utilizada, quando necessário, para determinar o manejo clínico do paciente, em especial para aqueles que pertencem ao grupo de risco e apresentam alto risco para as complicações da gripe (NYPAVER; DEHLINGER; CARTER, 2021).

1.1.5 Prevenção das infecções pelo vírus influenza

A vacinação contra influenza é a principal medida de proteção e o método mais econômico para prevenir infecções e estão no mercado desde a década de 1930. A rápida disponibilidade de vacinas contra a influenza sazonal para a população mundial pode ser relacionada a um dos fatores-chave para uma cobertura vacinal eficaz, embora esse fator seja dependente da adesão da população as campanhas vacinais

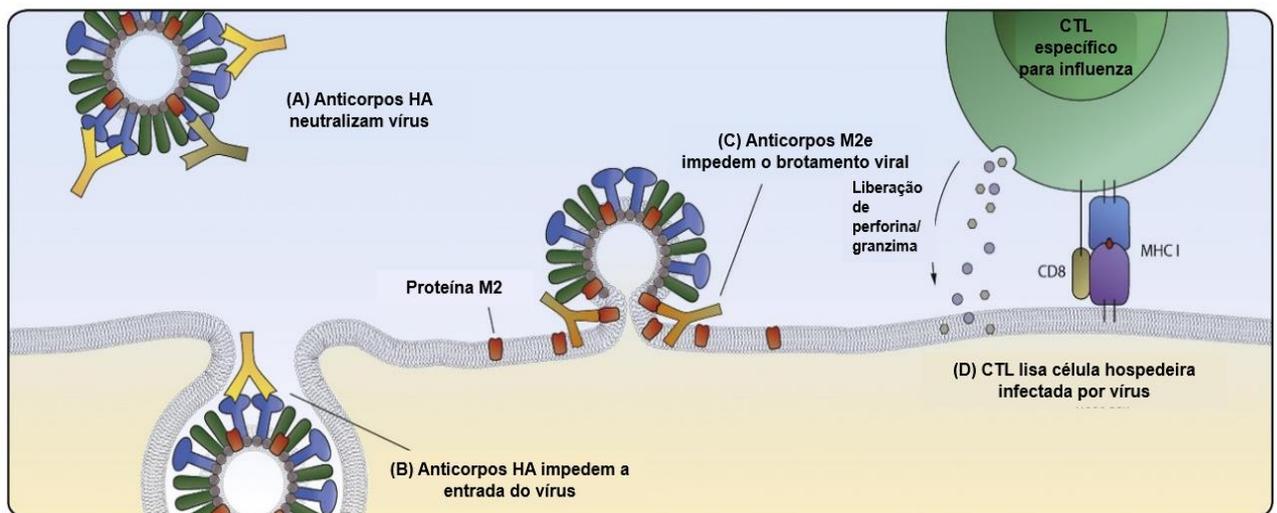
ofertadas pelo calendário anual de vacinação (SOEMA *et al.*, 2015; NYPAYER; DEHLINHER; CARTER, 2021). A eficácia da vacina para influenza é de cerca de 60%, todavia, se a vacina não corresponder às cepas circulantes atuais do vírus, essa eficiência pode atingir níveis baixos entre 10% e 20%. A eficiência global estimada das vacinas contra a gripe é de 38%, sendo a pior resposta imunológica relacionada a idosos (GROHSKOPF *et al.*, 2019). O processo de desenvolvimento de vacinas ocorre de forma anual, uma vez que, o centro de controle e prevenção de doenças (CDC) realiza anualmente a caracterização antigênica em cerca de 2.000 cepas do vírus influenza circulantes, com a finalidade de monitorar a deriva ou mudança antigênica desses vírus, comparando-os com os vírus incluídos na vacina atual contra gripe. Além disso, a caracterização antigênica ajuda os especialistas do CDC em suas recomendações sobre quais vírus incluir na próxima vacina contra a gripe sazonal (NYPAYER; DEHLINHER; CARTER, 2021).

As vacinas atuais contra a gripe induzem anticorpos neutralizantes contra as proteínas de superfície da membrana viral HA e NA (REPERANT; RIMMELZWAAN; OSTERHAUS, 2014). As formulações atuais englobam vacinas trivalentes sazonais contra influenza (TIV) que contêm antígenos de influenza inativados ou vírus influenza atenuados vivos, derivados de duas cepas de influenza A (H1N1 e H3N2) e uma cepa de influenza B (Victoria ou Yamagata). Além das formulações de TIV, as formulações de vacina quadrivalente contra influenza (QIV) também são utilizadas, sendo a elas adicionada uma segunda cepa de influenza B (Victoria e Yamagata). Ademais, várias vacinas pandêmicas foram desenvolvidas na preparação de possíveis futuros surtos de cepas de influenza altamente patogênicas (SOEMA *et al.*, 2015).

A eficácia das vacinas contra a gripe é determinada pela presença de títulos adequados de inibição da hemaglutinação (HI) ou neutralização do vírus (VN) em indivíduos vacinados. Os títulos de HI indicam respostas de anticorpos contra HA, que não são reativas cruzadas e não protegem contra cepas de influenza incompatíveis. Os títulos de VN indicam respostas de anticorpos que são capazes de neutralizar o vírus influenza e, portanto, podem ser potencialmente aplicadas para vacinas de resposta imunológica cruzada. A indução de respostas imunes contra epítopos novos e mais conservados, além dos epítopos variáveis de HA, tem estado sob a atenção nos últimos anos (FIGURA 5). Estes incluem vacinas que induzem

anticorpos direcionados contra regiões específicas de HA e ectodomínios da proteína de matriz M2, e vacinas que induzem respostas celulares contra proteínas internas da gripe. Essas vacinas podem ser a base de uma vacina universal contra a gripe (SOEMA *et al.*, 2015).

FIGURA 5. Respostas imunes contra o vírus influenza. (A) Anticorpos reativos à cabeça ou pedúnculo HA neutralizam o vírus. (B) Anticorpos específicos de HA impedem a ligação do vírus e a entrada nas células hospedeiras. (C) Anticorpos específicos de M2 impedem o brotamento e liberação de partículas virais produzidas em células hospedeiras infectadas. (D) As células T citotóxicas reconhecem epítopos de proteínas internas da influenza apresentada na superfície da célula hospedeira por moléculas de complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe I e subsequentemente lisam a célula hospedeira infectada através da liberação de perforina e granzima.



Fonte: Traduzido e adaptado de SOEMA *et al.*, 2015.

1.2 A genética reversa do vírus influenza

A tecnologia de genética reversa (GR) contribui para uma plasticidade à biologia molecular do vírus influenza, desse modo se destacou como uma ferramenta indispensável no que tange os estudos dos diversos aspectos da biologia do vírus influenza. Em adição, essa tecnologia impulsionou os estudos de utilização do vírus influenza como vetor para a construção de vacinas recombinantes e imunomodulador terapêutico (NEUMANN; KAWAOKA, 2002). Os vírus influenza apresentam características relevantes que os tornam candidatos notáveis nos modelos vacinais e

imunoterapêuticos de interesse médico e veterinário, dentre as quais, o fato de que eles não persistem no organismo, não se integram ao genoma do hospedeiro e possuem a capacidade de induzir uma resposta imune heteroespecífica (ROCHA *et al.*, 2004; LI; AREVALO; ZENG 2013). Além disso, a existência de diferentes variantes e subtipos de IAV torna possível a realização de um esquema vacinal utilizando-se dois subtipos ou variantes dos vírus influenza, eliminando assim os problemas relativos à resposta imune pré-existente dirigida contra o vetor (ROCHA *et al.*, 2004).

De forma resumida, a técnica de GR utilizada para influenza consiste na transfecção de células permissivas pelos plasmídeos que codificam cada um dos oito segmentos do vírus influenza A. Nesse tipo de construção, a expressão das sequências virais se encontra sob o controle de promotores das RNA polimerases humanas I e/ou II, as quais permitem a reconstituição de RNPs funcionais nas células transfectadas. Desta forma, ocorre a replicação dos segmentos virais, a transcrição do RNAm, tradução das proteínas virais e, conseqüentemente, a síntese de novas partículas do vírus influenza (HOFFMANN *et al.*, 2000).

Em 2003, Kawaoka e colaboradores demonstraram que a sequência codificadora da NA poderia deletada de forma parcial e então substituída por uma sequência heteróloga. Esse tipo de construção conservava cerca de 150 nucleotídeos das regiões codificadoras adjacentes às regiões 3' e 5' não codificadoras (NCR), além dos nucleotídeos destas regiões 3' e 5' NCR, as quais contêm os mínimos sinais necessários para que ocorra o processo de transcrição, replicação e empacotamento desse segmento (FUJII *et al.*, 2003). Esse processo é importante, uma vez que, mesmo estando fora do contexto de uma janela aberta de leitura (ORF - *open reading frame*), tais nucleotídeos são importantes para o processo de empacotamento dos segmentos do vírus influenza dentro da partícula viral (GIESE; BOLTE; SCHWEMMLE, 2016). Este tipo de abordagem permitiu a construção de vírus influenza recombinantes defectivos para a multiplicação, carreando sequências heterólogas de antígenos que são capazes de induzir resposta imune heterosubtípica, demonstrando assim a aplicabilidade e segurança desse tipo de construção para o desenvolvimento de vacinas recombinantes (SHINYA *et al.*, 2004; DE GOEDE *et al.*, 2009; MARTINA *et al.*, 2011)

Estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram que o vírus influenza recombinante carreando o segmento truncado da neuraminidase é atenuado e seguro para experimentos *in vitro* e *in vivo*, mesmo em camundongos desprovidos

de componentes do sistema imune inato ou adquirido (BARBOSA *et al.*, 2014). Ao longo dos últimos anos, nosso grupo construiu vírus influenza recombinantes carreando segmentos da neuraminidase com deleções parciais da ORF e sequências heterólogas tais como antígenos de patógenos, genes sinalizadores (RFP e GFP), além de citocinas murinas.

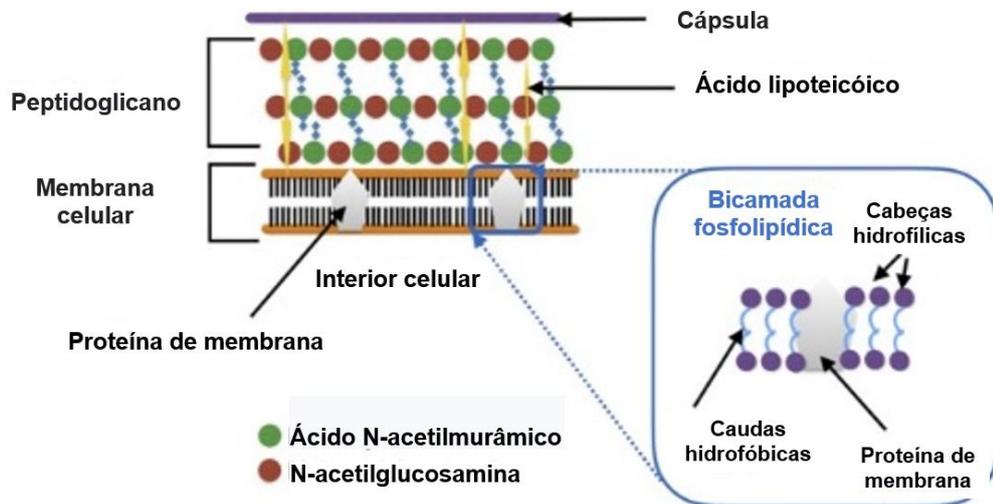
1.3 Infecção bacteriana secundária

Embora a maioria das infecções pelo vírus influenza resulte em infecção pulmonar leve a moderada, alguns casos podem evoluir para doença grave e o aumento da morbimortalidade. De um modo geral, o prognóstico negativo da doença está associado à pneumonia bacteriana secundária causada principalmente por *Staphylococcus aureus* ou *Streptococcus pneumoniae* (RYNDA-APPLE; ROBINSON; ALCORN, 2015), esse processo pode ocorrer devido a desregulação da resposta imune e danos ao revestimento epitelial pulmonar (ABOOD *et al.*, 2019; RYNDA-APPLE; ROBINSON; ALCORN, 2015). No último século, a humanidade vivenciou quatro pandemias de gripe que impactaram todo o mundo. Em 1918, o IAV H1N1 infectou cerca de 500 milhões de pessoas em todo o mundo e resultou no óbito de mais de 50 milhões de pessoas. Apenas uma pequena porcentagem (<5%) dos óbitos ocorreram de forma precoce relacionados a síndrome do desconforto respiratório agudo grave (SDRA), em contrapartida, os demais óbitos ocorreram no período de 7-14 dias pós-infecção (DPI), esses foram relacionados com broncopneumonia, com bactérias patogênicas cultivadas da autópsia. Entre as espécies bacterianas pneumopatogênicas causadoras, o *S. pneumoniae* foi o patógeno bacteriano mais comumente identificado. Esses dados implicam fortemente a infecção pelo vírus influenza combinada com a superinfecção bacteriana como a principal causa de mortalidade durante as pandemias de influenza (RYNDA-APPLE; ROBINSON; ALCORN, 2015). Apesar da introdução de antibióticos e vacinas contra influenza, as mortes por pneumonia bacteriana secundária continuam sendo um problema de saúde pública (BAKALETZ, 2017).

1.3.1 *Streptococcus pneumoniae*: Aspectos gerais

O *S. pneumoniae* (também conhecido como pneumococo) é um patógeno oportunista gram-positivo (FIGURA 6), extracelular que coloniza as superfícies mucosas do ser humano no trato respiratório superior (TRS) (WEISER; FERREIRA; PATON, 2018). Esta bactéria é um anaeróbio facultativo que é frequentemente encontrado como diplococos (BRIDY-PAPPAS *et al.*, 2005). Atualmente, existem pelo menos 97 sorotipos de *S. pneumoniae* que foram identificados e caracterizados (GENO *et al.*, 2015). Grande parcela da população são colonizados pelo *S. pneumoniae* e para a maioria desses indivíduos, este evento é completamente assintomático. A depender das condições geográficas e socioeconômicas, oito a cada dez crianças pré-escolares saudáveis são colonizadas por *S. pneumoniae* em um determinado momento (27-65%), por outro lado, as taxas de colonização pneumocócica são significativamente menores em indivíduos mais velhos (~10%), isso reflete uma relação comensal entre a bactéria e o hospedeiro. Embora os correlatos imunológicos exatos da proteção contra nova colonização pneumocócica continuem a ser objeto de discussões, sugere-se que anticorpos e imunidade celular desempenham um papel importante (WEISER; FERREIRA; PATON, 2018; SHORT *et al.*, 2012).

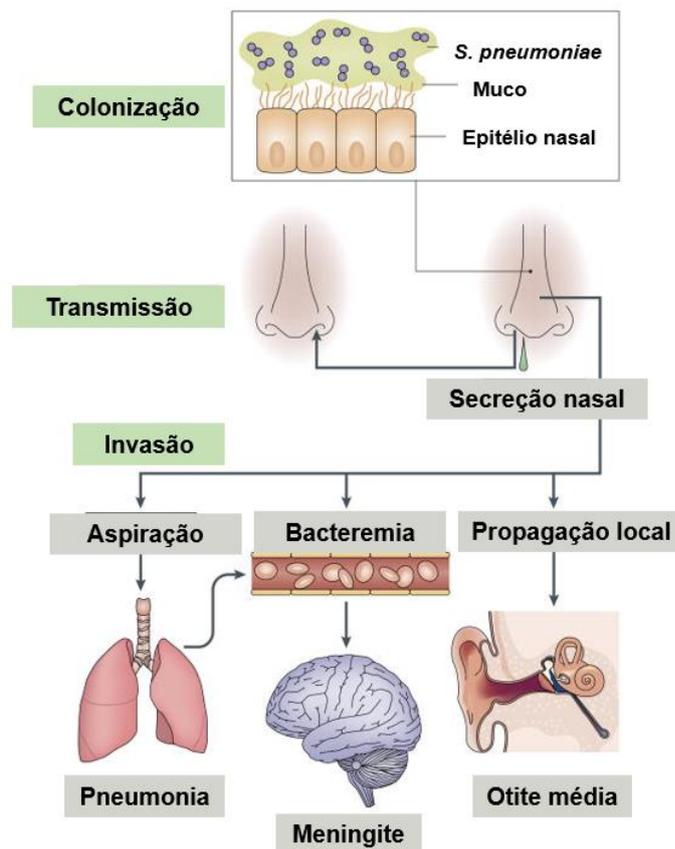
FIGURA 6. Corte transversal esquemático da parede celular do *Streptococcus pneumoniae*. A parede celular bacteriana é composta por ácidos teicóicos, uma espessa camada de peptidoglicano e uma bicamada fosfolipídica.



Fonte: Traduzido e adaptado de BROOKS; MIAS, 2018.

A colonização nasofaríngea, embora em alguns casos seja assintomática, marca o primeiro passo no desenvolvimento da doença pneumocócica invasiva (FIGURA 7) (BOGAERT; GROOT; HERMANS, 2004). A transição da colonização para a doença ocorre com a disseminação local, aspiração ou disseminação para a corrente sanguínea resultando em doenças inflamatórias invasivas. Quando a bactéria supera as defesas imunológicas da mucosa da nasofaringe-orofaringe e se dissemina para a cavidade do ouvido médio (otite média), trato respiratório inferior (pneumonia), sangue (sepse) e/ou meninges (meningite). Existem inúmeros fatores relacionados aos hospedeiros, ambientais e microbianos que definem a suscetibilidade de um indivíduo a desenvolver doença pneumocócica. No entanto, um dos fatores de suscetibilidade mais bem caracterizados é uma infecção recente ou concomitante por um vírus respiratório, em particular pelo vírus influenza (SHORT *et al.*, 2012).

FIGURA 7. O ciclo de vida do *Streptococcus pneumoniae* e a patogênese da doença pneumocócica. O *S. pneumoniae* coloniza a mucosa do (TRS). Este transporte é o pré-requisito tanto para a transmissão para outros indivíduos quanto para a doença invasiva no portador. Os portadores podem liberar o *S. pneumoniae* nas secreções nasais e, assim, transmitir a bactéria. A disseminação além de seu nicho ao longo do epitélio nasal, seja por aspiração, bacteremia ou disseminação local, pode levar a doenças invasivas, como pneumonia, meningite e otite média.



Fonte: Traduzido e adaptado de WEISER; FERREIRA; PATON, 2018.

Em 2017, a organização mundial de saúde (OMS) incluiu o *S. pneumoniae* como um dos 12 patógenos prioritários existentes, isso se deve, sobretudo, ao aumento das taxas de resistência à penicilina e outros antibióticos (WEISER; FERREIRA; PATON, 2018). O *S. pneumoniae* é disseminado por gotículas no ar e estima-se que cause cerca de quatro milhões de doenças nos Estados Unidos e cerca de 450.000 hospitalizações por ano (BROOKS; MIAS, 2018). O uso das vacinas pneumocócicas conjugadas (PCVs) reduziu a doença invasiva dos sorotipos com os tipos de polissacarídeo capsular (CPS) que estão incluídos na vacina 10 a 13 dos 97 tipos de CPS conhecidos (WHITNEY *et al.*, 2003). A notável capacidade do *S.*

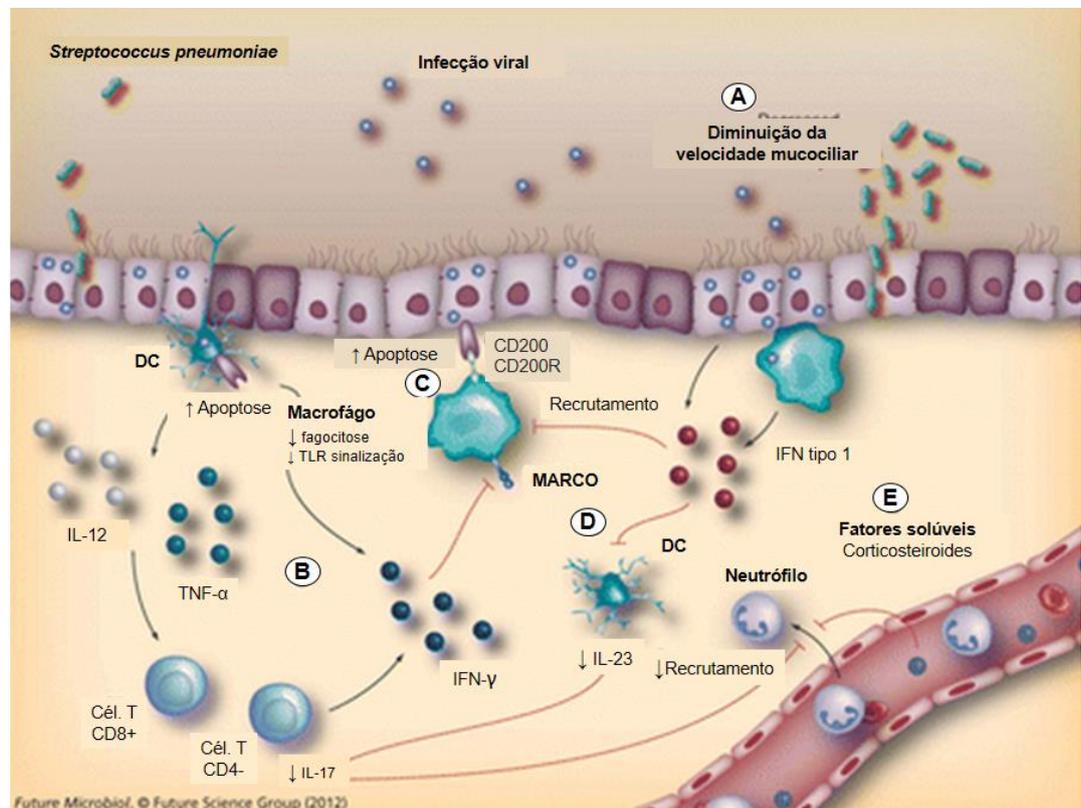
pneumoniae de remodelar seu genoma através da captação e incorporação de DNA exógeno (*natural competence*) de outros pneumococos ou estreptococos orais intimamente relacionados facilitou a disseminação da resistência aos antibióticos e a evasão da imunidade preexistente induzida pela vacina. A proeminência de *S. pneumoniae* como causa de doença é devido à combinação de altas taxas de transmissão, sua adaptabilidade genética e sua capacidade de mudar de uma interação comensal para uma patogênica com seu hospedeiro (WEISER; FERREIRA; PATON, 2018).

1.3.2 Mecanismos imunológicos que levam a superinfecção bacteriana durante a infecção por influenza

O IAV interrompe as funções da barreira respiratória induzindo, de forma direta ou indireta (através de monócitos inflamatórios) a morte de células epiteliais e degradação de mucinas. Essa alteração leva à exposição de novos locais de fixação para bactérias e permite a translocação bacteriana (FIGURA 8). O IAV também pode alterar a função ciliar respiratória, prejudicando assim a depuração das bactérias aspiradas dos pulmões. Em particular, o controle bacteriano deficiente no contexto de infecção prévia por IAV é devido à perda e/ou disfunção da atividade de macrófagos e neutrófilos (PAGET; TROTTEIN, 2019).

FIGURA 8. Modelo de suscetibilidade induzida pelo vírus influenza à infecção pneumocócica.

(A) Após a entrada nas células epiteliais, a replicação viral diminui a velocidade mucociliar, afetando adversamente a eliminação do *S. pneumoniae* do muco. (B) A infecção pelo vírus influenza resulta na produção de IFN- γ dependente de IL-12 e TNF- α pelas células T, bem como na produção endógena de IFN- γ pelas APCs. O IFN- γ regula negativamente o receptor MARCO, expresso pelos macrófagos alveolares, o que leva à inibição da fagocitose bacteriana. (C) Em resposta à infecção pelo vírus influenza, as DCs, assim como outros tipos de células, apresentam apoptose aumentada. As células imunes apoptóticas aumentam sua expressão de superfície de CD200, que pode posteriormente se ligar a CD200R expresso em DCs mieloides e macrófagos. O envolvimento de CD200R resulta na dessensibilização sustentada a estímulos bacterianos. (D) A produção de IFNs tipo I por células epiteliais e células imunes inatas também inibe o recrutamento de PMNs e macrófagos da periferia através do eixo IL-23-IL-17. (E) O influxo de PMN também é reduzido pela liberação de corticosteróides.



Fonte: Traduzido e adaptado de SHORT *et al.*, 2012.

A disfunção de neutrófilos polimorfonucleares (PMN) induzida por IAV é considerada um componente chave das coinfeções virais-bacterianas, uma vez que, os neutrófilos são importantes no controle de infecções pneumocócicas (STANDISH *et al.*, 2009). Os macrófagos também apresentam um papel importante no que tange o controle da colonização pneumocócica. No contexto de coinfeção entre IAV e *S. pneumoniae*, os macrófagos apresentam uma diminuição da ligação e fagocitose do

pneumococo (SUN; METZGER, 2008), isso ocorre devido à produção de *interferon-gamma* (IFN- γ) pelas células T ativadas. O IFN- γ regula negativamente o *macrophage receptor* (MARCO) como representado na figura 6, resultando em uma redução na funcionalidade antibacteriana dos macrófagos. O IAV também causa dessensibilização prolongada de macrófagos alveolares aos ligantes bacterianos do *receptor Toll-like* (TLR), como flagelina (TLR5), lipopolissacarídeo (TLR4) e ácido lipoteicóico (TLR2). Este efeito de dessensibilização pode perpetuar por vários meses, devido à longevidade dos macrófagos residentes das vias aéreas. Macrófagos 'dessensibilizados' reduzem a produção de quimiocinas, ativação de NF- κ B e, conseqüentemente, recrutam menos neutrófilos para o local da infecção (SHORT *et al.*, 2012).

Além de afetar uma variedade de leucócitos diferentes, a infecção por IAV também pode desencadear a produção de vários mediadores solúveis, incluindo interferons do tipo I (IFNs). A produção de IFNs tipo I resultou em apoptose de neutrófilos, leucopenia e, como resultado, aumento do crescimento bacteriano (NAVARINI *et al.*, 2006). Os IFNs do tipo I induzidos por vírus também podem desempenhar um papel no aumento da colonização pneumocócica após a infecção pelo IAV (LODOEN; LANIER, 2006). Além do mais, ocorre a inibição da produção de quimiocinas (CXCL1 e CXCL2) importantes para o recrutamento de macrófagos e neutrófilos para o pulmão, prejudicando assim, suas respostas fagocitárias. Por fim, a infecção pelo IAV reduz, por meio do transdutor de sinal de ativação e transcrição-1 (STAT-1), a produção de citocinas relacionadas ao Th17, uma família crítica de citocinas envolvidas no controle de infecções bacterianas respiratórias (PAGET; TROTTEIN, 2019). Em suma, dois mecanismos principais (mecânicos e imunológicos) explicam a superinfecção bacteriana pós-influenza: perda da função de barreira epitelial e defesa imune inata alterada (PAGET; TROTTEIN, 2019).

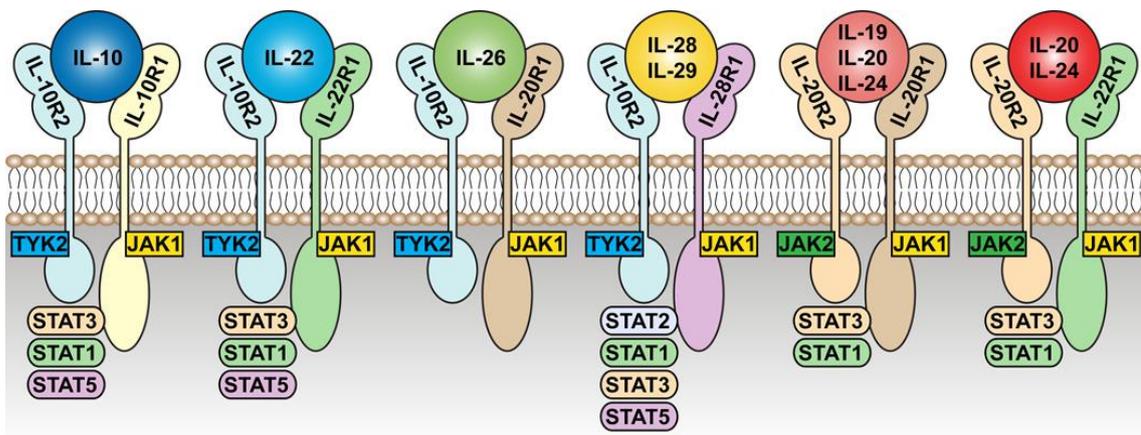
1.4 A interleucina 22 (IL-22)

A interleucina 22 (IL-22) está emergindo como um importante modulador das respostas teciduais durante a inflamação em diversos tecidos. Essa citocina pertence à família IL-10, uma família de citocinas que é agrupada com base em sua semelhança estrutural, uso de receptor comum e alvos de sinalização semelhantes a jusante (OUYANG; O'GARRA, 2019). Inicialmente, a IL-22 foi descrita como uma citocina TH17, uma vez que, sua produção foi observada dentro das mesmas células que produzem a interleucina 17 (IL-17), todavia, estudos posteriores indicaram que ela pode ser gerada independentemente de IL-17 (DUDAKOV; HANASH; BRINK, 2015; SHABGAH *et al.*, 2017).

A IL-22 apresenta estrutura α -helicoidal, composta por seis α -hélices e alças de conexão, seu receptor IL-22R é um receptor de citocina Tipo 2 e membro da família de receptores IL-10 (FIGURA 9). O receptor é composto por duas subunidades heterodiméricas, IL-22R1 e IL-10R2. A IL-22R1 define a especificidade da IL-22, pois é predominantemente expressa em células epiteliais do trato gastrointestinal, trato urogenital, pulmão e pele, mas está ausente nas células hematopoiéticas desses tecidos (SABIHI *et al.*, 2020). Estudos de ligação revelaram que a IL-22 tem uma alta afinidade para IL-22R1, mas nenhuma afinidade para IL-10R2, no entanto, existe uma forte afinidade de ligação da subunidade IL-10R2 para a IL-22-Complexo-IL-22R1 (BLEICHER *et al.*, 2008). Através do IL-22R1 ligado à membrana, o IL-22 é capaz de realizar a sinalização do sistema imunológico para o tecido. Estes dados sugerem que a ligação inicial de IL-22 à subunidade IL-22R1 permite a ligação secundária da subunidade IL-10R2, permitindo assim a sinalização a jusante (DUDAKOV; HANASH; BRINK, 2015). A ativação do IL-22R1 leva a uma ativação da Janus quinase 1 (Jak1) e da proteína tirosina quinase 2 não receptora (Tyk2), essa ativação leva à fosforilação do resíduo de tirosina de STAT3. Além de STAT3, a STAT1 e STAT5 também são ativados por IL-22 (LEJEUNE *et al.*, 2002; WOLK *et al.*, 2004). Distintas vias adicionais foram descritas como envolvidas na sinalização de IL-22, incluindo as vias da proteína quinase de ativação de mitogênios (MAPK), Akt (SEKIKAWA *et al.*, 2010) e vias p38 (ANDOH *et al.*, 2005; SABIHI *et al.*, 2020). Essa citocina é produzida predominantemente pelas células T helper 17 (Th17), T helper 22 (Th22) e células

linfóides inatas do tipo 3 (ILC3) (SABIHI *et al.*, 2020). Outras fontes celulares de IL-22 incluem células T $\gamma\delta$, neutrófilos e células *T Natural Killer* (NKT) (DUDAKOV; HANASH; BRINK, 2015).

FIGURA 9. Receptores e moléculas JAK-STAT da família de citocinas IL-10. A IL-22 é um membro da família de citocinas IL-10, todas as quais compartilham características comuns em seus receptores. O IL-22R é composto por duas subunidades: a subunidade comum IL10R2 e a subunidades IL-22R1. Cada um desses receptoras sinaliza através de componentes da via JAK-STAT, embora haja evidências de que a IL-22 também possa sinalizar através das vias p38 e MAP quinase.



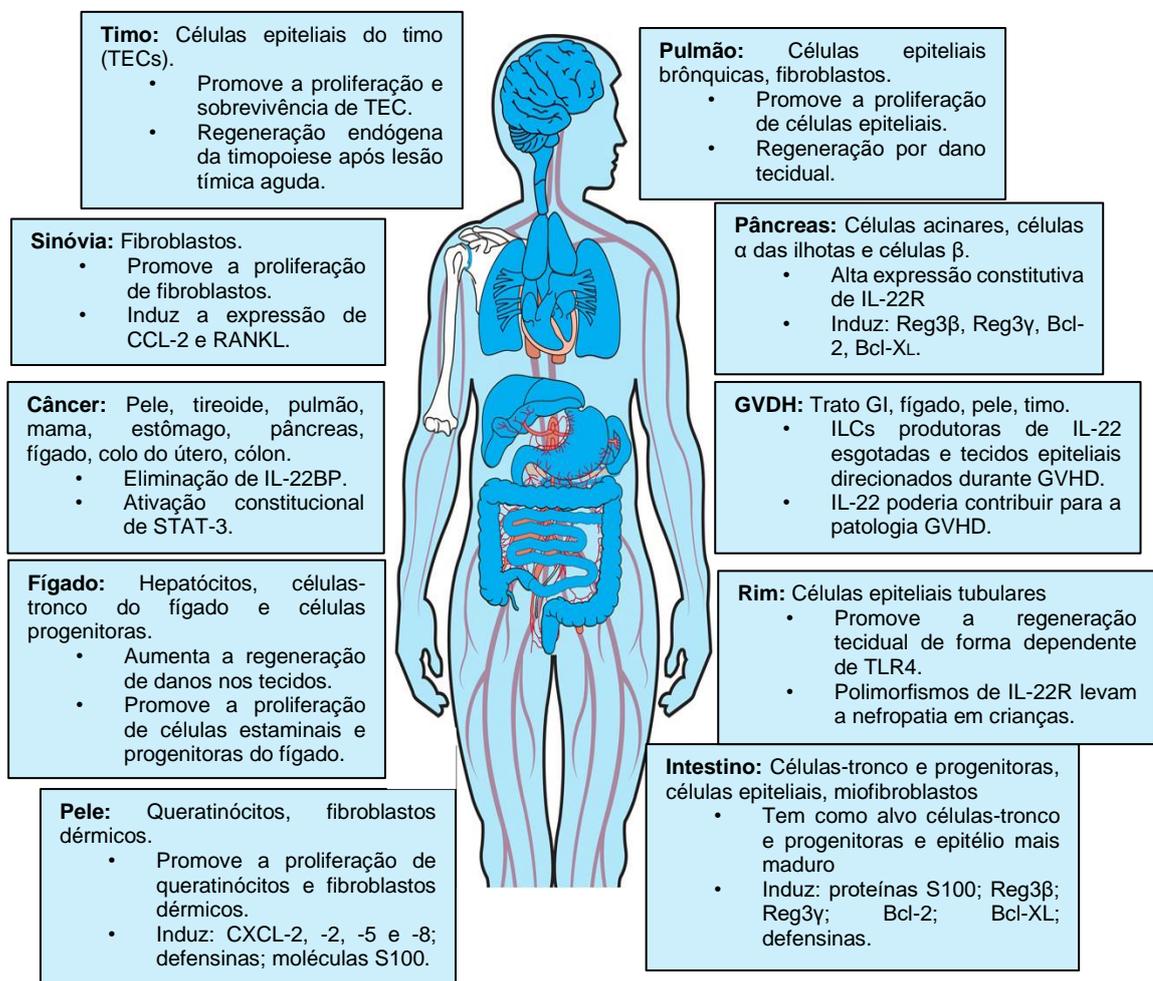
Fonte: DUDAKOV; HANASH; BRINK, 2015.

A IL-22 está envolvida em diversos processos do sistema imunológico, a medida em que é um modulador ativo na preservação de um epitélio intacto, além de estar relacionada a uma microbiota equilibrada (trato gastrointestinal) e atuar em um sistema de defesa funcional contra ameaças externas (ZENEWICZ *et al.*, 2008; PICKERT *et al.*, 2009; ZENEWICZ *et al.*, 2013). A IL-22, apresenta importantes funções em uma ampla gama de tecidos (FIGURA 10), incluindo fígado, pulmão, pele, timo, pâncreas, rim, trato gastrointestinal, tecidos sinoviais, coração, tecido adiposo, mama e olho (DUDAKOV; HANASH; BRINK, 2015). Além de apresentar papel nesses tecidos, a IL-22 também é conhecida por atuar em diversas doenças como psoríase, doença inflamatória intestinal, artrite, infecções bacterianas e câncer.

Uma vez que essa citocina é produzida em locais de inflamação, ela pode estar mediando uma resposta fisiológica para reparar o dano tecidual local ou pode estar contribuindo para a inflamação fisiopatológica. Dessa forma, estudos consideram que essa citocina possui um papel dual em situações fisiopatológicas, uma vez que

apresenta efeitos protetores em locais de barreira que se encontram expostos a estímulos externos em um cenário agudo, em contrapartida diante de uma inflamação crônica pode ocorrer uma desregulação da sinalização de IL-22, podendo promover danos teciduais e câncer (SABIHI *et al.*, 2020; DUDAKOV; HANASH; BRINK, 2015). Há extensa evidência de que a IL-22 medeia a proteção e regeneração de tecidos epiteliais em modelos experimentais, incluindo hepatite, pancreatite, colite e lesão tímica (DUDAKOV; HANASH; BRINK, 2015). No entanto, essas observações não se aplicam em todos os modelos de doenças, uma vez que essa citocina pode induzir a expressão de moléculas pró-inflamatórias, incluindo IL-1, IL-6, IL-8, IL-11, GCSF, GMCSF e proteína de ligação a LPS (ANDOH *et al.*, 2005; SCHULZ *et al.*, 2008; WEBER *et al.*, 2007). Potenciais efeitos patológicos dessa citocina podem estar relacionados a outras citocinas co-expressas com IL-22. Estudos propuseram que a patologia relacionada à IL-22 pode ser devido ao "priming" do tecido por interferons do tipo I que desviam a sinalização de IL-22 de STAT-3 para uma resposta STAT-1 (ZHANG *et al.*, 2011). Além disso, IL-17 e IL-19 têm efeitos aditivos com IL-22 na indução da produção de outras moléculas inflamatórias (SUH *et al.*, 2013), sugerindo ainda que os efeitos patológicos da IL-22 podem ser dependentes da co-expressão com outras citocinas inflamatórias (DUDAKOV; HANASH; BRINK, 2015).

FIGURA 10. Tecidos alvo e efeitos fisiológicos da IL-22. Um papel para IL-22 foi descrito em vários tecidos, incluindo intestino, fígado, pulmão, pele, timo, rim, coração, pâncreas e tecido sinovial. IL-22R é expresso em células epiteliais e alguns fibroblastos desses tecidos. Essa citocina pode promover proliferação celular, resistência à apoptose e cicatrização de feridas. Em órgãos de barreira como intestino, pulmão e pele, a IL-22 também promove a produção de moléculas antimicrobianas como S100, Reg3 β e Reg3 γ , bem como defensinas, auxiliando assim na defesa do hospedeiro e na função de barreira. A IL-22 é importante para promover a regeneração tecidual após lesão em diversos órgãos. No entanto, estudos também indicaram que a IL-22 está associada a malignidades da pele, tireóide, mama, estômago, pâncreas, fígado, colo do útero e cólon, bem como outras patologias inflamatórias, incluindo psoríase.



Fonte: Traduzido e adaptado de DUDAKOV; HANASH; BRINK, 2015.

No contexto de infecção por influenza e superinfecção bacteriana, a IL-22 se destaca por apresentar diversos efeitos no epitélio pulmonar, tais como: (a) produção de proteínas antibacterianas, incluindo (em conjunto com IL-17) lipocalina-2, β -defensina 2 (AUJLA *et al.*, 2008) e quimiocinas; (b) proliferação celular; e (c) reparo

após lesão (DUDAKOV; HANASH; BRINK, 2015). Alguns estudos demonstram que a IL-22 endógena apresenta efeito protetor (pneumonia reduzida) durante infecções por vírus influenza H1N1 e H3N2 e leva à redução suscetibilidade à infecção bacteriana pneumocócica secundária (IVANOV *et al.*, 2013; PAGET *et al.*, 2012; KUMAR *et al.*, 2012; POCIASK *et al.*, 2013). Nestes sistemas, a IL-22 pode proteger contra danos epiteliais causados por replicação de vírus, participar da regeneração epitelial das vias aéreas e reparo das barreiras pulmonares (PAGET *et al.*, 2012; KUMAR *et al.*, 2013, POCIASK *et al.*, 2013). Estudos que avaliaram o efeito da suplementação exógena de IL-22 para o controle da infecção bacteriana pós-influenza demonstraram que essa suplementação não impede o desenvolvimento bacteriano no compartimento pulmonar, mas reduz disseminação bacteriana sistêmica, essa redução está ligada a funções de barreira pulmonares reforçadas pela citocina (BARTHELEMY *et al.*, 2018). Outros trabalhos demonstraram que a administração do agonista de TLR5 flagelina aumenta a produção de IL-22 por ILC3 resultando em proteção contra infecção por *S. pneumoniae*. Outros trabalhos demonstraram que durante a infecção por *Klebsiella pneumoniae*, a IL-22 produzida principalmente por células NK, tem um efeito protetor e durante a infecção com a bactéria intracelular *Chlamydia muridarum* os níveis de IL-22 no pulmão aumentam rapidamente (XU *et al.*, 2014; PENG *et al.*, 2014). Por outro lado, estudos que realizaram a inibição de IL-22 com anticorpos monoclonais neutralizantes anti-IL-22 resultou em respostas Th1 e Th17 prejudicadas e exacerbação da infecção bacteriana. Trabalhos que realizaram a administração intranasal de IL-22 aumentou significativamente a resposta Th17 e resultou em proteção após infecção pulmonar por clamídia (DUDAKOV; HANASH; BRINK, 2015). Em suma, a IL-22 está envolvida em lesão pulmonar, reparo e regeneração epitelial durante a infecção por influenza, sugerindo que a presença dessa citocina pode ser essencial para o controle da infecção pneumocócica secundária (SHABGAH *et al.*, 2017).

De um modo geral, a gravidade da infecção pelo vírus influenza está tanto relacionada aos fatores de virulência viral quanto àqueles ligados a uma resposta imune desbalanceada do hospedeiro. Esses fatores danificam a barreira epitelial, prejudicam a proteção mecânica e as funções química/fisiológicas dos pulmões, favorecendo a invasão e proliferação bacteriana. Alguns estudos já demonstraram a importância da IL-22 durante a infecção pelo vírus influenza, uma vez que essa citocina atua de maneira benéfica no tecido epitelial pulmonar, reduzindo a progressão

para uma infecção bacteriana secundária. As estratégias utilizadas nesses estudos consistiram principalmente na injeção sistêmica da IL-22 (BARTHELEMY *et al.*, 2018), utilização da proteína de fusão bilateral (HAN *et al.*, 2021), e uso de proteína de ligação para a IL-22 (ABOOD *et al.*, 2019).

Apesar de importantes para o avanço do conhecimento relativo à imunomodulação realizada pela IL-22 durante a infecção por IAV, essas estratégias não reproduzem o que ocorre durante uma infecção natural, na qual as produções desses mediadores inflamatórios ocorrem de forma localizada e transitória. Portanto, neste trabalho, foi construído através da GR um vírus influenza recombinante defectivo para multiplicação carreando o gene da interleucina 22 murina (Flu-IL22) (FIGURA 11). Esta estratégia constitui uma abordagem alternativa e vantajosa, por permitir que a IL-22 seja produzida somente no local da infecção e por um curto espaço de tempo, de maneira análoga ao que ocorre durante a infecção natural pelo vírus influenza. Ademais, as infecções bacterianas representam uma preocupação acerca do crescente surgimento de cepas multirresistentes a antimicrobianos. Deste modo, este trabalho poderá contribuir para o enriquecimento de informações no que diz respeito a novas tecnologias terapêuticas/imunomoduladoras de modo inovador utilizando vetores virais capazes de reduzir as infecções bacterianas secundárias, representando um grande avanço para o enfrentamento dessas complicações de interesse médico.

Diante do apresentado, a tecnologia da genética reversa em vírus influenza se caracteriza como uma abordagem interessante para estudos em aplicação vacinal e terapêutica. Nosso grupo de pesquisa detém de forma bem estabelecida a construção de vírus influenza recombinantes e com essas construções, demonstrou-se que estes vírus carreando segmentos truncados da NA são seguros para experimentos em modelos murino e relevantes para estudos vacinais, terapêuticos e avaliações imunomoduladoras.

FIGURA 11. Representação esquemática do vírus influenza recombinante carregando o gene da interleucina 22 murina, construído por genética reversa. A porção catalítica da neuraminidase viral foi deletada e substituída pelo gene da IL-22 murina, dando origem ao vírus influenza recombinante defeutivo para a multiplicação (Flu-IL22).



Fonte: O autor.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

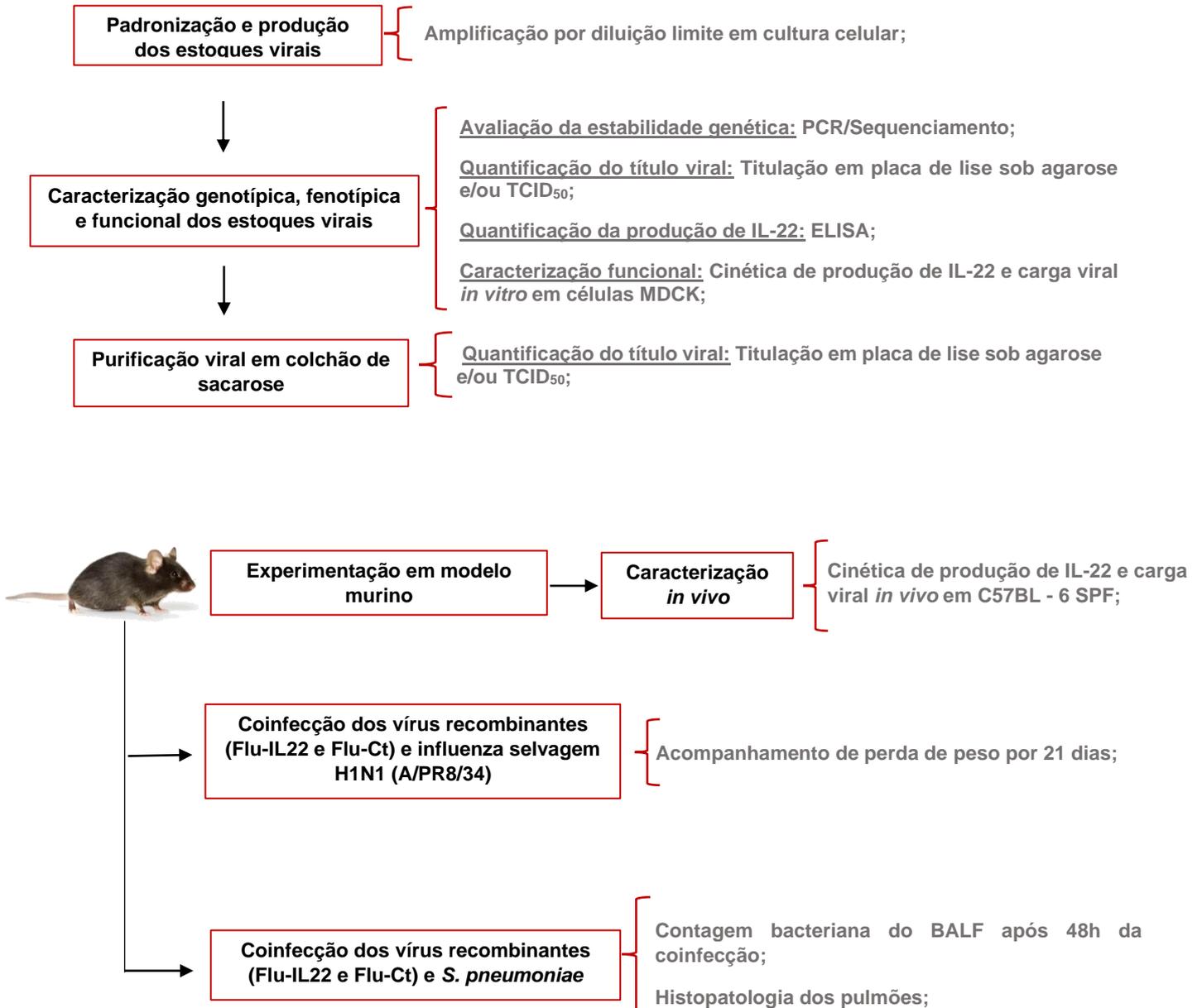
Avaliar, em modelo murino, o efeito do vírus influenza recombinante carreando o gene da interleucina 22 (Flu-IL22) na infecção pelo vírus influenza selvagem (H1N1-A/PR8/34) e na infecção por *Streptococcus pneumoniae*

2.2 Objetivos específicos

- Produzir estoques virais do vírus recombinante Flu-IL22;
- Caracterizar genotípica, fenotípica e funcionalmente o vírus recombinante Flu-IL22 e Flu-Ct;
- Avaliar a perda de peso dos animais infectados simultaneamente com o vírus recombinante Flu-IL22 e com o vírus influenza selvagem H1N1 - A/PR/8/34;
- Avaliar o impacto da expressão heteróloga da IL-22 durante a coinfeção do vírus Flu-IL22 e *Streptococcus pneumoniae*;

3. METODOLOGIA

3.1 Delineamento experimental



3.2 Células

As células MDCK (*Madin-Darby canine kidney cells*), foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) completo com alta concentração de glicose (4.500mg/L) (DMEM *High Glucose*, SIGMA), contendo 3,7 g/L de bicarbonato de sódio (SIGMA), 50 mg/L de 4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazineethanesulfonic Acid (HEPES) (SIGMA) e 10 mL/L da solução de antibióticos estreptomicina (10 mg/mL) e penicilina (10.000 U/mL) (SIGMA) e o seu pH foi ajustado para 7,2. O meio foi suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (GIBCO) e as culturas celulares foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de CO₂.

3.3 Camundongos

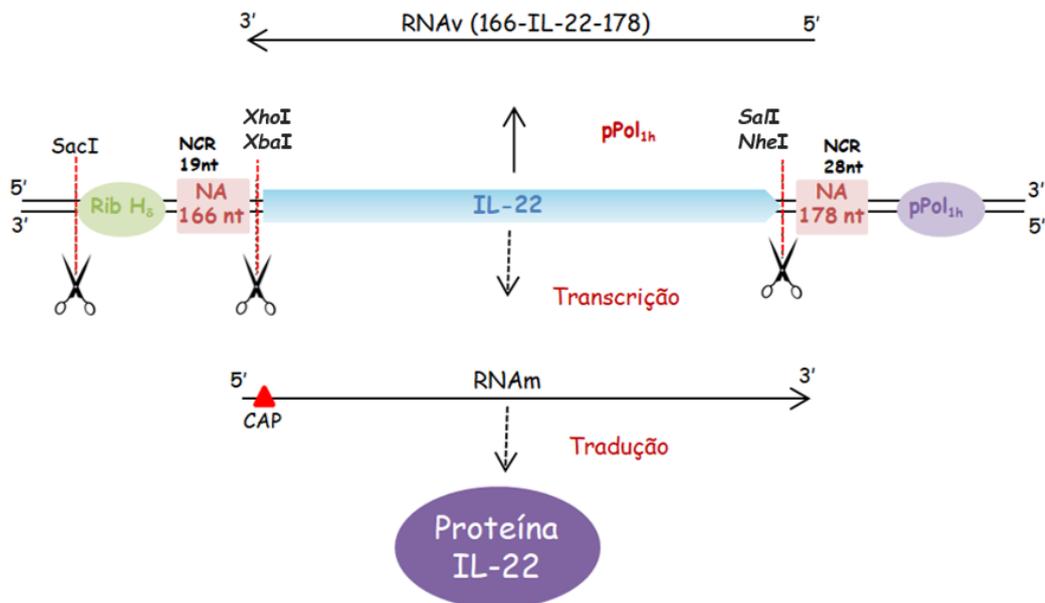
Todos os experimentos em modelo murino foram realizados após a aprovação do projeto pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA-Fiocruz), licença LW- 8/21. Camundongos C57BL-6 *Specific Pathogen Free* (SPF) machos ou fêmeas de 6 a 12 semanas de idade foram fornecidos pelo Biotério de Produção (BIOT) do Instituto René Rachou (IRR) ou do Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB/UFMG), Belo Horizonte/ Minas Gerais – Brasil. Todos os animais foram mantidos de acordo com as recomendações da CEUA – Fiocruz e padrões institucionais. Os materiais utilizados para a manutenção dos animais, tais como micro isoladores, água, comida, maravalha e materiais para enriquecimento ambiental eram autoclavados antes das trocas semanais dos animais. O enriquecimento ambiental foi realizado alternadamente com maços de algodão hidrofóbico, papel ou pedaços de cano *policloreto de vinila* (PVC), com a finalidade de reduzir o estresse dos animais.

3.4 Construção do vírus influenza recombinante carreando o gene da IL-22 murina

3.4.1 Construção dos plasmídeos de transferência

O plasmídeo de transferência pPRNA codifica o segmento da NA (selvagem ou recombinante) do vírus influenza A/WSN/33(H1N1), clonados em orientação negativa no plasmídeo de transferência pPR7, entre a sequência truncada do promotor da polimerase I humana (pol I) e a sequência da ribozima do vírus da hepatite δ (Rib H δ), como preciamente descrito em outros estudos (MACHADO *et al.*, 2003; MACHADO *et al.*, 2006). Este tipo de construção permite síntese de um RNA pseudoviral, cuja sequência é idêntica àquela do segmento viral original, quando células de primatas permissivas são transfectadas com esse plasmídeo. O plasmídeo pPRNA166x178 codifica os primeiros 166 da região 3' do segmento da NA, seguido por um sítio múltiplo de clonagem para as enzimas XbaI, XhoI, NheI e Sall e os últimos 178 nucleotídeos da região 5' do segmento da NA, os quais flanqueiam um sítio múltiplo de clonagem. Esse plasmídeo apresenta todas as trincas ATG presentes nos primeiros 166 nucleotídeos mutadas, de modo que a tradução da proteína se inicie no ATG da sequência heteróloga, a qual será produzida em sua forma nativa. A sequência codificadora da IL-22 murina foi construída sob a forma de gene sintético pela empresa GENSCRIPT (Hong Kong) e clonada no plasmídeo pPRNA166x178 aos sítios de clonagem XhoI e NheI. A presença do inserto foi verificada por perfil de digestão com enzima de restrição, seguida da análise por sequenciamento pelo método Sanger. (Sequenciador de DNA - ABI 3730 Life Technologies; Plataforma de sequenciamento de DNA CPqRR). Este plasmídeo foi utilizado para a construção do vírus recombinante Flu-IL22 (FIGURA 12). Nesse tipo de construção, a sequência heteróloga é produzida na sua forma nativa secretada.

FIGURA 12. Desenho esquemático do plasmídeo pPR IL-22. As sequências das citocinas foram inseridas no sítio múltiplo de clonagem entre os primeiros 166 e os últimos 178 nucleotídeos do segmento da NA. O promotor da polimerase I humana (pPol_{1h}) permite a transcrição de um segmento de vRNA sintético sem adição de CAP e cauda poli A e a sequência ribozima do vírus da hepatite delta realiza a clivagem do segmento recém gerado em posições específicas, de tal forma que a sequência do RNA sintetizado é idêntica àquela do segmento de RNA viral original. A transcrição do RNAm e tradução da proteína é realizada pelas proteínas virais geradas pelos demais plasmídeos ambissenso.



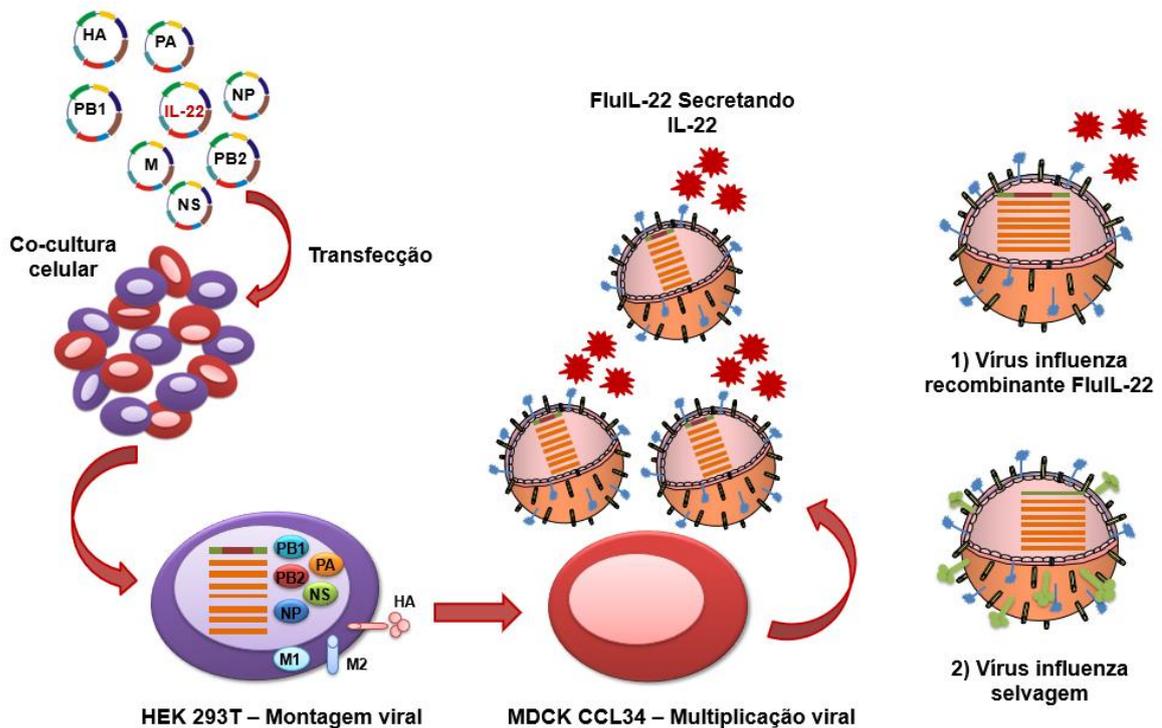
Fonte: o autor.

3.4.2 A genética reversa

Os vírus influenza recombinantes foram previamente construídos pela então doutoranda Ana Paula de Faria Gonçalves, através da genética reversa (GR). De forma resumida, co-cultivos subconfluentes de células HEK-293T e MDCK em meio DMEM High foram transfectadas através do auxílio do reagente FUGENE HD® (ROCHE), com os plasmídeos bidirecionais pPR-PB1, pPR-PB2, pPR-PA, pPR-NS, pPR-NP, pPR-M e pPR-HA, além do plasmídeo pPR IL-22 os quais são capazes de permitir tanto a transcrição do RNA viral quanto do RNA mensageiro do vírion de interesse Flu-IL22 (FIGURA 13). Desta forma, nas células transfectadas, ocorreu a transcrição, a replicação do material genético e a síntese de todas as proteínas virais e, conseqüentemente, a formação dos oito complexos ribonucleoproteicos e síntese de novas partículas virais. A utilização da co-cultura durante a transfecção é uma estratégia importante, uma vez que, a linhagem celular HEK-293T é mais permissiva

à transfecção e é onde ocorre a montagem inicial das partículas virais, enquanto a linhagem MDCK é padrão ouro para a multiplicação das partículas virais recém-geradas, permitindo assim melhor eficácia do processo de genética reversa. Após 48h, os sobrenadantes foram coletados, centrifugados a 150 xg, a 4°C por 5 min para clarificação e congelados a -70°C para posterior obtenção de estoques semente e trabalho dos vírus recombinantes.

FIGURA 13. Desenho esquemático da genética reversa dos vírus recombinantes. A construção viral ocorre a partir de sete plasmídeos bidirecionais codificando cada um dos segmentos virais (HA, M, NS, PB1, PB2, PA, NP) e o plasmídeo da NA truncada contendo a sequência heteróloga das citocinas IL-22 murina. As células HEK-293T são altamente transfectáveis e os plasmídeos de transferência possuem o promotor da RNA polimerase I humano, possibilitando que nessas células ocorra a transcrição de todos os segmentos de vRNA, tradução das proteínas virais e a montagem das primeiras partículas virais após a transfecção. As células MDCK é padrão ouro para a multiplicação do vírus influenza, portanto, é utilizada para a amplificação das partículas virais geradas nas células HEK-293T. (1) O vírus recombinante Flu-IL22, apresenta a NA truncada, portanto, apenas HA no envelope e codifica a IL-22, a qual é secretada pelas células. (2) Os vírus selvagens possuem a NA e HA no seu envelope.



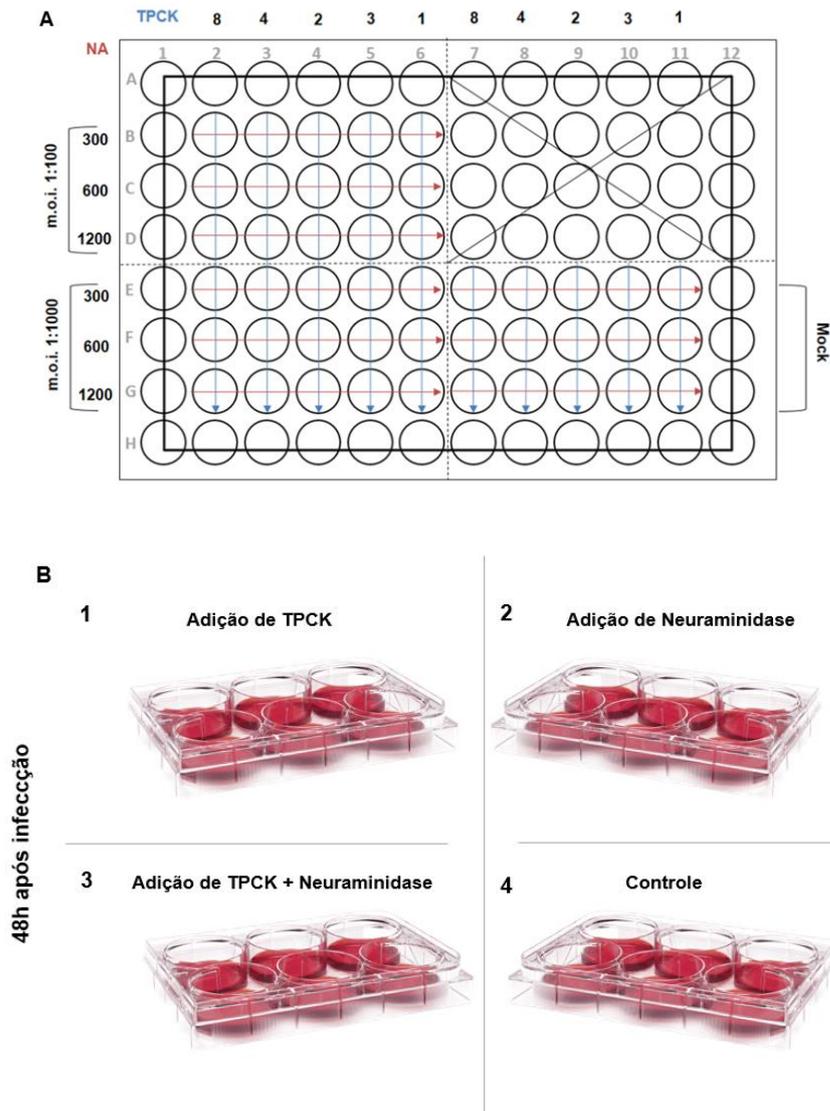
Fonte: o autor.

3.5 Padronização e produção dos estoques virais

Para o preparo dos estoques semente e trabalho (ES e ET), foi necessária a padronização das melhores condições para a amplificação do vírus recombinante Flu-IL22, para tal, foi realizada uma amplificação viral utilizando diferentes multiplicidade de infecção (*multiplicity of infection: m.o.i*) variando de 0,01 e 0,001. Foram utilizados 50 ul de cada condição na infecção de monocamadas subconfluentes de células MDCK ($8,10^6$ cél/placa) em placa de 96 cavidades. Após 1h de adsorção viral em estufa a 37°C e 5% CO₂, foram adicionados, após a retirada do inóculo, 200 ul do meio de amplificação constituído de DMEM com baixa concentração de glicose (1g/litro), suplementado com 0,3 % de albumina sérica bovina (*Bovine Serum Albumin* - BSA) (SIGMA). Ademais, para a otimização da preparação dos estoques virais, foram testadas diferentes concentrações de tripsina TPCK (SIGMA) (1ug/mL; 2ug/mL; 3ug/mL; 4ug/mL; 8ug/mL) e diferentes concentrações de neuraminidase de *Vibrio cholerae* (300μU/ml; 600μU/ml; 1200μU/ml). As placas foram incubadas durante 72h em estufa a 37°C e 8% CO₂.

Conforme demonstrado na figura 14, para cada m.o.i, os poços apresentavam diferentes combinações das concentrações de tripsina TPCK e neuraminidase. Após incubação por 72h, foram avaliadas as diferentes condições e coletado o sobrenadante com maior efeito citopático (ECP) (FIGURA 14 - A). Os sobrenadantes coletados foram clarificados por centrifugação a baixa velocidade (300 x g) por 10 min a 4°C e, posteriormente titulados e corados para a avaliação do ECP e quantificação da carga viral. Ademais, foi realizado um teste 48h após infecção com a adição de TPCK e/ou neuraminidase no intuito de avaliar se uma suplementação com esses componentes ao longo da multiplicação viral refletiria em um título viral maior para o estoque de Flu-IL22 (FIGURA 14 - B). Posteriormente foi realizada nova padronização da m.o.i utilizada, a fim de avaliar se uma m.o.i de 0,002 iria favorecer a multiplicação do Flu-IL22. Após essas análises foi escolhida a melhor condição de amplificação do Flu-IL22.

FIGURA 14. Padronização das condições para multiplicação do vírus Flu-II22). (A) Padronização com diferentes concentrações de TPCK (1ug/mL; 2ug/mL; 3ug/mL; 4ug/mL; 8ug/mL) e Neuraminidase *Vibrio cholerae* (300μU/ml; 600μU/ml; 1200μU/ml) com diferentes m.o.i (0,01 e 0,001). (B) Padronização 48h após infecção, diferentes grupos receberam (1) TPCK, (2) Neuraminidase, (3) TPCK e Neuraminidase ou (4) controle (sem adição de TPCK e Neuraminidase).



Fonte: o autor.

Para o preparo dos ES, após as padronizações, os sobrenadantes de cultura oriundos da terceira amplificação (3A) da GR foram diluídos na razão 1:100 e 1:1000 em meio DMEM Low Glucose. Foram utilizados 50 ul de cada diluição na infecção de monocamadas subconfluentes de células MDCK (8.10^6 cél/placa) em placa de 96 cavidades. Após 1h de adsorção viral em estufa a 37°C e 5% CO₂, foi adicionado, após a retirada do inóculo, 200 ul do meio de amplificação que constituído de DMEM

com baixa concentração de glicose suplementado com 0,3 % de BSA, 3 µg/ml de tripsina TPCK e 600µU/ml de Neuraminidase de *Vibrio cholerae*, em cada poço. As placas foram incubadas durante 72h em estufa a 37°C e 8% CO₂. Após o período de incubação, foram coletados os sobrenadantes dos poços de cultura celular correspondentes às maiores diluições nas quais foi observado o efeito citopático em pelo menos 80% da área de monocamada celular. Os sobrenadantes foram coletados e clarificados por centrifugação a baixa velocidade (300xg) por 10min a 4°C. Posteriormente os sobrenadantes foram aliquotados e congelados a -80°C. Os títulos infecciosos dos ES foram avaliados através da titulação por placa de lise sob agarose em células MDCK, a capacidade do vírus recombinante Flu-IL22 em produzir a citocina IL-22 foi analisada através de ELISA e, por fim, os ES seguiram para a caracterização quanto sua estabilidade genética por PCR e sequenciamento. O preparo do ET também foi realizada em placas de cultura de 96 poços contendo monocamadas de células MDCK subconfluentes (8.10⁶ cél/placa) de maneira semelhante àquela utilizada para a preparação dos estoques semente, porém em maior volume (~100mL) em placa de 96 poços e com m.o.i que foi previamente padronizada de 0,002. Os sobrenadantes das culturas celulares foram coletados 72h após a infecção e submetidos à caracterização conforme realizado para o estoque semente (PCR, sequenciamento, titulação e ELISA). Terminada a caracterização, os ET foram purificados por ultracentrifugação (100000 G, 4°C, 2 horas) em colchão sacarose 20%/PBS estéril.

3.6 Caracterização genotípica e avaliação da estabilidade genética dos estoques de vírus recombinantes

O RNA viral dos estoques foi extraído utilizando *QIAamp Viral RNA Mini Kit* (QIAGEN) seguindo as instruções do fabricante e esse RNA foi usado para a síntese de um cDNA através da reação de transcrição reversa pela Transcriptase Reversa (RT, PROMEGA) de Vírus da Leucemia Moloney Murina (M-MLV) e iniciador senso positivo uni-12 (5'- AGCAAAGCAGG-3'), cuja sequência corresponde aos últimos 12 nucleotídeos da região 3' terminal conservados em todos os segmentos do vírus

Influenza (HOFFMANN, *et al.*, 2000). Para a reação em cadeia da polimerase (PCR) foi utilizado o protocolo com os iniciadores senso N1/+51 (*forward*: Fw) e antisenso N1/-1308 (*reverse*: Rev) (TABELA 1). Estes iniciadores se anelam nas porções da neuraminidase flanqueando a sequência da IL-22, permitindo à amplificação completa desse gene. Os segmentos amplificados foram analisados em gel de agarose (1%) com corante brometo de etídio e a visualização foi realizada através de um transiluminador com radiação ultravioleta (UV). Em seguida, os segmentos foram purificados (*QIAquick PCR Purification Kit*) e sequenciados (Sequenciador de DNA - ABI 3730 *Life Technologies*; Plataforma de sequenciamento de DNA –IRR/FIOCRUZ MINAS).

TABELA 1. Iniciadores e seus respectivos ciclos utilizados para amplificação da neuraminidase contendo a sequência da IL-22 murina por PCR.

Iniciador	Sequência	Ciclo de Reação			
		Etapas	T (°C)	Tempo (min)	Nº
N1/+51 (<i>Foward</i>)	5'-GATCGATCTGTATGGTAG-3'	Desnaturação inicial	94	02:00	1
		Desnaturação	94	00:30	35
		Anelamento	50	00:30	
N1/-1308 (<i>Reverse</i>)	5'-GATTGCGTCCTCCTCAG-3'	Extensão	72	01:00	
		Extensão final	72	07:00	1

3.6.1 Extração de RNA viral

Para a extração do RNA viral, foi utilizado o kit de extração viral Viral RNA Mini Kit da Qiagen, segundo as orientações do fabricante. Resumidamente, foram adicionados 140µL dos sobrenadantes das amplificações virais a tubos de microcentrifuga (1,5mL) contendo 560µL de tampão AVL adicionado de “Carrier RNA” e após homogeneização, os tubos foram incubados à temperatura ambiente (T.A.) por 10min. Esta etapa permite a lise por desnaturação da membrana viral. Em seguida, foram adicionados 560µL de álcool (96–100%) às amostras, o lisado viral foi adicionado, em duas etapas, às colunas de extração (QIAamp Mini column) acoplada

a tubos coletores (2mL) e centrifugados a 6.000xg por 1min à temperatura ambiente. Em seguida, as colunas foram lavadas duas vezes com 500µL do tampão de lavagem AW1 e AW2, respectivamente, e centrifugadas a 20.000xg 3min à temperatura ambiente, em cada etapa. Por fim, foram adicionados 60µL do tampão AVE nas colunas para eluir o ácido nucléico da membrana e após incubação (2min) os tubos foram centrifugados a 6.000xg por 1min à temperatura ambiente. Os RNAs foram armazenados à -80°C.

3.6.2 Síntese de cadeia simples de cDNA por transcrição reversa (RT M-MLV)

Para a síntese do cDNA foram usados 2µg do RNA total para 0,5µg do iniciador Uni12, descrito anteriormente, em um volume $\leq 15\mu\text{L}$ de água livre de nuclease. Os microtubos foram aquecidos a 70°C durante 5min para desfazer a estrutura secundária da molécula molde, e em seguida, levados ao gelo por 2min, para impedir que a estrutura secundária se reestruture. Após centrifugação a 600xg por 1min, foram adicionados ao molde/iniciador anelados os seguintes reagentes: 5µL de tampão de reação M-MLV (5x), 1,25µL de dATP (10mM), 1,25µL de dCTP (10mM), 1,25µL de dGTP (10mM), 1,25µL de dTTP (10mM), 25 unidades de inibidor de ribonuclease RNasin®, 200 unidades de M-MLV RT, para um total de 25µL de água livre de nuclease. Os tubos foram homogeneizados e incubados por 60min a 42°C. Os cDNAs foram armazenados à -80°C.

3.6.3 Purificação dos produtos de amplificação por PCR

O produto de PCR foi purificado em kit para PCR (QIAGEN® *RNeasy Mini Kit*). Resumidamente, foram adicionados 5 volumes do tampão PB (alta concentração de cloridrato de guanidina e isopropanol) para 1 volume de cada amostra de PCR. Este tampão permite a eficiente ligação de amostras tão pequenas quanto 100pb à membrana de sílica e elimina oligos de até 40pb. As amostras foram adicionadas às colunas acopladas a tubos coletores (2mL) e centrifugadas a 17.900xg por 1min à

temperatura ambiente. As colunas foram lavadas com 750µL do tampão PE. Os tubos foram centrifugados duas vezes 17.900xg por 1min à temperatura ambiente. Por fim, foram adicionados 50µL do tampão EB (10mM Tris-Cl, pH 8,5) nas colunas para eluir o ácido nucléico da membrana e após incubação (2min) os tubos foram centrifugados a 17.900xg por 1min à temperatura ambiente.

3.6.4 Sequenciamento dos estoques virais (semente e trabalho)

O sequenciamento das amostras foi realizado pela técnica de Sanger em colaboração com a plataforma de sequenciamento do IRR. Os produtos de PCR dos estoques (ES e ET) e controle positivo (plasmídeo pPR IL-22 utilizado para a construção do vírus Flu-IL22) foram purificados e posteriormente dosados quanto ao seu material genético, através do *NanoDropTM*. A concentração das amostras utilizadas para o sequenciamento foi de 20 ng/ul. Para cada amostra foi preparado um pré-mix com 1ul dos iniciadores fw e rev (os mesmos utilizados na PCR), separadamente. Neste pré-mix foi adicionado H₂O para completar o volume total da reação em 10ul. Os demais insumos foram acrescentados na própria plataforma de sequenciamento (Big Dye - 1ul; tampão - 1,5ul).

3.7 Purificação viral em colchão de sacarose

O volume total de vírus produzido na amplificação do preparo do estoque trabalho, foi adicionado cuidadosamente em tubos específicos para ultracentrífuga (34mL) contendo sacarose (SIGMA) a 20% em PBS 1x (tampão fosfato-salino, pH 7,2-7,4) gelado, na proporção de 30% de sacarose e 70% do sobrenadante da amplificação viral. Os tubos foram centrifugados a 100.000xg por 2h a 4°C. Após a ultracentrifugação, toda a sacarose e o meio sobrenadante foram retirados com o auxílio de uma seringa, e o vírus foi ressuspenso em PBS 1x estéril e gelado, a suspensão viral foi alíquotada, congelada (-80°C) e titulada antes dos experimentos *in vivo*.

3.8 Caracterização fenotípica dos estoques: quantificação viral e avaliação da produção da IL-22 *in vitro*

3.8.1 Titulação por placa de lise sob agarose (PFU)

Placas de seis poços contendo camadas subconfluentes de células MDCK (8×10^6 cél/placa), foram infectadas com as amostras (sobrenadante de células infectadas ou macerado de pulmões de camundongos infectados), diluídas de forma seriada na razão 1:10 em DMEM Low Glucose 2X, num volume de 400µL por poço. A adsorção viral ocorre em 1h, sendo que a cada 10 minutos as placas foram homogeneizadas para evitar que as bordas da monocamada celular ressecassem. Após a adsorção, sem a retirada do inóculo, foi adicionado 4mL por poço de uma mistura (1:1) constituída de agarose 1% (KASVI) fundida em água de injeção estéril e DMEM high Glucose 2X, suplementado para obter uma concentração final de 0,6% de BSA (SIGMA), 3µg/mL de tripsina tratada com TPCK (SIGMA) e 900 µU/mL de neuraminidase de *Vibrio cholerae* (SIGMA). As placas foram incubadas durante 72h em uma estufa a 37°C e 8% CO₂. Após este período, as placas foram coradas/fixadas em 10% de formol tamponado (em PBS 1x) com 1% de cristal violeta, para visualização e contagem das placas de lise. O número de unidades formadoras de placa (PFU) por mL foi determinado segundo a fórmula abaixo, onde “n” corresponde ao número de placas de lise, “d” corresponde ao inverso da diluição onde as placas foram contadas e “f” é o fator de correção para 1mL (2,5).

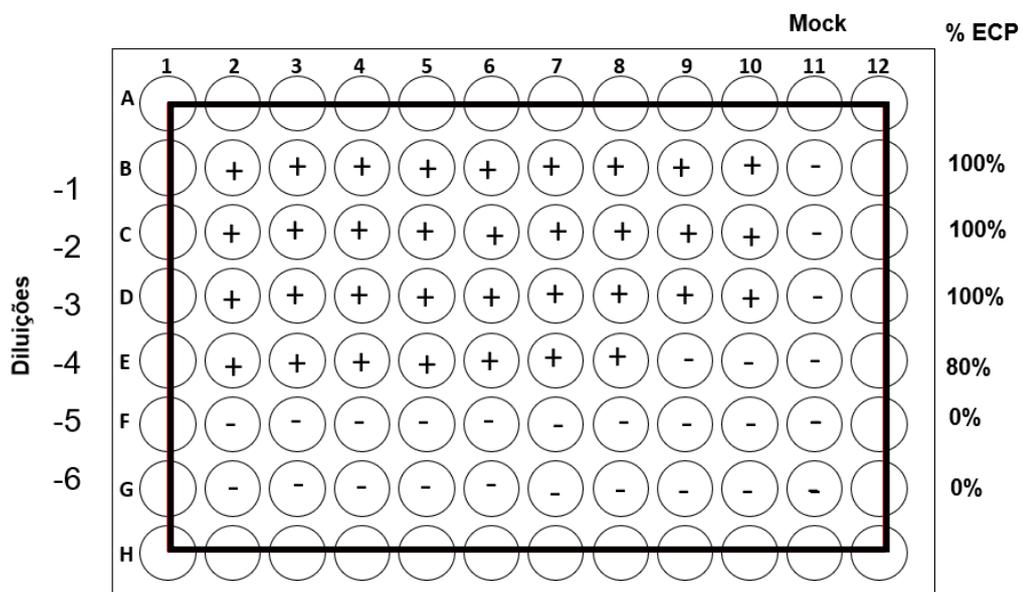
$$\text{PFU/ml} = n \times d \times f$$

3.8.2 Titulação por análise de efeito citopático (TCID₅₀ - *The median tissue culture infectious dose*)

Placas de noventa e seis poços, desconsiderando os poços das bordas, contendo camadas subconfluentes de células MDCK (8×10^6 cél/placa), foram infectadas com as amostras (sobrenadante de células infectadas), diluídas de forma

seriada na razão 1:10 em DMEM Low Glucose. Para cada diluição foi realizada em média 7 replicatas, o inóculo foi de 50ul por poço. A adsorção viral ocorreu por 1h e, após a retirada do inóculo, foi adicionado 200uL por poço do meio de amplificação que constituído de DMEM com baixa concentração de glicose suplementado com 0,3 % de BSA, 3 µg/ml de tripsina TPCK e 600µU/ml de Neuraminidase de *Vibrio cholerae*, em cada poço. As placas foram incubadas durante 72h em estufa a 37°C e 8% CO₂. Após o período de incubação as diluições foram analisadas de acordo com o ECP, e o cálculo do título viral foi realizado com base na maior diluição que apresentou ECP (FIGURA 15). O título infeccioso foi calculado segundo o método Reed-Muench. O TCID₅₀ pode ser convertido em unidades formadoras de placa (PFU) através da distribuição de Poisson. Esta conversão é uma estimativa baseada no raciocínio de que a diluição limitante, que infectaria 50% das camadas de células desafiadas, produziria uma única placa em uma monocamada de células (*"Viral Titering-TCID50 Assay Protocol - Creative Biogene"*, [s.d.]). Após a análise, as placas foram coradas/fixadas em 10% de formol tamponado (em PBS 1x) com 1% de cristal violeta.

FIGURA 15. Modelo de análise para TCID₅₀. As replicatas das diluições são avaliadas quanto a presença de ECP. O símbolo (+) indica presença de ECP e o (-) representa a ausência de ECP. Ao final temos uma porcentagem do total de ECP avaliado nas replicatas de cada diluição. Após a análise visual em microscópio, a presença ou ausência de ECP é plotada em um modelo de análise do Excel para o cálculo do título em TCID₅₀/mL.



Fonte: o autor.

3.8.3 Quantificação da citocina IL-22 por ELISA

A concentração da citocina IL-22 foi determinada por kit comercial de ELISA sanduíche (*R&D SYSTEMS*), conforme recomendação do fabricante. Resumidamente, o anticorpo de captura foi diluído em PBS 1x na concentração recomendada e adicionado (100 µL/poço) à microplaca de 96 poços (*NUNC®MaxiSorp*), a qual foi incubada durante a noite à temperatura ambiente. No dia seguinte, a placa foi lavada três vezes com tampão de lavagem (0,05% Tween®20 em PBS 1x, pH 7,2-7,4). Em seguida, o bloqueio foi realizado pela adição de 300µL/poço de reagente diluente (5% Tween 20 em PBS, pH 7,2-7,4) e a placa foi incubada à temperatura ambiente, por no mínimo 1h. O processo de lavagens supracitado foi então, repetido uma vez. Em seguida foram adicionados a cada poço 100 µL das amostras ou padrões diluídos em reagente diluente. A curva padrão (7 pontos) foi gerada a partir de diluições seriadas (razão 1:2), iniciando na concentração recomendada pelo fabricante (ponto máximo da curva = 2000 pg/mL). O reagente diluente puro foi utilizado como controle negativo. A placa foi incubada por 2h à temperatura ambiente. O processo de lavagens supracitado foi então, repetido uma vez. Na etapa seguinte, foi adicionado 100 µL/poço do anticorpo de detecção previamente diluído em reagente diluente e a placa foi incubada por mais 2h à temperatura ambiente. O processo de lavagens supracitado foi repetido uma vez. Em seguida, foram adicionados 100 µL/poço de Estreptavidina-HRP (*Horseradish Peroxidase*) diluída em reagente diluente. A placa foi incubada por 20 min. à temperatura ambiente ao abrigo da luz. Em seguida, foram adicionados 100 µL/poço da solução substrato contendo peróxido de hidrogênio (H₂O₂, tetrametilbenzidina). A placa foi incubada por 20min à temperatura ambiente ao abrigo da luz. Por fim, foram adicionados 50 µL da solução de parada (2N H₂SO₄) e a densidade óptica determinada em espectrofotômetro (450 nm).

3.8.4 Cinética da produção da citocina IL-22 e carga viral *in vitro* em células MDCK infectadas pelo vírus recombinante Flu-IL22

Camadas subconfluentes de MDCK (placa 6 poços) foram infectadas com o vírus recombinante Flu-IL22 na m.o.i 0,002. Após 1h de adsorção, foi adicionado, após a retirada do inoculo viral, o meio de amplificação DMEM Low Glucose suplementado, para obter uma concentração final com 0,3% de BSA (SIGMA), 3 µg/mL de tripsina tratada com TPCK (SIGMA) e 600 µU/mL de neuraminidase de *Vibrio cholerae* (SIGMA). As placas foram mantidas em estufa a 37°C e 8% de CO₂. Os sobrenadantes foram coletados em diferentes tempos (24h, 48h, 72h e 96h) após a infecção. Estes sobrenadantes da infecção coletados foram clarificados (300xg, 4°C por 10min) e congelados a -80°C. A produção da citocina IL-22, expressa pelos vírus recombinantes, nos diferentes tempos e condições foram avaliadas pela técnica de ELISA e o título infeccioso do vírus por titulação em placa de lise sob agarose, conforme previamente descrito.

3.9 Caracterização do vírus recombinantes Flu-IL22 *in vivo*

3.9.1 Cinética de produção de IL-22 e carga viral nos pulmões de camundongos infectados com os vírus recombinantes Flu-IL22

Camundongos C57BL/6, machos, de 8 a 12 semanas, foram anestesiados por via subcutânea com uma mistura de Ketamina (100 mg/kg) e Xilazina (10 mg/kg) e divididos em grupos (TABELA 2) que foram inoculados via intranasal dose de 10⁴ PFU/animal dos vírus influenza recombinantes (Flu-IL22 ou Flu-Ct, o qual não possui a inserção de nenhuma sequência heteróloga), diluídos em PBS 1x no volume de 40 µL/animal (inóculo). O grupo Mock (controle negativo) recebeu o mesmo volume de inóculo, porém apenas com PBS 1x. Os camundongos foram eutanasiados 24h, 48h, ou 72h após a infecção para a coleta do lavado bronco-alveolar (BALF) (3 instilações com 1mL/pulmão de PBS 1x via traquéia). Os pulmões foram congelados (-80°C), posteriormente macerados em 1mL de tampão com inibidor de protease e centrifugados por 10min a 4°C e 13.000xg e o sobrenadante armazenado a -80°C. Por

ELISA, foi realizada a quantificação da citocina IL-22 no sobrenadante do BALF clarificado (300xg, 4°C por 10 min). A quantificação viral dos pulmões foi realizada através da titulação por placa de lise sob agarose no sobrenadante do macerado dos pulmões.

TABELA 2. Protocolo de infecção e eutanásia para cinética de produção de IL-22 nos pulmões de camundongos infectados com os vírus recombinantes Flu-IL22.

Grupos	Inóculo (PFU/animal)	N° total de Animais	Eutanásia		
			24h	48h	72h
Flu-IL22	10 ⁴	12	4	4	4
Flu-Ct	10 ⁴	12	4	4	4
Mock	PBS	4	-	-	4

3.10 Avaliação da perda de peso em animais inoculados com o vírus recombinantes (Flu-IL22 e Flu-Ct) e/ou vírus selvagem H1N1 (A/PR/8/32)

Camundongos C57BL/6, machos, de 8 a 12 semanas, foram anestesiados por via subcutânea com uma mistura de cetamina (100 mg/kg) e Xilazina (10 mg/kg) e divididos em grupos (TABELA 3) que foram inoculados via intranasal com dose de 10⁴ PFU/animal dos vírus influenza recombinantes (Flu-IL22 ou Flu-Ct) e/ou 10² PFU/animal do vírus influenza selvagem H1N1 (A/PR/8/32) diluídos em PBS 1x no volume de 40 µL/animal (inóculo). O grupo Mock (controle negativo) recebeu o mesmo volume de inóculo, porém apenas com PBS 1x. Os animais foram acompanhados por 21 dias para avaliação da perda de peso e sobrevivência.

TABELA 3. Protocolo de coinfeção dos vírus recombinantes (Flu-IL22 e Flu-Ct) e/ou vírus selvagem H1N1 (A/PR/8/32)

Grupos	Inóculo (PFU/animal)	N° de animais
A/PR/8/32	10 ²	6
A/PR/8/32 + Flu-IL22	10 ² + 10 ⁴	6
A/PR/8/32 + Flu-Ct	10 ² + 10 ⁴	6
Mock	PBS	4

3.11 Avaliação do impacto da citocina IL-22 diante a coinfeção do vírus recombinante Flu-IL22 e *Streptococcus pneumoniae*

Camundongos C57BL/6, fêmeas, de 8 a 12 semanas foram anestesiados por via subcutânea e, em seguida, inoculados pela via intranasal com a dose de 10⁴ PFU/animal dos vírus influenza recombinantes (Flu-IL22 e Flu-Ct) e/ou 10² UFC/animal (dose subletal) da bactéria *S. pneumoniae* ATCC - 6303 sorotipo 3, em 40 µl de PBS, (TABELA 4). Quarenta e oito horas após a coinfeção, os animais foram eutanasiados e foi realizada a coleta do lavado broncoalveolar em ambiente estéril para determinação da carga bacteriana por titulação em placa ágar-sangue.

TABELA 4. Protocolo de coinfeção dos vírus recombinantes (Flu-IL22 e Flu-Ct) e/ou *Streptococcus pneumoniae* ATCC - 6303 sorotipo 3.

Grupos	Inóculo viral (PFU/animal)	Inóculo bacteriano (UFC/animal)	N° de animais
<i>S. pneumoniae</i>	-	10 ²	6
<i>S. pneumoniae</i> + Flu-IL22	10 ⁴	10 ²	7
<i>S. pneumoniae</i> + Flu-Ct	10 ⁴	10 ²	7
Mock	PBS	PBS	4

3.11.1 Determinação da carga bacteriana pulmonar

Para determinação da carga bacteriana nos pulmões, o BALF foi coletado através de 3 instilações com 1mL/pulmão de PBS 1x via traquéia. Os tubos foram centrifugados a 2.000xg por 10min a 4°C, o sobrenadante descartado e o precipitado bacteriano ressuspendido em 200µL de PBS 1x. A suspensão de bactérias foi diluída (razão 1:10) em PBS 1 x e 200µL de cada diluição foram aplicadas em placas de petri contendo ágar-sangue (BHI-ágar com 5% de sangue de carneio desfibrinado e 8µg/mL de gentamicina). As placas foram mantidas à 37°C sob restrição de oxigênio por 16-18 horas. A carga bacteriana foi determinada pela contagem de colônias que apresentavam α -hemólise (hemólise parcial).

3.12 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.

3.13 Análises Estatísticas

Para todas as análises estatísticas será utilizado o software de análises GraphPad Prism v7.0, utilizando o teste estatístico adequado.

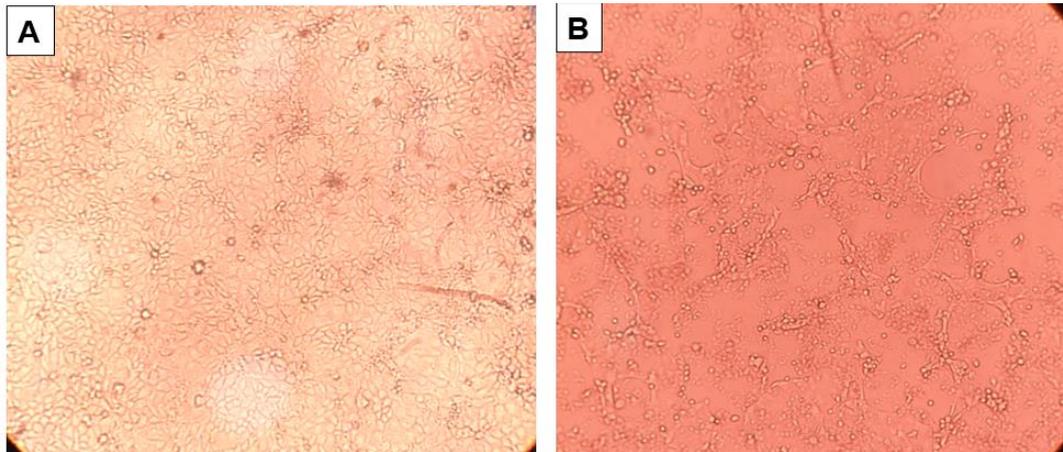
4. RESULTADOS

4.1 Padronização da construção dos estoques (semente e trabalho) do vírus recombinante Flu-IL22

A primeira etapa do projeto consistiu na padronização do protocolo para a construção dos estoques (ES e ET), primeiramente foram utilizadas diferentes concentrações de tripsina TPCK (1ug/mL; 2ug/mL; 3ug/mL; 4ug/mL; 8ug/mL) e neuraminidase (300µU/ml; 600µU/ml; 1200µU/ml) correlacionados com as m.o.i de 0,01 e 0,001. Essa etapa laboriosa foi necessária, pois todos os vírus influenza recombinantes possuem uma condição ideal para ser multiplicado, independentemente de todos eles compartilharem o fato de possuírem segmentos de neuraminidase truncados. Os resultados apresentados na figura 16 demonstram que após o período de 72h, as melhores condições foram 3ug/mL de TPCK e 600µU/mL de Neuraminidase, na m.o.i 0,001 por apresentar maior ECP e menor sofrimento celular no grupo controle (FIGURA 16). No intuito de melhorar a multiplicação viral do Flu-IL22, foi realizado um teste 48h após a infecção onde diferentes grupos foram novamente suplementados com (1) TPCK (3ug/mL); (2) Neuraminidase (600µU/mL); (3) TPCK (3ug/mL) e Neuraminidase (600µU/mL) ou (4) controle (sem adição dos componentes anteriormente citados). A nossa hipótese era a de que esses reagentes pudessem estar sendo consumidos durante a multiplicação viral de modo que necessitassem serem repostos. Os resultados após a suplementação não apresentaram diferenças significativas entre os títulos virais encontrados ($\sim 10^5$ PFU/mL), esse dado demonstra que embora os reagentes sejam naturalmente consumidos durante a multiplicação viral, a sua reposição não afeta significativamente na carga de partículas infectantes, diferentemente da concentração utilizada (FIGURA 17). Ao longo da padronização, se fez necessário a avaliação de nova condição de multiplicação da m.o.i utilizada, uma vez que, o Flu-IL22 não apresentou boa multiplicação para um ET na m.o.i de 0,001. Desse modo, foi utilizada uma m.o.i de 0,002 com as concentrações de TPCK e neuraminidase já padronizadas. Em suma, embora a m.o.i de 0,001 não tenha diferenças significativas com a m.o.i de 0,002, essa mudança delicada apresentou um impacto significativo no que tange a boa

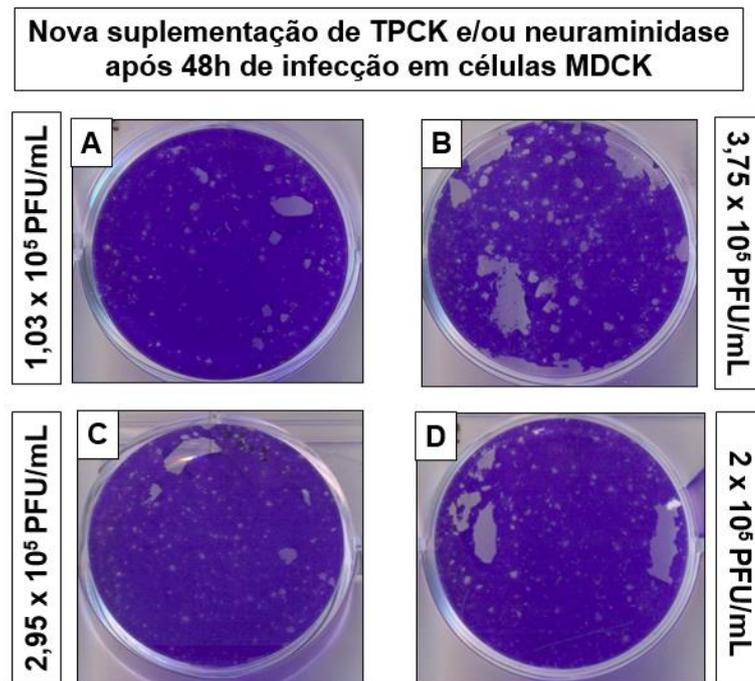
multiplicação do vírus recombinante Flu-IL22, logo a m.o.i de 0,002 ficou padronizada para a amplificação do Flu-IL22 com a adição de 3 μ g/mL TPCK e 600 μ U/mL de neuraminidase.

FIGURA 16. Padronização para a construção dos estoques (ES e ET) utilizando diferentes concentrações de TPCK e Neuraminidase nas m.o.i de 0,01 e 0,001. Após 72h da infecção em monocamada subconflente de MDCK, foi realizada a análise de ECP e sofrimento celular nas diferentes concentrações de TPCK e Neuraminidase correlacionadas com as m.o.i de 0,01 e 0,001. Em (A) está representado o grupo controle com ausência de sofrimento celular e (B) o efeito citopático observado, ambas nas concentrações de 3 μ g/mL TPCK e 600 μ U/mL de Neuraminidase.



Fonte: o autor.

FIGURA 17. Padronização de amplificação do Flu-IL22 após suplementação de TPCK e/ou neuraminidase em 48h após infecção. Após a suplementação não foram observadas diferenças significativas nos títulos virais entre os grupos que atingiram cerca de 10^5 PFU/mL. As condições testadas e seu respectivo título viral estão representados em (A) adição de TPCK; (B) adição de neuraminidase; (c) adição de TPCK e neuraminidase e (D) o controle sem a suplementação em 48h de infecção.



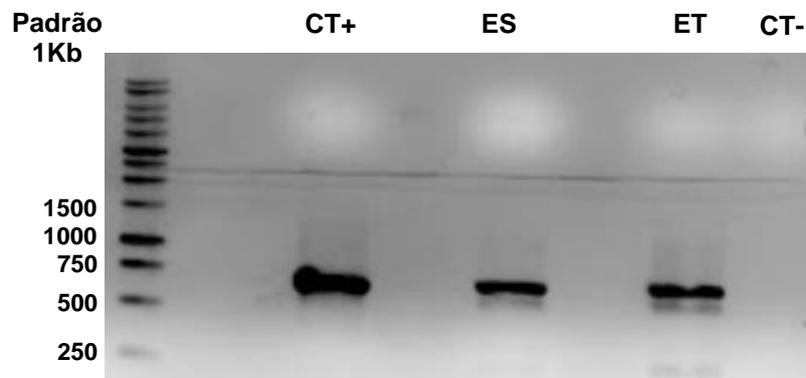
Fonte: o autor.

4.2 Caracterização dos estoques virais quanto a estabilidade genética

Os estoques virais (ES e ET) do vírus influenza recombinante carregando as sequências da citocina murina IL-22 no segmento recombinante truncado da NA, foram analisados no que diz respeito a sua estabilidade genética. Para tal, foi realizada a extração do RNA viral dos estoques, seguida pela síntese do DNA complementar (cDNA) através da transcrição reversa. Para a realização da PCR foram utilizados primers que pudessem amplificar todo o segmento da NA mutada, conforme mencionado na metodologia deste trabalho. Com o produto da PCR, foi realizada a corrida em gel de agarose a 1% conforme demonstrado na figura 18. Com a finalidade de manter o controle da qualidade do experimento, foi utilizado como controle positivo

(C+) o plasmídeo utilizado para a construção do vírus recombinante Flu-IL22 (pPR-IL-22), como controle negativo (C-) foi utilizado o mix da reação de RT-PCR sem o material genético. Após a análise do gel, os produtos de PCR foram purificados e enviados para a plataforma de sequenciamento do IRR – FIOCRUZ MINAS, utilizando a técnica de Sanger. Os resultados apresentados inferem que os tamanhos dos amplicons virais foram correspondentes àqueles de seus plasmídeos de origem (C+) e a análise de sequenciamento não apresentou mutações no segmento recombinante da NA. Em suma, os resultados foram positivos para a estabilidade genética dos estoques virais demonstrando que não houve a perda do inserto e permitindo que seguíssemos para as próximas etapas do projeto (FIGURA 18).

FIGURA 18. Eletroforese do produto de PCR da NA do vírus recombinante Flu-IL22 (ES e ET). Os produtos de PCR dos estoques trabalho (ET) e estoque semente (ES), foram realizados em gel de agarose a 1%, corados com brometo de etídio e revelados em transiluminador UV. Foi utilizado o padrão de 1Kb (Promega). Para o controle positivo (C+) foi utilizado o plasmídeo utilizado para a construção do vírus recombinante pPR-IL-22 (~700pb); para o controle negativo (C-) foi utilizado o mix sem DNA.



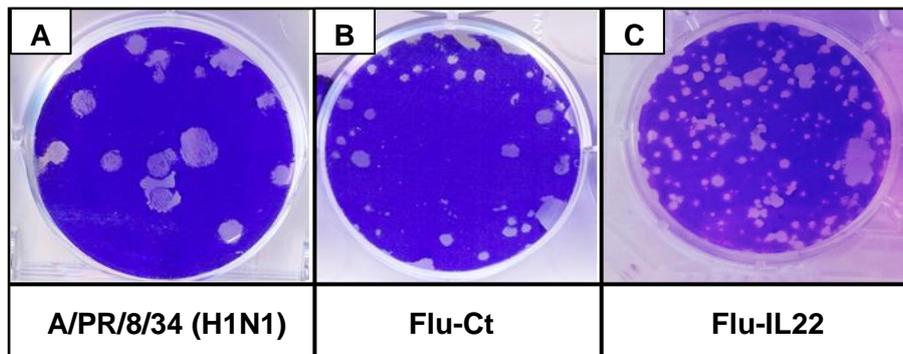
Fonte: o autor.

4.3 Caracterização fenotípica e determinação do título infeccioso dos estoques virais por titulação em placa de lise sob agarose

As caracterizações fenotípicas dos estoques virais (ES e ET) foram realizadas através da determinação do título infeccioso e avaliação dos fenótipos das placas de lise observadas em células MDCK sob agarose. Através da figura 19, pode ser

observado que o tamanho das placas de lise do vírus recombinante Flu-IL22 contendo sequências da citocina IL-22 é menor que aquelas do vírus com NA truncada sem inserto (Flu-Ct), que por sua vez é menor que as placas do vírus influenza selvagem H1N1 (A/PR/8/34). De forma correlata, o título infeccioso do vírus recombinante Flu-IL22 foi menor do que aquele dos vírus controle e selvagem, uma vez que, o Flu-IL22 atinge título infeccioso na ordem de 10^6 PFU/mL e os estoques de H1N1 (A/PR/8/34) e Flu-Ct atingem a ordem de 10^8 PFU/ml e 10^7 PFU/mL, respectivamente. Em suma, os vírus Flu-IL22 apresentaram títulos infecciosos na ordem de $1,5 \times 10^5$ PFU/mL para os ES, 2×10^6 PFU/mL para o ET e $8,4 \times 10^6$ PFU/mL para o mesmo ET após a purificação e concentração em colchão de sacarose (FIGURA 19).

FIGURA 19. Fenótipo das placas de lise de vírus selvagem e vírus recombinante visualizadas em células MDCK através da titulação viral por placa de lise sob agarose. Após setenta e duas horas da infecção em monocamada subconfluente de MDCK sob agarose, as células foram fixadas e coradas permitindo a visualização das placas de lise (formas circulares). Estão representados o vírus influenza selvagem H1N1 (A/PR/8/34) (A) e os vírus recombinantes Flu-Ct (B) e Flu-IL22 (C).



Fonte: o autor.

Durante o processo de caracterização do ET, após a etapa de purificação viral, começamos a ter dificuldade em titular os estoques virais pela técnica de placas de lise sob agarose. Desta forma, optamos utilizar, como técnica alternativa a titulação por TCID50 conforme o protocolo mencionado na metodologia deste trabalho, com o intuito de confirmar o título que foi analisado na primeira replicata da titulação de placa de lise sob agarose. Segundo os resultados representados na tabela 5, podemos

inferir que a técnica de titulação viral por TCID₅₀ apresentou reprodutibilidade entre suas replicatas e semelhantes ao apresentado pela titulação de placa de lise sob agarose, portanto, é uma técnica eficiente para a caracterização dos títulos infecciosos do vírus Flu-IL22 (TABELA 5).

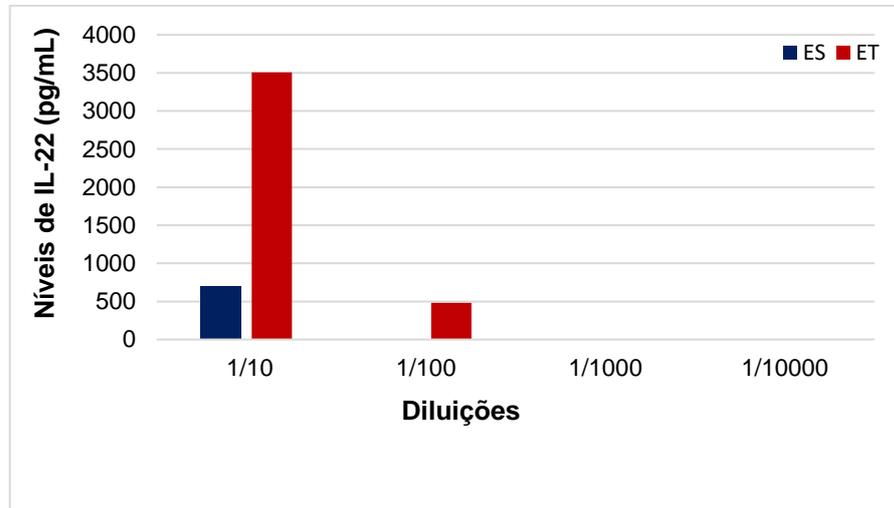
Tabela 5. Título viral do Flu-IL22 analisado em três replicatas utilizando duas técnicas diferentes: Titulação de placa de lise sob agarose e TCID₅₀. A titulação em placa de lise sob agarose apresentou sofrimento celular na 2° e 3° replicata dificultando a análise do título viral. As replicatas de TCID₅₀ foram consistentes entre si nas três replicatas e também com o título encontrado na 1° replicata de placa de lise sob agarose.

Flu-IL22	Placa de lise sob agarose	TCID ₅₀
1° Replicata	8 x 10 ⁶ PFU/mL	5,60 x 10 ⁶ PFU/mL
2° Replicata	Sofrimento celular	1,18 x 10 ⁷ PFU/mL
3° Replicata	Sofrimento celular	1,34 x 10 ⁶ PFU/mL

4.4 Caracterização funcional dos estoques virais quanto a produção da citocina IL-22 por células infectadas

A fim verificar se os estoques (ES e ET) produziam a citocina IL-22 em células MDCK infectadas, foi realizada a técnica de ELISA em uma diluição seriada de 1:10 dos sobrenadantes de cultura celular desses estoques. Conforme demonstrado na figura 20, foi verificado que ambos os estoques virais expressam de forma satisfatória a proteína IL-22. É notório que ocorre uma produção maior da citocina no ET, embora os mecanismos que levam a esse aumento não tenham sido avaliados, acreditamos que pode estar relacionado ao fato de que o ET apresenta um título viral maior em relação ao ES, desse modo, é sugestivo que quanto maior a quantidade de partículas infectantes maior será a produção da IL-22 (FIGURA 20).

FIGURA 20. Caracterização da produção de IL-22 no sobrenadante dos estoques semente e trabalho. O sobrenadante dos estoques semente e trabalho foram coletados para mensuração de IL-22 por reação enzimática através do ELISA. Os resultados estão representados em um gráfico de barras, no eixo X estão representadas as diluições realizadas (seriada em 1:10) e no eixo Y a produção de citocina em pg/mL.



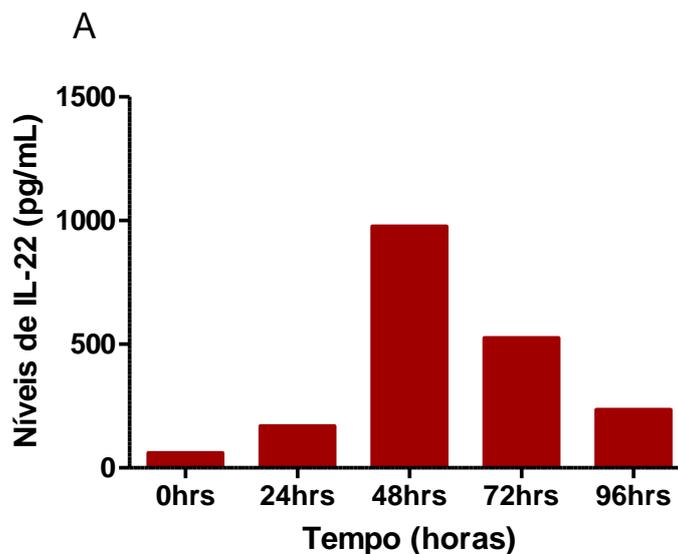
Fonte: o autor.

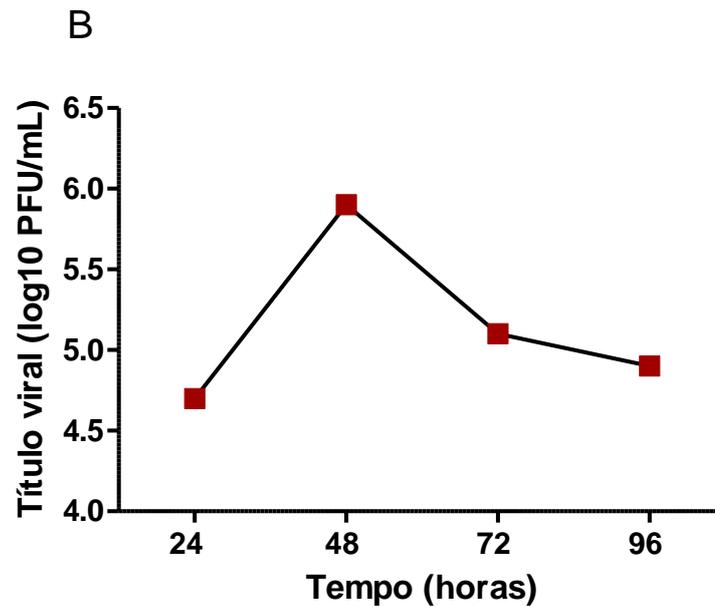
4.5 Cinética de produção da citocina IL-22 e carga viral (*in vitro*) em células MDCK infectadas com o vírus recombinante Flu-IL22

A fim de avaliarmos a cinética do vírus recombinante Flu-IL22 em células MDCK, essas foram infectadas com o vírus recombinante na mesma m.o.i utilizada para a construção do estoque trabalho (0,002). Em diferentes tempos após a infecção (24h, 48h, 72h e 96h), os sobrenadantes das células infectadas foram coletados para a quantificação da IL-22 através da técnica de ELISA e quantificação da carga viral por titulação de placa de lise sob agarose (FIGURA 21). Com relação a cinética de produção da citocina IL-22 podemos observar que o seu pico de produção foi em 48h após a infecção, reduzindo quase que pela metade a sua concentração no tempo de 72h e caindo para valores mais baixos no tempo de 96 horas após a infecção. No

tocante da análise de título viral, observamos que o seu pico também é atingido em 48h após a infecção, com um sutil declínio 72h após infecção. Concomitantemente, os resultados obtidos demonstraram que a produção da IL-22 está relacionada com o pico da multiplicação viral, (48h após a infecção). Enquanto o título infeccioso se mantém estável, a IL-22 apresenta uma redução em sua concentração a partir de 72h (FIGURA 21). Em ambas as cinéticas, não foram detectadas quantidades significativas de IL-22 no sobrenadante da cultura infectada com o vírus controle (Flu-Ct) ou Mock (PBS) (dados não mostrados).

FIGURA 21. Cinética da produção de IL-22 e carga viral em células MDCK infectadas com o Vírus recombinantes Flu-IL22. A infecção das células MDCK foi realizada com a m.o.i 0,02. O sobrenadante da cinética foi coletado 24h, 48h, 72h e 96h para mensuração de IL-22 por reação enzimática através do ELISA e quantificação da carga viral por titulação em placa de lise sob agarose. (A) Mensuração da IL-22 em células MDCK infectadas com a m.o.i 0,02; (B) quantificação da carga viral em células MDCK por titulação em placa de lise sob agarose. Os resultados estão representados, em um gráfico de barras (A), onde estão plotadas a concentração de citocina produzida em cada tempo. No eixo x estão representados os tempos avaliados em horas, no eixo y a produção de citocina em pg/mL. E também em gráfico de linha com símbolos (B), onde está plotado a quantificação do título viral em PFU/mL. No eixo x estão representados os tempos avaliados em horas, no eixo y a carga viral em PFU/mL.





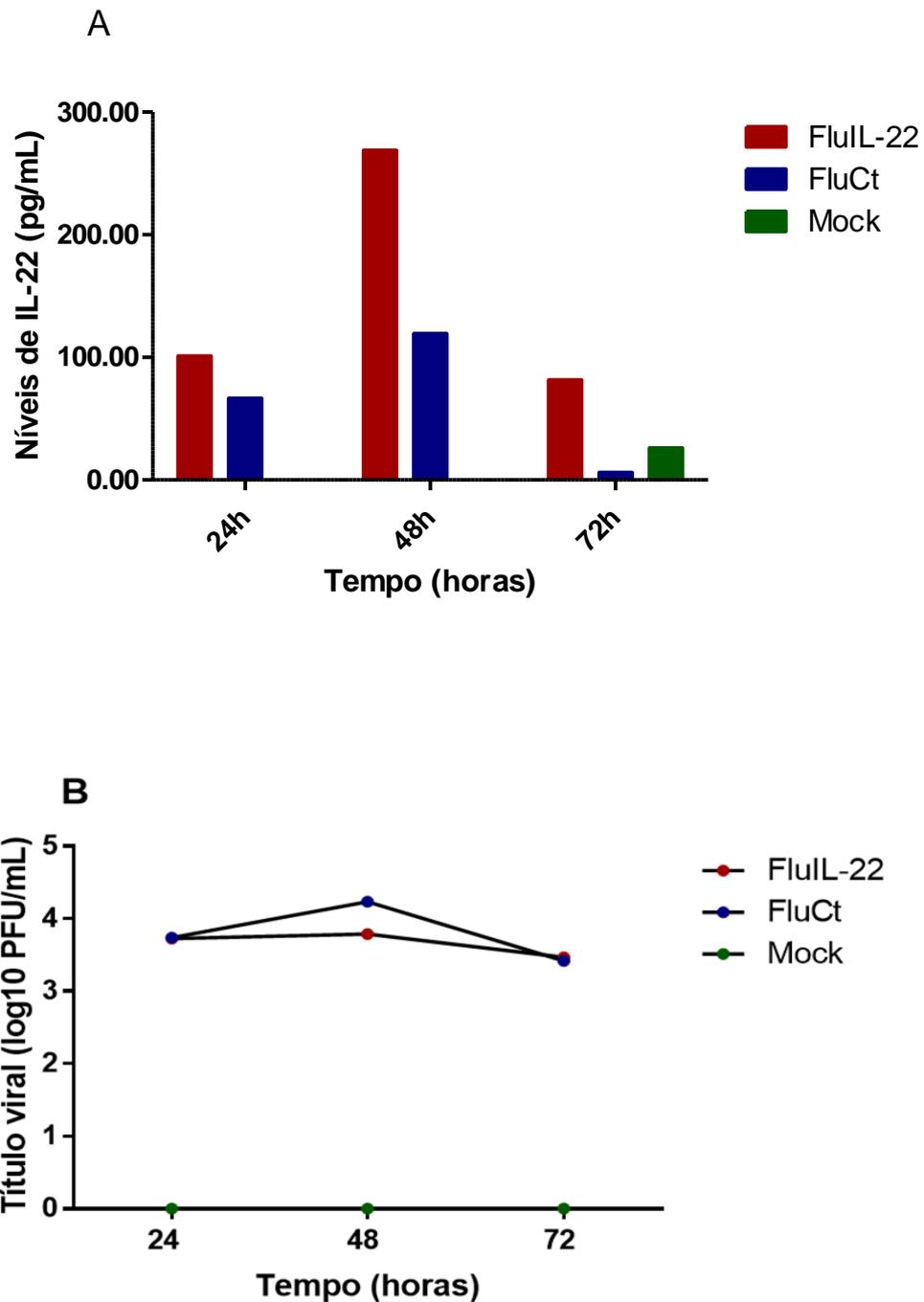
Fonte: o autor.

4.6 Cinética de produção da citocina IL-22 e multiplicação viral (*in vivo*) utilizando o modelo murino infectados com os vírus recombinantes Flu-IL22 e Flu-Ct

Uma vez que foi evidenciada a produção da citocina IL-22 pelo vírus recombinante FluIL22 em células MDCK, a etapa seguinte foi avaliar se essa produção também ocorria *in vivo*. As padronizações de dose inoculada em modelo murino com os vírus recombinantes já haviam sido padronizadas em trabalhos anteriores do nosso grupo, portanto não foi necessário a utilização de animais para essa atividade. Para avaliar a cinética de produção da IL-22 e a carga viral em modelo murino, foram utilizados camundongos C57BL6, machos, de 8 a 12 semanas, provenientes do Biotério de Produção do IRR. Os animais receberam o inóculo de 40ul por gotejamento via intranasal, contendo 10^4 PFU/animal dos vírus recombinantes (Flu-IL22 ou Flu-Ct), e o grupo mock recebeu o inóculo apenas PBS. Após a infecção os animais foram eutanasiados em diferentes tempos pós-infecção (24h, 48h e 72h), para a coleta dos pulmões e BALF, com o objetivo de mensurar os níveis de IL-22 pela técnica de ELISA e a carga viral por titulação em placa de lise sob agarose. Conforme mostrado na figura 22, a inoculação intranasal de

camundongos com Flu-IL22 foi capaz de induzir a produção da IL-22 no trato respiratório dos animais infectados. O pico de produção da IL-22, assim como o observado nas análises *in vitro*, aconteceu 48h após a infecção no BALF. É relevante o fato de que a inoculação com o próprio vírus Flu-Ct levou à produção da IL-22 nos animais infectados, embora tenha sido inferior quando comparada ao grupo Flu-IL22. Não obstante, enquanto os níveis da IL-22 permaneceram praticamente inalterados nos animais infectados com Flu-Ct no tempo de 48 horas após a infecção e reduzindo drasticamente no tempo de 72 horas após a infecção, os níveis de IL-22 aumentaram nos animais inoculados com o vírus Flu-IL22 no tempo de 48 horas após a infecção e diminuindo no tempo de 72 horas após a infecção (FIGURA 22), sendo este o tempo no qual a diferença dos níveis de IL-22 é mais relevante entre os dois grupos de animais vacinados. Estes dados demonstram que a produção da IL-22 ocorre de forma transitória no trato respiratório dos animais inoculados com o vírus recombinante Flu-IL22.

FIGURA 22. Cinética da produção de IL-22 e carga viral (*in vivo*) utilizando os vírus recombinantes Flu-IL22 e Flu-Ct. Os animais foram inoculados com os vírus recombinantes e posteriormente foram eutanasiados em diferentes tempos pós-infecção (24h, 48h e 72h). Com a coleta do BALF, foi realizada a quantificação da IL-22 (A) e com a coleta dos pulmões foram realizadas a quantificação da carga viral (B). Os resultados estão representados, em um gráfico de barras (A), onde estão plotadas as médias de produção da citocina em cada tempo. No eixo x estão representados os tempos avaliados em horas, no eixo y a produção de citocina em pg/mL. E também em gráfico de linha com símbolos (B), onde está plotado a quantificação do título viral em PFU/mL. No eixo x estão representados os tempos avaliados em horas, no eixo y a carga viral em PFU/mL.

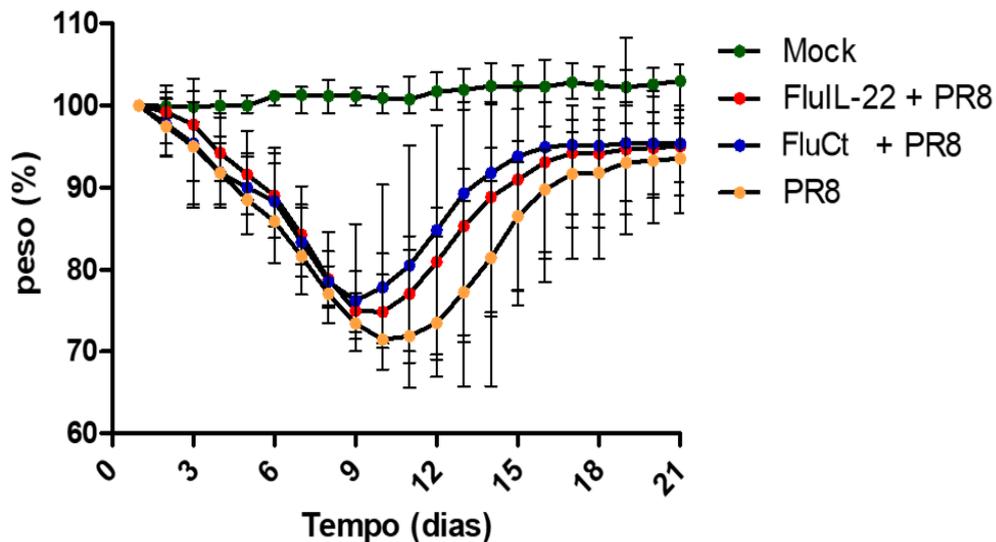


4.7 Ensaio de perda de peso e sobrevivência de camundongos inoculados com vírus recombinantes e/ou vírus selvagens (PR/8)

A fim de investigar se existe algum papel imunomodulatório realizado pelo Flu-IL22 no contexto de coinfeção com uma dose subletal do vírus influenza selvagem replicativo H1N1 (A/PR/8/34). Para tal, foram utilizados camundongos C57BL6, fêmeas, de 8 a 12 semanas, provenientes do CEBIO (ICB/UFMG), estes animais foram inoculados simultaneamente via intranasal (inóculo de 40ul) com os vírus recombinantes (Flu-IL22 ou Flu-Ct) (10^4 PFU/mL) e o vírus influenza selvagem H1N1 (A/PR/8/34) (10^2 PFU/mL). A perda de peso e a mortalidade dos animais foram acompanhadas durante 21 dias. As doses utilizadas para a inoculação foram padronizadas anteriormente por colaboradores do nosso grupo de pesquisa, em adição, trabalhos anteriores do mesmo grupo demonstraram que os vírus recombinantes são incapazes de causar doença nos animais, validando desta forma, a segurança na utilização do constructo para experimentação animal.

Desse modo, os resultados apresentados na figura 23 demonstram que não houve diferenças estatísticas na perda de peso entre os grupos coinfectados com os vírus recombinantes (Flu-IL22 ou Flu-Ct) com o vírus selvagem (A/PR/8/34) e o grupo infectado apenas com o vírus selvagem, embora o último tenha apresentado uma tendência maior a perda de peso e um atraso para a recuperação dos animais em comparação com os demais grupos. O grupo Mock que recebeu o inóculo apenas com PBS 1X apresentou seu peso estável durante toda a análise. O ensaio foi realizado em duplicata, ambas apresentaram a tendência de perda de peso por volta do 4 DPI com o ápice em 9 DPI e seguindo para a recuperação após 10 DPI, esses dados corroboram com o ciclo natural da infecção pelo vírus influenza, onde ocorre uma piora do ciclo da doença por volta do 7° ao 9° DPI, momento em que os animais estão mais suscetíveis há uma infecção bacteriana secundária. Desse modo, a coinfeção entre os vírus recombinantes (Flu-IL22 ou Flu-Ct) e o vírus selvagem (A/PR/8/32) não apresentam impacto no fenótipo de perda de peso nos animais (FIGURA 23).

FIGURA 23. Peso dos animais coinoculados pelos vírus recombinantes (Flu-IL22 e Flu-Ct) com o vírus influenza selvagem H1N1 (A/PR/8/34). O experimento foi realizado em duplicata. Os resultados estão representados em gráficos de símbolos e linhas em que estão plotadas as médias e erro padrão da média para cada grupo/tempo. No eixo x estão representados os tempos avaliados em dias e no eixo y estão representadas as porcentagens (%) de perda de peso



Fonte: o autor.

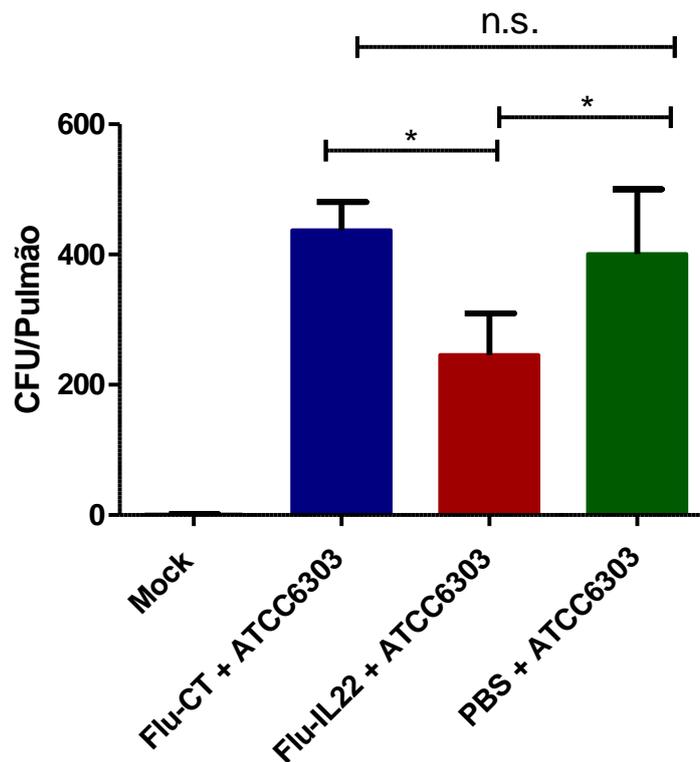
4.8 Avaliação do impacto na contagem bacteriana pulmonar após a coinfeção do vírus recombinante Flu-IL22 e *Streptococcus pneumoniae*

Uma vez que a principal complicação pelo vírus influenza é a infecção bacteriana secundária, nós resolvemos testar a hipótese de que o vírus recombinante (Flu-IL22) teria algum papel fundamental durante a infecção bacteriana, uma vez que, há relatos na literatura acerca do papel da IL-22 durante o processo de recuperação tecidual após infecções bacterianas. Para esta análise foram utilizados camundongos C57BL/6, fêmeas SPF, de 8 a 12 semanas, provenientes do CEBIO (ICB/UFMG). Os animais foram coinoculados via intranasal com a dose subletal (10^2 UFC/animal) da bactéria *Streptococcus pneumoniae* (ATCC6303) e 10^4 PFU/animal dos vírus recombinantes (Flu-IL22 ou Flu-Ct). Quarenta e oito horas após o desafio os animais

foram eutanasiados e o BALF coletado para determinação da carga bacteriana pulmonar por titulação em ágar sangue. A escolha de utilizar o BALF ao invés dos pulmões foi baseada na leitura do trabalho publicado por GOULART *et al.*, 2020, que demonstra a eficácia da utilização do BALF para análise de carga bacteriana, além de ser uma técnica mais prática no que diz respeito ao seu processamento quando comparada ao processamento dos pulmões. Após o processamento e diluição (1:10) do BALF, esses foram aplicados em placas de ágar-sangue que foram mantidas à 37°C sob restrição de oxigênio por 16-18 horas. A carga bacteriana foi determinada pela contagem de colônias que apresentavam α -hemólise (hemólise parcial).

Nossos resultados demonstraram um bom controle de qualidade do ensaio, uma vez que o grupo mock, que recebeu apenas PBS, não apresentou crescimento de colônias de *S. pneumoniae*. Em adição, podemos perceber que os grupos inoculados somente com cepa de *S. pneumoniae* ou coinoculados com o vírus recombinante Flu-Ct e a cepa bacteriana não apresentaram diferenças significantes quando comparados (FIGURA 24). Em contrapartida, o grupo que recebeu o vírus recombinante Flu-IL22 juntamente com a cepa bacteriana *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 6303) apresentou uma tendência significativa na redução de contagem bacteriana no BALF. Esse resultado nos leva a hipótese de que o nosso constructo viral pode apresentar algum mecanismo imunomodulador durante a infecção bacteriana pulmonar. É importante salientar que a cepa bacteriana utilizada neste estudo é de alta virulência.

FIGURA 24. Carga bacteriana no BALF de camundongos inoculados com os vírus recombinantes (Flu-IL22 e Flu-Ct) e/ou *Streptococcus pneumoniae* (ATCC6303). Os camundongos inoculados via intranasal com os vírus recombinantes (Flu-Ct e Flu-IL22) e/ou com a bactéria *Streptococcus pneumoniae* sorotipo 3 (ATCC6303), quarenta e oito horas após o desafio os o lavado broncoaveolar (BALF) foi coletado para quantificação da carga bacteriana através da titulação em ágar-sangue. Os dados estão plotados em gráfico de barras, nos quais estão representados os grupos no eixo x e no eixo y os valores da titulação bacteriana (UFC/pulmão). Diferenças estatisticamente significativa estão representadas por barras e asteriscos, conforme o grau de significância: (*) p=0,01 - 0,05, (**) p= 0,001 - 0,01 e (***) p< 0.001.



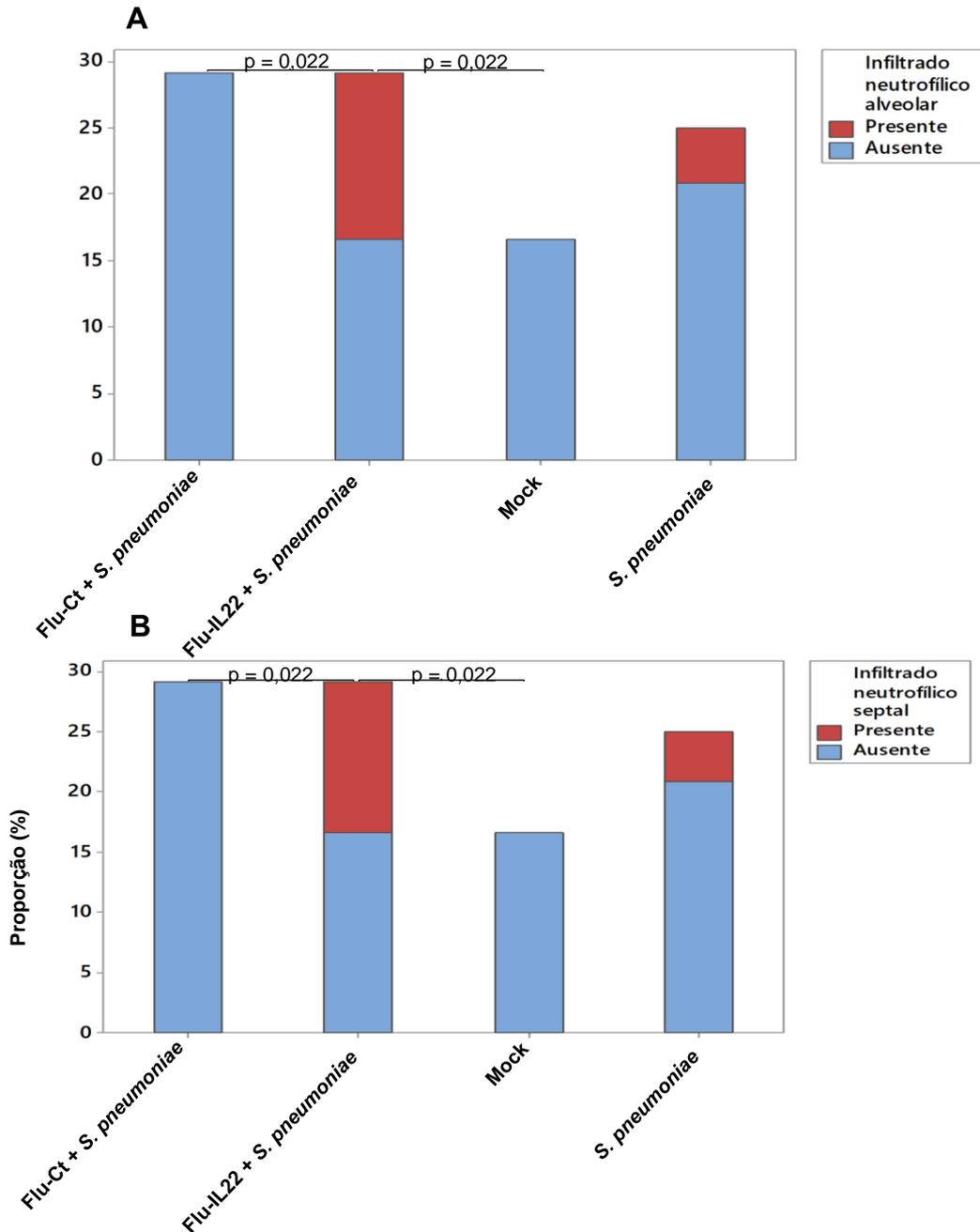
Fonte: o autor.

4.8.1 Análise histopatológica dos pulmões de animais infectados com os vírus recombinantes e *Streptococcus pneumoniae*

No intuito de avaliar alterações histopatológicas no tecido pulmonar, foi realizada uma coinfeção dos vírus recombinantes (Flu-IL22 ou Flu-Ct) com *S. pneumoniae*. Os pulmões foram coletados 48h após infecção e posteriormente foram fixados, corados com H&E e analisados sob microscopia óptica (FIGURA 26). No que

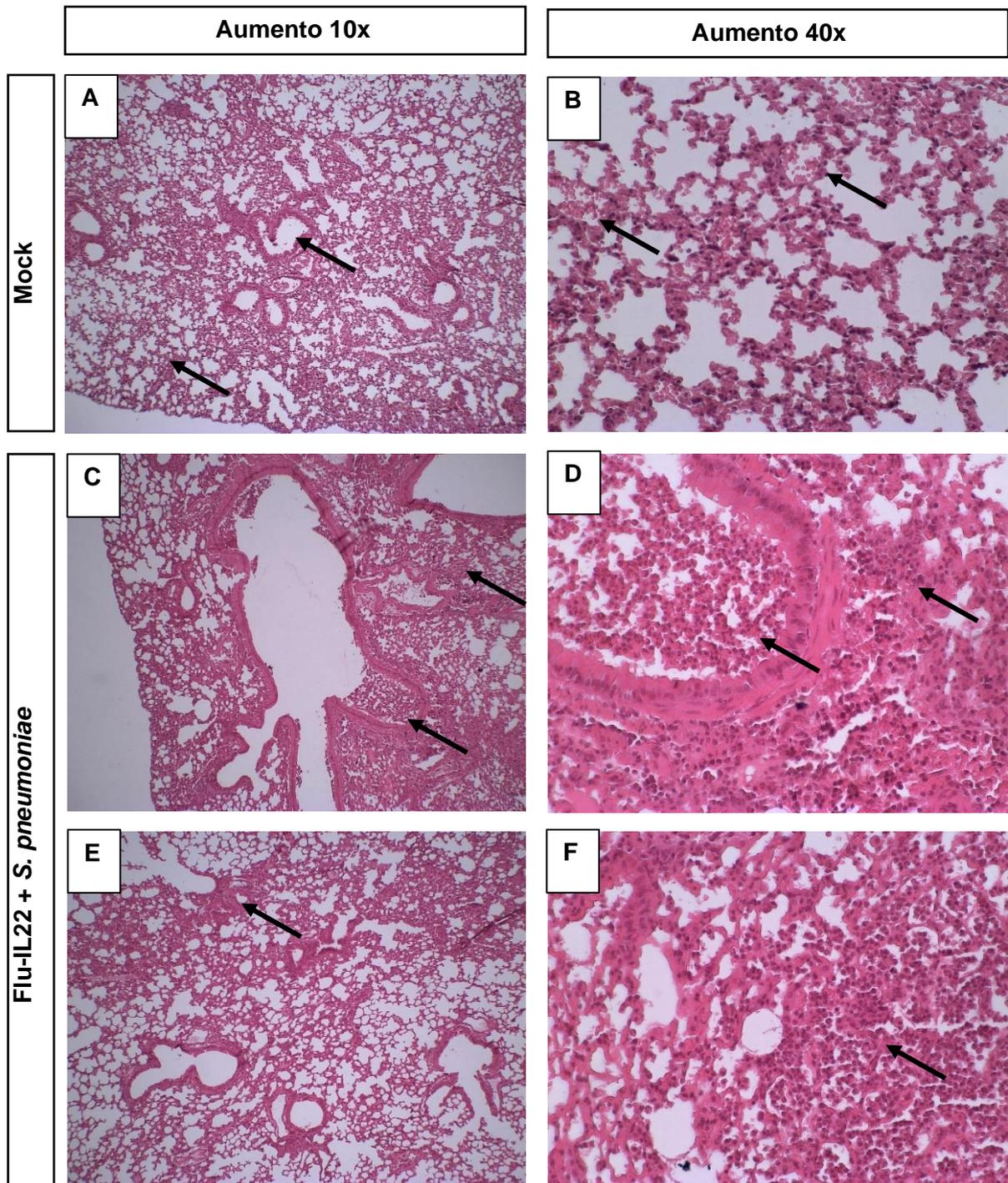
tange a análise das vias aéreas (brônquios e bronquíolos), foi observado a presença de edema e congestão em todos os grupos de forma discreta. Também foi observado discreta hemorragia nos grupos coinfectados pelos vírus recombinantes (Flu-IL22 e Flu-Ct) com *S. pneumoniae* e no grupo infectado apenas com *S. pneumoniae*. Além do mais, foi encontrado infiltrado inflamatório neutrofílico discreto nos grupos (Flu-IL22 + *S. pneumoniae*) e (Flu-Ct + *S. pneumoniae*). Nas análises do parênquima pulmonar (alvéolos) foi observado edema e congestão moderados e hemorragia alveolar discreta em todos os grupos. Os achados mais relevantes estão relacionados a presença de infiltrado neutrofílico septal de forma discreta e infiltrado neutrofílico alveolar acentuado no grupo (Flu-IL22 + *S. pneumoniae*). Por outro lado, o grupo (Flu-Ct + *S. pneumoniae*) e Mock não apresentaram infiltrado neutrofílico septal e alveolar em nenhum pulmão analisado. Quando o grupo (Flu-IL22 + *S. pneumoniae*) é comparado com o grupo que recebeu apenas *S. pneumoniae*, também se sobrepõem no que diz respeito aos infiltrados neutrofílicos, uma vez que o grupo que recebeu *S. pneumoniae* apresentou esse infiltrado de forma discreta e em menor quantidade animais (FIGURA 25 e 26).

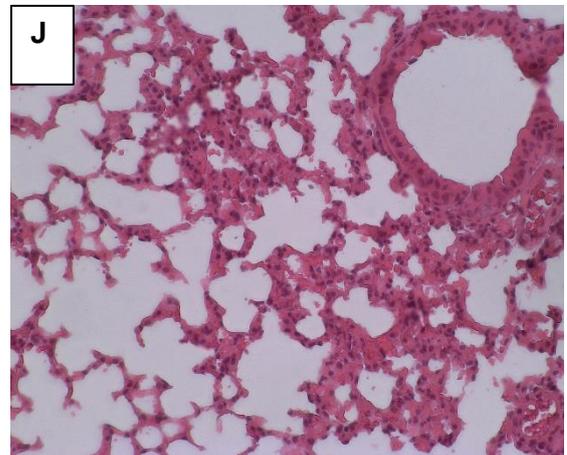
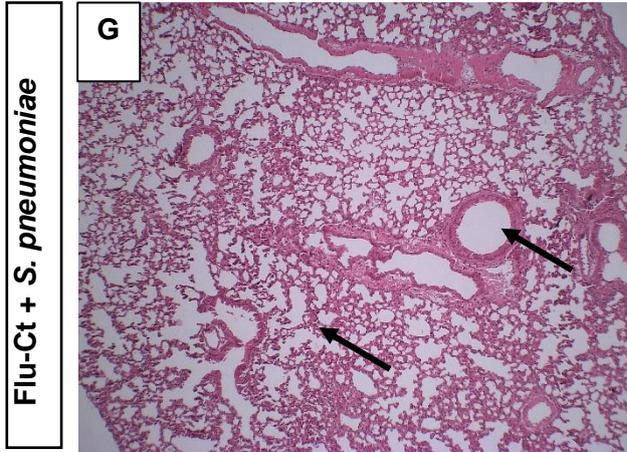
FIGURA 25. Alterações histopatológicas e perfil inflamatório das vias aéreas pulmonares de camundongos coinoculados com os vírus recombinantes (Flu-IL22 e Flu-Ct) e/ou *S. pneumoniae*. Os pulmões dos animais infectados foram coletados 48h após a inoculação via intranasal. Os pulmões foram fixados com solução tamponada de formaldeído a 10%, os tecidos foram processados e envolvidos em bloco de parafina, a partir do qual foram realizados cortes de 0,5 micron nos para confecção das lâminas histológicas, que foram coradas com H&E. As lâminas foram visualizadas em microscópio óptico sob lente de maior aumento (10x) para análise do tecido. No eixo y estão representados a porcentagem da ocorrência das variáveis avaliadas: Infiltrado neutrofílico septal e infiltrado neutrofílico alveolar. No eixo x estão representados os grupos experimentais analisados.



Fonte: o autor.

FIGURA 26. Alterações histopatológicas das vias aéreas pulmonares de camundongos inoculados com os vírus recombinantes (Flu-IL22 e Flu-Ct) e/ou *S. pneumoniae* (ATCC6303). Os pulmões dos animais infectados foram coletados 48h após a inoculação via intranasal. O pulmão foi fixado em solução tamponada de formaldeído a 10%, os tecidos foram processados e envolvidos em bloco de parafina, a partir do qual foram realizados cortes de 0,5 micron nos pulmões para confecção das lâminas histológicas, que foram coradas com H&E. As lâminas foram visualizadas em microscópio óptico sob lente de aumento de 10x/40x para análise do tecido. Nos quadros A e B, é possível observar um tecido pulmonar normal (brônquios, bronquíolos e alvéolos livres) e presença de extravasamento de hemácias. Os quadros C, D, E e F, apresentam brônquios e alvéolos com infiltrado inflamatório, edema e congestão tecidual, sendo que nos quadros D e F é possível visualizar detalhadamente o infiltrado inflamatório peribrônquico com predomínio de neutrófilos. Além do mais, nos quadros G, H, I e J, é possível observar uma estrutura pulmonar mais próxima daquelas observadas em A e B. O quadro I apresenta infiltrado inflamatório de forma discreta, não sendo comparado com o observado em C, D, E e F.





Fonte: o autor.

5. DISCUSSÃO

Os vírus influenza representam uma preocupação em escala global, uma vez que são responsáveis por importantes epidemias e pandemias ao longo da história. Estes vírus apresentam capacidade de infectar uma ampla gama de hospedeiros o que dificulta o controle de sua disseminação, tendo em vista as limitações para evitar que essas transferências interespécies ocorram (WEBSTER; GOVORKOVA, 2014; BOUVIER; PALESE, 2008). A marca registrada dos vírus influenza é a capacidade de sofrer rápida variação antigênica devido ao acúmulo de mutações nos sítios de ligação de anticorpos nas proteínas de superfície HA e NA, anulando a ligação de alguns anticorpos, favorecendo o escape da resposta imune pré-existente em humanos e dificultando a construção de uma vacina eficiente que possa alcançar todas essas variações (DUFFY; SHACKELTON; HOLMES, 2008; MCHARDY; ADAMS, 2009; SHINDE *et al.*, 2009; SMITH *et al.*, 2009; MEDINA; SASTRE, 2011). Desse modo, os estudos se intensificam na busca de novas estratégias vacinais que possam conferir resposta cruzada por similaridade antigênica nos sítios conservados do vírus influenza conferindo alta imunogenicidade e que seja capaz de promover resposta cruzada contra diferentes isolados (NYPAYER; DEHLINHER; CARTER, 2021).

Alguns trabalhos já investigaram a utilização de interleucinas como potenciais adjuvantes vacinais e como tratamento baseado na imunomodulação, tendo em vista que as citocinas são moléculas de sinalização celular usadas pelo sistema imunológico para promover a resposta de outras células (TREGONING; RUSSEL; KINNEAR, 2018). Neste sentido, a utilização de partículas virais recombinantes expressando o gene de citocinas específicas constituem uma estratégia relevante para a modulação da resposta imune à medida que a citocina é produzida *in loco* ao mesmo tempo que a resposta antiviral acontece (YANG *et al.*, 2009).

Diante do exposto, o nosso trabalho propôs uma análise distinta do que já foi realizado em outros estudos, utilizando um vírus influenza recombinante que produz a IL-22 de forma localizada e transitória. A escolha dessa citocina se deu através de relatos na literatura que demonstraram o seu envolvimento em diversos aspectos do sistema imunológico, na medida em que é um modulador com ação na preservação de um epitélio intacto. Essa característica faz com que a IL-22 possa ser um fator importante na proteção contra a infecção bacteriana secundária, a principal

complicação da infecção pelo vírus influenza (ZENEWICZ *et al.*, 2008; PICKERT *et al.*, 2009). A abordagem utilizada nesse trabalho consistiu em avaliar o impacto da IL-22 na imunopatologia da coinfeção do vírus recombinante com um vírus selvagem replicativo (A/PR/8/34) e coinfeção do vírus recombinante com *S. pneumoniae*.

Os vírus recombinantes utilizados nesse trabalho (Flu-IL22 e Flu-Ct) são defectivos para a multiplicação, uma vez que, apresentam a NA do vírus truncada, sendo esta, importante para a liberação das novas partículas virais formadas. Os vírus Flu-IL22 são capazes de infectar as células do hospedeiro e expressar o gene exógeno (IL-22), este vírus apresenta a característica de infecções abortivas, não sendo capazes de gerar progênie viral e infectar novas células, uma particularidade importante no que diz respeito a biossegurança. Neste contexto, em todos os experimentos que requeriam a multiplicação dos vírus recombinantes foi adicionada à neuraminidase exógena (de *Vibrio cholerae*) no meio de amplificação para suprir a falta da sialidase viral. Contudo, como observado em outros trabalhos do nosso grupo, a adição da neuraminidase exógena não é suficiente para garantir uma replicação eficiente dos constructos com NA viral truncada, de tal forma que os estoques de vírus recombinantes produzidos alcançam títulos infecciosos inferiores àqueles atingidos pelos vírus selvagens (MESSIAS, 2019).

Assim sendo, o primeiro passo deste trabalho foi produzir estoques virais com uma concentração satisfatória de partículas recombinantes viáveis, uma etapa laboriosa que representou uma das grandes dificuldades encontradas neste trabalho. No intuito de aprimorar este processo foram realizadas adaptações no protocolo experimental, a fim de favorecer uma boa multiplicação do vírus Flu-IL22, dentre elas o ajuste das concentrações de TPCK e neuraminidase no meio de amplificação viral. Essa etapa é importante uma vez que as células podem apresentar sensibilidade a determinadas concentrações TPCK e neuraminidase, mesmo que essas moléculas sejam cruciais para uma boa replicação dos vírus recombinantes em cultura celular (MESSIAS, 2019). Ademais, é importante que haja um equilíbrio entre a capacidade de ligação da hemaglutinina aos seus receptores e a atividade sialidase da neuraminidase bacteriana. Durante as padronizações foi observado que concentrações maiores de TPCK (4ug/mL e 8ug/mL) aumentavam o sofrimento celular e que as concentrações mais baixas (1ug/mL e 2ug/mL) não favoreciam uma boa replicação viral. E no que tange as concentrações testadas de neuraminidase, não foi observada grandes diferenças entre as concentrações 600µU/ml e 1200µU/ml e a

concentração de 300 μ U/ml foi correlacionada a baixa replicação viral. Diante do exposto, para alcançar o equilíbrio entre essas moléculas ficou definido que 3 μ g/mL TPCK e 600 μ U/ml eram as concentrações ideais para amplificação do vírus Flu-IL22, uma vez que favoreceram uma boa multiplicação para o preparo dos estoques dos vírus recombinantes, com o mínimo de sofrimento celular e partículas defectivas. A escolha da m.o.i utilizada também é uma etapa crucial para a obtenção de um bom estoque viral do vírus recombinante, neste trabalho testamos três m.o.i (0,01; 0,001 e 0,002). A m.o.i de 0,01 não favoreceu um bom resultado no que tange o resgate de partículas virais viáveis, uma vez que ocorre uma multiplicação de forma acelerada refletindo na destruição da monocamada celular de forma mais rápida, favorecendo o surgimento de partículas virais não viáveis, com a perda do incerto. Embora as m.o.i de 0,001 e 0,002 não apresentem grande diferença entre si, os resultados demonstraram que a m.o.i de 0,002 foi a que mais favoreceu o resgate satisfatório de partículas virais recombinantes viáveis. Com o intuito de aperfeiçoar ainda mais a amplificação viral, foi testada a hipótese de que a adição de TPCK (3 μ g/mL) e neuraminidase (600 μ U/ml) 48h após a infecção da monocamada celular poderia aumentar o título infeccioso viral, todavia os resultados obtidos não apresentaram diferenças significativas entre os grupos testados. Em suma, após as padronizações realizadas ficou estabelecido que para o Flu-IL22 as melhores concentrações de TPCK e Neuraminidase seriam de 3 μ g/mL e 600 μ U/ml, respectivamente, na m.o.i de 0,002.

Esses resultados refletem o delicado equilíbrio a ser alcançado entre a atividade de adsorção das partículas virais às moléculas de ácido siálico mediadas pela hemaglutinina e a atividade de sialidase da neuraminidase. De fato, um dos mecanismos utilizados pelo vírus influenza para se tornar resistente às drogas inibidoras da neuraminidase, tais como o oseltamivir, consiste exatamente na alteração da força de ligação da hemaglutinina ao seu receptor, mais especificamente, diminuindo a sua afinidade pelas moléculas de ácido siálico, tornando-as conseqüentemente, menos dependente da atividade da neuraminidase (LAMPEJO, 2020). Ademais, em se tratando da infecção do trato respiratório, sabe-se que a neuraminidase também apresentaria um papel importante nas etapas iniciais da infecção viral, removendo, através de sua atividade sialidase, as camadas de muco que revestem o epitélio celular, favorecendo que as partículas virais atinjam as células do epitélio do trato respiratório, permitindo a sua infecção (DOU *et al.*, 2018).

A caracterização genotípica é fundamental para avaliar a estabilidade genética do vírus recombinante, uma vez que, ao longo da replicação viral o vírus recombinante pode perder ou sofrer mutações em seu inserto heterólogo. Nossos resultados de PCR e sequenciamento demonstraram que o Flu-IL22 apresenta a estabilidade genética desejada, essa análise foi realizada em ambos os estoques (ES e ET), a fim de certificar que durante a multiplicação viral em células MDCK para o preparo do ET os vírus recombinantes não tenham sofrido alterações no seu inserto heterólogo, mesmo que o ES já tenha apresentado uma estabilidade genética. Estes dados demonstram que apesar da sequência da IL-22 não ser necessária para a multiplicação viral, ela pode ser importante para que o segmento truncado da NA seja corretamente empacotado. A partir da confirmação da estabilidade genética, as análises seguiram para a caracterização fenotípica do Flu-IL22.

A primeira análise do fenótipo do nosso vírus recombinante Flu-IL22, consistiu em analisar se nossos estoques (ES e ET) seriam capazes de produzir a IL-22 em cultura de células MDCK. Essas análises foram realizadas através de ELISA e os resultados demonstraram que o nosso vírus recombinante Flu-IL22 produz de forma satisfatória a citocina IL-22, essa produção ocorre a partir da própria maquinaria da célula infectada sendo detectada no sobrenadante de cultura celular. Posteriormente, com a realização da titulação em placa de lise sob agarose, observamos que o vírus recombinante Flu-IL22 apresenta placas de lise bem menores quando comparadas com as placas formadas pelo vírus selvagem H1N1 (A/PR/8/34) e do vírus controle (Flu-Ct), além do seu título viral ser 100 vezes inferior (10^6 PFU/mL) que o vírus selvagem e cerca de 10 vezes menor que o Flu-Ct. Apesar dos mecanismos responsáveis por estes fenótipos não terem sido avaliados, é possível que a inserção de uma sequência heteróloga impacte negativamente na replicação do segmento da NA e/ou no processo de empacotamento dos complexos ribonucleoproteicos deste segmento, durante o processo de brotamento das partículas virais (LI *et al.*, 2021). Não obstante, os dados obtidos com nosso constructo e demais vírus recombinantes construídos pelo nosso grupo, demonstraram que os vírus influenza recombinantes carreando citocinas são surpreendentemente estáveis, não apresentando qualquer tipo de mutação ou deleção da sequência heteróloga inserida na NA (dados não mostrados).

A fim de entender mais sobre as características do Flu-IL22, foi realizada uma cinética *in vitro* através da infecção de células MDCK com o vírus recombinante, onde analisamos o título infeccioso e a produção da IL-22 em diferentes tempos (24h; 48h e 72h). Foi observado que o pico de produção da citocina ocorre em 48h após a infecção, esse dado é correlacionado ao pico de multiplicação viral que atinge o seu máximo também 48h após a infecção. No que tange a produção da citocina, podemos observar que após o seu pico de 48h ocorre uma queda em quase 50% da sua concentração e voltando em 72h para níveis mais próximos daqueles encontrado em 24h de infecção, confirmando que a produção dessa citocina pelos nossos vírus recombinantes ocorre de forma transitória, assim como já foi observado em outros trabalhos do nosso grupo de pesquisa.

Posteriormente, realizamos uma cinética *in vivo*, a fim de avaliar como seria o comportamento do vírus recombinante Flu-IL22 em modelo murino. Para a realização de experimentos em modelo murino, vale a pena ressaltar, que os vírus recombinantes contruídos em nossos grupos de pesquisa foram previamente testados por colaboradores no que diz respeito a segurança da utilização dos vírus recombinantes em animais, os resultados demonstraram que esses vírus não causam doença em animais (resultados não apresentados). Ademais, as doses dos vírus recombinantes inoculados nos animais também foram previamente padronizadas por colaboradores. Nossos resultados demonstram que apesar de não ocorrer um aumento da carga viral em relação ao inóculo, ela se manteve estável durante todo experimento. Apesar de surpreendentes e discordantes com dados anteriores obtidos no nosso laboratório, nos quais detectamos uma forte queda da carga viral no tempo de 48h após a infecção e que ela se torna indetectável no tempo de 72h após a infecção, acreditamos que esses resultados possam ser um artefato de técnica. Mais especificamente, as células do epitélio pulmonar, contendo as partículas virais agregadas, poderiam estar liberando essas partículas quando o tecido foi macerado para análise e assim, permitindo a infecção das células em cultivo. Além do mais, observamos que o pico da IL-22 no BALF ocorre em 48h após a infecção. Embora tenhamos detectado a produção da IL-22 no BALF dos animais infectados com o vírus Flu-Ct, ela foi significativamente menor do que a aquela detectada no BALF dos animais inoculados com o vírus Flu-IL22, sobretudo no tempo de 72h após a infecção. Esse achado pode ser justificável pois em se tratando de animais, eles podem

apresentar alguma infecção preexistente e/ou podem ter desenvolvido uma resposta imune ao próprio Flu-Ct. Ademais, a presença da produção dessa citocina com a inoculação do Flu-Ct não irá impactar na avaliação do papel imunomodulador do Flu-IL22, uma vez que esse apresenta concentrações significativamente maiores em relação aos controles.

Embora a IL-22 não esteja associada a complicações pela infecção do vírus influenza, esse achado se torna relevante, tendo em vista que alguns estudos já relataram que a produção descontrolada dessa citocina favorece a inflamação dérmica e acantose, inflamação das vias aéreas induzida por bleomicina, artrite induzida por colágeno e choque de lipopolissacarídeos, em parte pelo aumento da inflamação tecidual em conjunto com fatores inflamatórios, como o fator de necrose tumoral alfa (TNF - α) e IL-17. Além do mais, a presença prolongada de IL-22 também pode podendo promover danos teciduais e câncer (SABIHI *et al.*, 2020; IVANOV *et al.*, 2013). Desta forma a produção da IL-22 de forma localizada e transitória, poderá ser importante para garantir os efeitos terapêuticos dessa citocina, sem que haja por outro lado, os efeitos deletérios da sua produção sustentada.

De um modo geral, tanto a cinética *in vitro* quanto *in vivo* demonstraram que o nosso vírus recombinante Flu-IL22 realiza a produção da IL-22 de forma satisfatória, esses dados nos permitem realizar infecções “programadas”, uma vez que sabendo o pico de produção dessa citocina podemos realizar a inoculação intranasal sabendo exatamente quando iremos ver o efeito imunomodulatório da IL-22 no contexto de infecção por influenza e *S. pneumoniae*. Essa característica do nosso modelo experimental se torna um diferencial quando comparada a outros modelos de estudo que utilizam injeção sistêmica da citocina, proteína de fusão bilateral ou utilização de proteína de ligação (BARTHELEMY *et al.*, 2018; HAN *et al.*, 2021; ABOOD *et al.*, 2019).

Nesse contexto, foi realizado um ensaio de perda de peso e mortalidade dos animais coinoculados com os vírus recombinantes (Flu-IL22 ou Flu-Ct) com o vírus selvagem H1N1 (A/PR/8/34). Nossos resultados, após o acompanhamento desses animais por 21 dias, demonstraram que no contexto de coinfecção do Flu-IL22 com o vírus influenza selvagem H1N1, não ocorreu um impacto significativo na recuperação desses animais através da ação do nosso vírus recombinante. O vírus influenza é conhecido por danificar de forma significativa o complexo da junção apical das células epiteliais, que são críticas para a regulação da permeabilidade paracelular e garantir

regeneração epitelial das vias aéreas e a integridade da barreira (POCIASK *et al.*, 2013; KUMAR *et al.*, 2012). Além do mais, trabalhos já demonstraram que a expressão de vários genes que codificam fatores envolvidos na junção célula-célula e no reparo/proteção tecidual foi induzida por IL-22. Em consonância com isto, o tratamento com IL-22 durante a gripe melhorou a função da barreira epitelial-endotelial pulmonar, avaliada por uma diminuição da concentração total de proteína nos fluidos de BALF dos animais tratados (BARTHELEMY *et al.*, 2018). Uma vez que o nosso modelo de estudo apresenta o pico de produção da citocina IL-22 em 48h após a infecção (conforme apresentado nas cinéticas *in vivo* e *in vitro*), correlacionamos esses dados com o processo patológico da infecção por influenza, que apresenta o pico da inflamação e susceptibilidade a infecção bacteriana no sétimo dia pós-infecção (BARTHELEMY *et al.*, 2018). Desse modo, a partir dos nossos dados e relatos na literatura, inferimos que a melhor aplicação para o nosso modelo experimental seria realizar a inoculação do Flu-IL22 em forma de tratamento, de modo que o pico de citocina produzida coincida com o pico inflamatório e lesão pulmonar ocasionado pelo vírus influenza.

Diante do exposto, realizamos uma nova tentativa de avaliar o papel do Flu-IL22 utilizando outra cepa selvagem do vírus influenza (H3N2) a fim de evitar uma resposta imune ao próprio vírus recombinante, uma vez que ele é construído a partir do vírus influenza H1N1. Desse modo, realizamos o tratamento com o vírus recombinante Flu-IL22 no quarto dia pós-infecção com o vírus selvagem H3N2 (resultados não apresentados), todavia, os animais utilizados sucumbiram à infecção pelo vírus de subtipo H3N2 utilizado, independente da dose utilizada, vindo a falecer em torno do quinto/sexto dia pós infecção. Uma alternativa a ser futuramente explorada será a utilização de um isolado de subtipo H3N2 que seja adaptado a camundongos e que apresente menor grau de virulência, a fim de que possamos tentar validar a nossa hipótese. Para tal fim, será necessário previamente adaptar esse vírus influenza aos camundongos através de sucessivas passagens nesses animais, haja vista o fato de que o vírus influenza não é um patógeno natural de camundongos, apesar de poder ser adaptado a esses animais.

A principal complicação relacionada a infecção pelo vírus influenza é a infecção bacteriana secundária, ocasionada principalmente por *Staphylococcus aureus* ou *Streptococcus pneumoniae* (RYNDA-APPLE; ROBINSON; ALCORN, 2015). Este processo ocorre devido a desregulação da resposta imune e danos ao

revestimento epitelial pulmonar (ABOOD *et al.*, 2019; RYNDA-APPLE; ROBINSON; ALCORN, 2015). Apesar da introdução de antibióticos para infecções bacterianas e vacinas contra influenza, as mortes por pneumonia bacteriana secundária continuam sendo um problema de saúde pública (BAKALETZ, 2017). Desse modo, se faz necessário à procura de vias alternativas para tratamento da gripe a fim de reduzir as complicações ocasionadas por essa infecção ou até mesmo para sua prevenção. Diante do exposto, analisamos o papel imunomodulador da coinfeção do nosso vírus recombinante com uma dose subletal de *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 6303). Nossos resultados demonstraram uma tendência de redução da contagem bacteriana no BALF, esses dados corroboram com outros trabalhos já realizados (IVANOV *et al.*, 2013; PAGET *et al.*, 2012; KUMAR *et al.*, 2013; POCIASK *et al.*, 2013; BARTHELEMY *et al.*, 2018; SHABGAH *et al.*, 2017). Vale a pena destacar que a análise da coinfeção bacteriana conta com alguns fatores limitantes, tais como (1) a utilização da dose subletal pode não desenvolver pneumonia em todos os animais, uma vez que, a própria imunidade inata pode realizar a resolução da infecção e (2) a cepa ATCC 6303 do *S.s pneumoniae* apresenta alta virulência, portanto a utilização de doses mais elevadas para que todos os animais desenvolvam pneumonia pode levar a morte desses animais. Futuramente, para conseguirmos analisar mais aprofundadamente o impacto do nosso vírus recombinante na coinfeção com *S. pneumoniae*, será necessária a utilização de uma cepa bacteriana mais adaptada a camundongos e menos virulenta.

Por fim, realizamos análises histopatológicas dos pulmões de animais que foram coinfectados com os vírus recombinantes (Flu-IL22 ou Flu-Ct) e/ou *S. pneumoniae* (ATCC 6303). Nossa análise apresentou a mesma problemática citada anteriormente, uma vez que não foram todos animais que evoluíram para pneumonia bacteriana. Apesar da heterogeneidade dos animais com pneumonia, nós conseguimos observar um mecanismo da imunomodulação do vírus recombinante Flu-IL22, uma vez que no grupo (Flu-IL22 + *S. pneumoniae*) ocorreu maior proporção do infiltrado neutrofílico septal e alveolar no parênquima pulmonar, diferentemente do observado nos demais grupos. Embora não tenha sido realizado o acompanhamento desses animais em um tempo superior a 48h para aprofundar as análises a cerca desse infiltrado inflamatório e possíveis outros achados histopatológicos, inferimos que o infiltrado neutrofílico, neste cenário agudo, representa um mecanismo positivo

para a depuração bacteriana. Ademais, esse resultado pode ser correlacionado com a redução da contagem bacteriana no BALF durante a coinfeção do Flu-IL22 com *S. pneumoniae* no mesmo tempo de 48h após a infecção, diferente do observado nos demais grupos de análise. Sabe-se que os neutrófilos desempenham um papel crucial no controle da carga de *S. pneumoniae* (AMULIC *et al.*, 2012), uma vez que desempenham um papel crítico na regulação da inflamação através da produção de citocinas que recrutam leucócitos adicionais para o local da infecção (TECCHIO *et al.*, 2014).

Conforme já foi mencionado, sabe-se que a IL-22 desempenha papéis fundamentais na defesa do hospedeiro contra microorganismos. Nossos achados tanto na contagem bacteriana do BALF quanto na histopatologia vão de acordo com os relatos na literatura, uma vez que trabalhos anteriores já demonstraram que a IL-22, trabalhando juntamente com outras citocinas, como a IL-17, possui funções efetora *in vivo* que são cruciais para manter a imunidade da mucosa contra patógenos específicos e incluem a indução de proteínas antimicrobianas, recrutamento de neutrófilos para locais de invasão bacteriana e aumento do reparo e manutenção da barreira da mucosa estimulando a proliferação de células epiteliais e produção de proteínas de junção (LIANG *et al.*, 2006 ; AUJLA *et al.*, 2008 ; ZHENG *et al.*, 2008; PICKERT *et al.*, 2009). Em outros modelos de estudos envolvendo infecções intestinais, também foi constatado que a IL-22 promove o recrutamento de neutrófilos em resposta a Infecção por *Salmonella entérica*, através da IL-23 que estimula a produção dessa citocina através das células T da mucosa intestinal (GODINEZ *et al.*, 2009). Coletivamente nossos dados demonstraram que o Flu-IL22 tende a apresentar um papel importante na imunomodulação durante a coinfeção com *S. pneumoniae*, para aperfeiçoar as nossas análises e aprofundar os estudos a cerca desse vírus recombinante, se faz necessário adaptações das cepas virais e bacteriana utilizadas.

6. CONCLUSÃO

O presente trabalho contribuiu para conhecimento científico acerca do papel da IL-22 durante a infecção por influenza e *S. pneumoniae*, através da utilização de um vírus influenza recombinante, que utiliza a própria maquinaria da célula infectada para realizar a produção dessa citocina. A estratégia de utilizar o vírus recombinante é um diferencial, uma vez que a produção da citocina ocorre de forma localizada e transitória representando uma abordagem diferente das encontradas na literatura para a análise de citocinas em modelo murino. A construção e caracterização do Flu-IL22 apresentou estabilidade genética do inserto heterólogo, significativa produção da IL-22 tanto *in vitro* quanto *in vivo*, além de ter alcançado um bom título infeccioso. Ademais, a cinética realizada em células MDCK bem como em modelo murino demonstraram que tanto o pico de produção da IL-22 quanto o do título infeccioso do Flu-IL22 ocorre em 48h após a infecção, reafirmando que a produção da citocina ocorre de forma transitória, caracterizando o diferencial do nosso modelo de estudo. Além do mais, foi observado que a administração intranasal do Flu-IL22 no contexto de coinfeção com o vírus influenza selvagem H1N1 (A/PR/8/34) não apresentou impacto na perda de peso dos animais, esse resultado pode estar correlacionado ao fato de que no tempo de 48h após a infecção, momento em que ocorre o pico de produção da IL-22, essa citocina não apresenta efeitos protetores para a recuperação desses animais. Em contrapartida, o principal achado está relacionado a coinfeção entre o Flu-IL22 e *S. pneumoniae* (ATCC6303) que apresentou uma tendência na redução da contagem bacteriana quando comparado aos demais grupos de análise, esse dado vai de acordo ao encontrado na literatura, representando um ponto positivo para o nosso modelo experimental. Ademais, nossas análises histopatológicas demonstraram que o grupo coinfectado com o vírus recombinante Flu-IL22 e *S. pneumoniae* (ATCC6303) apresentaram maior infiltrado neutrofílico septal e aoveolar em comparação com os demais grupos, esse resultado pode representar um dos mecanismos imunomodulatórios do vírus Flu-IL22 para a redução da contagem bacteriana pulmonar, uma vez que os neutrófilos são cruciais para a depuração bacteriana. Em suma, esses foram os primeiros passos para posterior aprofundamento nos mecanismos imunomodulatórios induzidos pelo vírus recombinante Flu-IL22 durante a infecção por influenza e *S. pneumoniae*.

7. PERSPECTIVAS

Como perspectivas deste trabalho temos a adaptação em modelo murino de novas cepas de influenza selvagem (H3N2) e *S. pneumoniae* (ATCC6303), de modo que fiquem menos virulentas, possibilitando que os animais desenvolvam a doença de forma homogênea sem sucumbir a infecção. Além disso, será realizada as padronizações de protocolos de tratamento com o Flu-IL22 de modo que possamos correlacionar o pico de produção da citocina IL-22 com momentos cruciais de pior prognóstico das infecções por influenza e *S. pneumoniae*, para assim analisar o seu papel imunomodulador durante essas infecções. Por fim, após essas adaptações e padronizações, poderemos seguir para análises aprofundadas dos mecanismos imunomodulatórios realizados pelo vírus recombinante Flu-IL22 no que tange a atração de neutrófilos para o sítio de infecção, mediadores e células imunológicas envolvidos nessa imunomodulação.

8. REFERÊNCIAS

- ABOOD, R. N. *et al.* **IL-22 Binding Protein Exacerbates Influenza, Bacterial Superinfection.** *Mucosal Immunol*, v. 12, n. 5, p. 1231-1243, 2019.
- AMORIM, M. J. *et al.* **A Rab11- and Microtubule-Dependent Mechanism for Cytoplasmic Transport of Influenza A Virus Viral RNA.** *Journal of Virology*, v. 85, n. 9, p. 4143–4156, 2011.
- AMULIC, B. *et al.* **Neutrophil Function: From Mechanisms to Disease.** *Annual Review of Immunology*, v. 30, n. 1, p. 459–489, 2012.
- ANDOH, A. *et al.* **Interleukin-22, a member of the IL-10 subfamily, induces inflammatory responses in colonic subepithelial myofibroblasts.** *Gastroenterology*, v. 129, n. 3, p. 969–984, 2005.
- AUJLA SJ, *et al.* **IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia.** *Nat Med*, v. 14, n. 3, p. 275–281, 2008.
- BAKALETZ, L. O. **Viral–bacterial co-infections in the respiratory tract.** *Current Opinion in Microbiology*, v. 35, p. 30–35, 2017.
- BARBOSA, R. P. A. *et al.* **Protective immunity and safety of a genetically modified influenza virus vaccine.** *PloS One*, v. 9, n. 6, p. e98685, 2014.
- BARTHELEMY, A. *et al.* **Interleukin-22 immunotherapy during severe influenza enhances lung tissue integrity and reduces secondary bacterial systemic invasion.** *Infection and Immunity*, v. 86, n. 7, p. 1–17, 2018.
- BLEICHER, L. *et al.* **Crystal structure of the IL-22/IL-22R1 complex and its implications for the IL-22 signaling mechanism.** *FEBS Letters*, v. 582, n. 20, p. 2985–2992, 2008.
- BOGAERT, D.; DE GROOT, R.; HERMANS, P. ***Streptococcus pneumoniae* colonisation: the key to pneumococcal disease.** *The Lancet Infectious Diseases*, v. 4, n. 3, p. 144–154, 2004.
- BOUVIER, Nicole; PALESE, Peter. **The biology of influenza viruses.** *Vaccine*, v. 26, n. 4, p. 49–53, 2008.
- BRASIL. **Protocolo de Tratamento de Influenza.** Ministério Da Saúde, 2017.
- BRIDY-PAPPAS, A. E. *et al.* ***Streptococcus pneumoniae*: Description of the Pathogen, Disease Epidemiology, Treatment, and Prevention.** *Pharmacotherapy*, v. 25, n. 9, p. 1193–1212, 2005.
- BROOKS, L. R. K.; MIAS, G. I. ***Streptococcus pneumoniae*'s Virulence and Host Immunity: Aging, Diagnostics, and Prevention.** *Frontiers in Immunology*, v. 9, 2018.

DE GOEDE, A. L. *et al.* **Characterization of recombinant influenza A virus as a vector for HIV-1 p17Gag.** *Vaccine*, v. 27, n. 42, p. 5735–5739, 2009.

DOU, D. *et al.* **Influenza A Virus Cell Entry, Replication, Virion Assembly and Movement.** *Frontiers in Immunology*, v. 9, 2018.

DUDAKOV, JA; HANASH, AM; VAN DEN BRINK, MR. **Interleukin-22: immunobiology and pathology.** *Annu Rev Immunol*, v. 33, 2015.

DUFFY, S; SHACKELTON, LA; HOLMES, EC. **Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants.** *Nat Rev Genet*, v. 9, n. 4, p. 267-76, 2008.

EISFELD, A. J.; NEUMANN, G.; KAWAOKA, Y. **At the centre: influenza A virus ribonucleoproteins.** *Nature Reviews Microbiology*, v. 13, n. 1, p. 28–41, 2014.

FODOR, E. **The RNA polymerase of influenza A virus: mechanisms of viral transcription and replication.** *Acta virologica*, v. 57, n. 02, p. 113–122, 2013.

FUJII, Y. *et al.* **Selective incorporation of influenza virus RNA segments into virions.** *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 100, n. 4, p. 2002–2007, 2003.

GAITONDE, D. Y.; MOORE, F. C.; MORGAN, M. K. **Influenza: Diagnosis and Treatment.** *American Family Physician*, v. 100, n. 12, p. 751–758, 2019.

GENO, K. A. *et al.* **Pneumococcal Capsules and Their Types: Past, Present, and Future.** *Clinical Microbiology Reviews*, v. 28, n. 3, p. 871–899, 2015.

GIESE, S.; BOLTE, H.; SCHWEMMLE, M. **The Feat of Packaging Eight Unique Genome Segments.** *Viruses*, v. 8, n. 6, p. 165, 2016.

GIRARD, MP. *et al.* **The 2009 A (H1N1) influenza virus pandemic: A review.** *Vaccine*, v. 28, n. 31, p. 4895–4902, 2010.

GODINEZ, I. *et al.* **Interleukin-23 Orchestrates Mucosal Responses to Salmonella enterica Serotype Typhimurium in the Intestine.** *Infection and Immunity*, v. 77, n. 1, p. 387–398, 2009.

GOULART, C. *et al.* **Early pneumococcal clearance in mice induced by systemic immunization with recombinant BCG PspA-PdT prime and protein boost correlates with cellular and humoral immune response in bronchoalveolar fluids (BALF).** *Vaccine: X*, v. 4, p. 100049, 2020.

GROHSKOPF, L. A. *et al.* **Prevention and Control of Seasonal Influenza with Vaccines: Recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices — United States, 2019–20 Influenza Season.** *MMWR. Recommendations and Reports*, v. 68, n. 3, p. 1–21, 2019.

HALE, B. G. *et al.* **The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses.** *J Gen Virol*, v. 89, n. 10, p. 2359-76, 2008.

HAN, C. W.; JEONG, M. S.; JANG, S. B. **Structure and Function of the Influenza A Virus Non-Structural Protein 1.** *Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 29, n. 8, p. 1184–1192, 2019.

HAN, L. *et al.* **A Novel Bifunctional Fusion Protein, Vunakizumab-IL22, for Protection Against Pulmonary Immune Injury Caused by Influenza Virus.** *Frontiers in Immunology*, v. 12, 2021.

HOFFMANN, E. *et al.* **“Ambisense” Approach for the Generation of Influenza A Virus: vRNA and mRNA Synthesis from One Template.** *Virology*, v. 267, n. 2, p. 310–317, 2000.

HONIGSBAUM, M. **Revisiting the 1957 and 1968 influenza pandemics.** *The Lancet*, v. 0, n. 0, 2020.

HUANG, Q. *et al.* **Early steps of the conformational change of influenza virus hemagglutinin to a fusion active state: stability and energetics of the hemagglutinin.** *Biochimica Et Biophysica Acta*, v. 1614, n. 1, p. 3–13, 2003.

IVANOV, S. *et al.* **Interleukin-22 reduces lung inflammation during influenza A virus infection and protects against secondary bacterial infection.** *J Virol*, v. 87, p. 6911–6924, 2013.

KUIKEN, T. *et al.* **Pathogenesis of influenza virus infections: The good, the bad and the ugly.** *Current Opinion in Virology*, v. 2, n. 3, p. 276–286, 2012.

KUMAR, P. *et al.* **IL-22 from conventional NK cells is epithelial regenerative and inflammation protective during influenza infection.** *Mucosal Immunology*, v. 6, n. 1, p. 69–82, 2012.

LAMPEJO, T. **Influenza and antiviral resistance: an overview.** *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, v. 39, n. 7, p. 1201–1208, 2020.

LEJEUNE, D. *et al.* **Interleukin-22 (IL-22) Activates the JAK/STAT, ERK, JNK, and p38 MAP Kinase Pathways in a Rat Hepatoma Cell Line.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 277, n. 37, p. 33676–33682, 2002.

LI, J.; ARÉVALO, M. T.; ZENG, M. **Engineering influenza viral vectors.** *Bioengineered*, v. 4, n. 1, p. 9–14, 2013.

LI, X. *et al.* **Packaging signal of influenza A virus.** *Virology Journal*, v. 18, n. 1, 2021.

LI, Z. *et al.* **Development and application of reverse genetic technology for the influenza virus.** *Virus Genes*, v. 57, n. 2, p. 151–163, 2021.

LIANG, S. C. *et al.* **Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides.** *The Journal of Experimental Medicine*, v. 203, n. 10, p. 2271–2279, 2006.

LIU, R. *et al.* **Influenza D virus**. *Current Opinion in Virology*, v. 44, p. 154–161, 2020.

LODOEN, M. B.; LANIER, L. L. **Natural killer cells as an initial defense against pathogens**. *Current Opinion in Immunology*, v. 18, n. 4, p. 391–398, 2006.

MACHADO, A. *et al.* **Recombinant influenza A viruses harboring optimized dicistronic NA segment with an extended native 5' terminal sequence: Induction of heterospecific B and T cell responses in mice**. *Virology*, v. 345, n. 1, p. 73–87, 2006.

MACHADO, A. V. *et al.* **Expression of a foreign gene by stable recombinant influenza viruses harboring a dicistronic genomic segment with an internal promoter**. *Virology*, v. 313, n. 1, p. 235–249, 2003.

MARTINA, B. E. E. *et al.* **A Recombinant Influenza A Virus Expressing Domain III of West Nile Virus Induces Protective Immune Responses against Influenza and West Nile Virus**. *PLoS ONE*, v. 6, n. 4, p. e18995, 2011.

MCHARDY, A. C., E ADAMS, B. **The role of genomics in tracking the evolution of influenza A virus**. *PLoS pathogens*, v. 5, n. 10, 2009.

MEDINA, R. A., E GARCÍA-SASTRE, A. **Influenza A viruses: new research developments**. *Nature reviews. Microbiology*, v. 9, n. 8, p. 590–603, 2011.

MESSIAS, S.G.S. **vírus influenza recombinante carreando o gene da interleucina 7 murina como ferramenta para estudos de imunomodulação e desenvolvimento de novas estratégias vacinais**. 2019. Tese (Doutorado) – Pós-graduação em ciências da saúde, IRR, 2019.

NAVARINI, A. A. *et al.* **Increased susceptibility to bacterial superinfection as a consequence of innate antiviral responses**. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 103, n. 42, p. 15535–15539, 2006.

NEUMANN, G.; KAWAOKA, Y. **Generation of influenza A virus from cloned cDNAs ? historical perspective and outlook for the new millenium**. *Reviews in Medical Virology*, v. 12, n. 1, p. 13–30, 2002.

NYPAVER, C.; DEHLINGER, C.; CARTER, C. **Influenza and Influenza Vaccine: A Review**. *Journal of Midwifery & Women's Health*, v. 66, n. 1, p. 45–53, 2021.

OUYANG, W.; O'GARRA, A. **IL-10 Family Cytokines IL-10 and IL-22: from Basic Science to Clinical Translation**. *Immunity*, v. 50, n. 4, p. 871–891, 2019.

PAGET, C. *et al.* **Interleukin-22 Is Produced by Invariant Natural Killer T Lymphocytes during Influenza A Virus Infection**. *Journal of Biological Chemistry*, v. 287, n. 12, p. 8816–8829, 2012.

PAGET, Christophe; TROTTEIN, Francois. **Mechanisms of Bacterial Superinfection Post influenza: A Role for Unconventional T Cells.** *Frontiers in immunology*, v. 10, p. 336, 2019.

PENG, Y. *et al.* **Interleukin-22 Promotes T Helper 1 (Th1)/Th17 Immunity in Chlamydial Lung Infection.** *Molecular Medicine*, v. 20, n. 1, p. 109–119, 2014.

PFLUG, A. *et al.* **Structural insights into RNA synthesis by the influenza virus transcription-replication machine.** *Virus Research*, v. 234, p. 103–117, abr. 2017.

PICKERT, G. *et al.* **STAT3 links IL-22 signaling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing.** *The Journal of Experimental Medicine*, v. 206, n. 7, p. 1465–1472, 2009.

PINTO, L. H.; LAMB, R. A. **The M2 Proton Channels of Influenza A and B Viruses.** *Journal of Biological Chemistry*, v. 281, n. 14, p. 8997–9000, 2005.

POCIASK, D. A. *et al.* **IL-22 is essential for lung epithelial repair following influenza infection.** *The American Journal of Pathology*, v. 182, n. 4, p. 1286–1296, 2013.

REPERANT, Leslie; RIMMELZWAAN, Guus; OSTERHAUS, Albert. **Advances in influenza vaccination.** *F1000Prime Reports*, v. 6, n. June, p. 2–9, 2014.

ROCHA, C. D. *et al.* **Recombinant viruses as tools to induce protective cellular immunity against infectious diseases.** *International Microbiology: The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology*, v. 7, n. 2, p. 83–94, 2004.

RYNDA-APPLE, A.; ROBINSON, K. M.; ALCORN, J. F. **Influenza and Bacterial Superinfection: Illuminating the Immunologic Mechanisms of Disease.** *Infection and Immunity*, v. 83, n. 10, p. 3764–3770, 2015.

SABIHI, M. *et al.* **Microbiota-Dependent Effects of IL-22.** *Cells*, v. 9, n. 10, p. 2205, 2020.

SAMJI, T. **Influenza A: Understanding the Viral Life Cycle.** *The Yale Journal of Biology and Medicine*, v. 82, n. 4, p. 153–159, 2009.

SCHULZ, S. M. *et al.* **Protective Immunity to Systemic Infection with Attenuated *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in the Absence of IL-12 Is Associated with IL-23-Dependent IL-22, but Not IL-17.** *The Journal of Immunology*, v. 181, n. 11, p. 7891–7901, 2008.

SEKIKAWA, A. *et al.* **Involvement of the IL-22/REG α axis in ulcerative colitis.** *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, v. 90, n. 3, p. 496–505, 2010.

SHABGAH, AG. *et al.* **Interleukin-22 in human inflammatory diseases and viral infections.** *Autoimmun Ver*, v. 16, n. 12, p. 1209–1218, 2017.

SHINDE, V. *et al.* **Triple-reassortant swine influenza A (H1) in humans in the United States, 2005-2009.** *N Engl J Med*, v. 360, n. 25, p. 2616–2625, 2009.

SHINYA, K. *et al.* **Characterization of a Neuraminidase-Deficient Influenza A Virus as a Potential Gene Delivery Vector and a Live Vaccine.** *Journal of Virology*, v. 78, n. 6, p. 3083–3088, 2004.

SHORT, K. R. *et al.* **Interactions between *Streptococcus pneumoniae* and influenza virus: a mutually beneficial relationship?.** *Future Microbiology*, v. 7, n. 5, p. 609–624, 2012.

SHORT, Kirsty R. *et al.* **Pathogenesis of influenza-induced acute respiratory distress syndrome.** *The Lancet Infectious Diseases*, v. 14, n. 1, p. 57–69, 2014.

SKEHEL, J. J.; WILEY, D. C. **Receptor Binding and Membrane Fusion in Virus Entry: The Influenza Hemagglutinin.** *Annual Review of Biochemistry*, v. 69, n. 1, p. 531–569, 2000.

SMITH, GJ. *et al.* **Origins and evolutionary genomics of the swine-origin H1N1 influenza A epidemic.** *Nature*, v. 459, n. 7250, p. 1122–1125, 2009

SOEMA, Peter C. *et al.* **Current and next generation influenza vaccines: Formulation and production strategies.** *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 94, p. 251–263, 2015.

STANDISH, A. J.; WEISER, J. N. **Human Neutrophils Kill *Streptococcus pneumoniae* via Serine Proteases.** *The Journal of Immunology*, v. 183, n. 4, p. 2602–2609, 20 jul. 2009.

SUH, J.-S. *et al.* **A Polymorphism of *Interleukin-22 Receptor Alpha-1* Is Associated with the Development of Childhood IgA Nephropathy.** *Journal of Interferon & Cytokine Research*, v. 33, n. 10, p. 571–577, 2013.

SULLIVAN, S. J. *et al.* **2009 H1N1 Influenza.** *Mayo Clinic Proceedings*, v. 85, n. 1, p. 64–76, 2010.

SUN, K.; METZGER, D. W. **Inhibition of pulmonary antibacterial defense by interferon- γ during recovery from influenza infection.** *Nature Medicine*, v. 14, n. 5, p. 558–564, 27 abr. 2008.

TECCHIO, C.; MICHELETTI, A.; CASSATELLA, M. A. **Neutrophil-Derived Cytokines: Facts Beyond Expression.** *Frontiers in Immunology*, v. 5, 2014.

TREGONING, J. S.; RUSSELL, R. F.; KINNEAR, E. **Adjuvanted influenza vaccines.** *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, v. 14, n. 3, p. 550–564, 2018.

UYEKI, T. M. *et al.* **Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America: 2018 Update on Diagnosis, Treatment, Chemoprophylaxis, and Institutional Outbreak Management of Seasonal Influenza.** *Clinical Infectious Diseases*, v. 68, n. 6, 2018.

Viral Titering-TCID50 Assay Protocol - Creative Biogene. Disponível em: <<https://www.creative-biogene.com/support/Viral-Titering-TCID50-Assay-Protocol.html>>.

WEBER, G. F. *et al.* **Inhibition of Interleukin-22 Attenuates Bacterial Load and Organ Failure during Acute Polymicrobial Sepsis.** *Infection and Immunity*, v. 75, n. 4, p. 1690–1697, 2007.

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

WEISER, J. N.; FERREIRA, D. M.; PATON, J. C. ***Streptococcus pneumoniae*: transmission, colonization and invasion.** *Nature Reviews Microbiology*, v. 16, n. 6, p. 355–367, 2018.

WHITNEY, C. G. *et al.* **Decline in Invasive Pneumococcal Disease after the Introduction of Protein–Polysaccharide Conjugate Vaccine.** *New England Journal of Medicine*, v. 348, n. 18, p. 1737–1746, 2003.

WOLK, K. *et al.* **IL-22 Increases the Innate Immunity of Tissues.** *Immunity*, v. 21, n. 2, p. 241–254, 2004.

XU, X. *et al.* **Conventional NK Cells Can Produce IL-22 and Promote Host Defense in *Klebsiella pneumoniae* Pneumonia.** *The Journal of Immunology*, v. 192, n. 4, p. 1778–1786, 2014.

YANG, Yufang *et al.* **A novel method to incorporate bioactive cytokines as adjuvants on the surface of virus particles.** *Journal of Interferon & Cytokine Research: the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research*, v. 29, n. 1, p. 9–22, 2009.

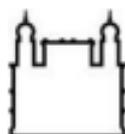
ZENEWICZ, L. A. *et al.* **IL-22 Deficiency Alters Colonic Microbiota To Be Transmissible and Colitogenic.** *The Journal of Immunology*, v. 190, n. 10, p. 5306–5312, 2013.

ZENEWICZ, L. A. *et al.* **Innate and Adaptive Interleukin-22 Protects Mice from Inflammatory Bowel Disease.** *Immunity*, v. 29, n. 6, p. 947–957, 2008.

ZHANG, F. *et al.* **Interleukin-22 Suppresses the Growth of A498 Renal Cell Carcinoma Cells via Regulation of STAT1 Pathway.** *PLoS ONE*, v. 6, n. 5, p. e20382, 2011.

ZHENG, Y. *et al.* **Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens.** *Nature Medicine*, v. 14, n. 3, p. 282–289, 2008.

ANEXO A - Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Vice-Presidência de Pesquisa e Coleções
Biológicas - VPPCB



Comissão de Ética
no Uso de Animais

LICENÇA

LW-8/21

Certificamos que o protocolo (P-29/20.2), intitulado "**Utilização de vírus influenza recombinantes carreando os genes das citocinas IL-22 e IL-17A como ferramentas para avaliar seu papel imunomodulador durante a infecção pelo vírus influenza A e infecção secundária pelo *Streptococcus pneumoniae***", sob a responsabilidade de **ALEXANDRE DE MAGALHAES VIEIRA MACHADO**, atende ao disposto na Lei 11794/08, que dispõe sobre o uso científico no uso de animais, inclusive, aos princípios da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL). A referida licença não exime a observância das Leis e demais exigências legais na vasta legislação nacional.

Esta licença tem validade até 22/02/2025 e inclui o uso total de:

Mus musculus

- 1104 machos de C57BL/6, idade: 8 semanas.

Rio de Janeiro, 22 de fevereiro de 2021.

Octavio Augusto França Presgrave
Coordenador da CEUA/Fiocruz