

Ministério da Saúde

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

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

*THAYSSA KEREN SANTOS DA SILVA*

Imunomodulação e imunossupressão na infecção experimental murina por influenza: resposta inflamatória e resistência ao antiviral oseltamivir (Tamiflu®).

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

**Orientadora:** Dra. Cristiana Couto Garcia

**RIO DE JANEIRO**

2020

Santos da Silva, Thayssa Keren.

Imunomodulação e imunossupressão na infecção experimental murina por influenza: resposta inflamatória e resistência ao antiviral oseltamivir (Tamiflu®). / Thayssa Keren Santos da Silva, Cristiana Couto Garcia - Rio de Janeiro, 2020.

86 f.; il.

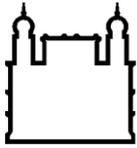
Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2020.

Orientadora: Cristiana Couto Garcia.

Bibliografia: f. 77-86

1. Thayssa Keren Santos da Silva. I. Garcia, Cristiana Couto. II. Título.

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



Ministério da Saúde

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

## **INSTITUTO OSWALDO CRUZ**

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

***AUTOR: Thayssa Keren Santos da Silva***

**IMUNOMODULAÇÃO E IMUNOSSUPRESSÃO NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL MURINA POR INFLUENZA: RESPOSTA INFLAMATÓRIA E RESISTÊNCIA AO ANTIVIRAL OSELTAMIVIR (TAMIFLU®).**

**ORIENTADORA: Prof. Dr<sup>a</sup>. Cristiana Couto Garcia**

**Aprovada em: 27/04/2020**

**EXAMINADORES:**

**Prof. Dr.** Thiago Moreno Lopes Souza – Presidente- Instituto Oswaldo Cruz-RJ

**Prof. Dr<sup>a</sup>.** Adriana Ribeiro Silva- Instituto Oswaldo Cruz-RJ

**Prof. Dr<sup>a</sup>.** Luzia Maria de Oliveira Pinto- Instituto Oswaldo Cruz-RJ

**Prof. Dr<sup>a</sup>.** Carmen Penido Monteiro- Instituto Oswaldo Cruz-RJ

**Prof. Dr<sup>a</sup>.** Patrícia Machado Rodrigues e Silva Martins- Instituto Oswaldo Cruz-RJ

A Deus, onde estão ocultos todos os tesouros da sabedoria e do conhecimento, dedico este trabalho. “O princípio da sabedoria é: adquira a sabedoria; sim, com tudo o que você possui, adquira o entendimento. Valoriza a sabedoria e ela o exaltará; abraçando-a tu, ela te honrará”. Provérbios 4.7

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente quero agradecer a Deus pela oportunidade de concluir mais uma etapa em minha vida profissional, pelo caminho que percorri até aqui, que me permitiu ser uma bióloga com um olhar mais apurado para ciência.

Agradeço ao Instituto Oswaldo Cruz pelo espaço, educação e instrução de qualidade proporcionados a mim através de professores e pesquisadores nesses anos que estive aqui. Desde minha iniciação científica iniciada em 2014, pude passar por alguns laboratórios e aprender diferentes técnicas, conceitos e me relacionar com pessoas incríveis. À Fiocruz, devo minha gratidão e posso dizer com muita responsabilidade e alegria que fiz parte do corpo discente desta instituição de pesquisa renomado do nosso país;

Ao laboratório de Vírus Respiratórios e Sarampo, me orgulho em dizer que pertencço a este time, laboratório que sempre recebe muitos desafios, mas que sempre responde com êxito em prol da saúde da população. À chefe responsável, Dr<sup>a</sup>. Marilda Siqueira e ao chefe substituto Dr. Fernando Motta, meus agradecimentos por permitir que jovens iniciantes na carreira, como eu, pudessem ter a oportunidade de fazer ciência em um laboratório de referência Nacional;

À minha orientadora Dr<sup>a</sup>. Cristiana Couto, minha eterna gratidão, por toda paciência, companheirismo científico e ensinamentos que levarei por onde eu for. Este tempo como aluna foi de grande valia para minha vida profissional e me sinto muito honrada por poder ter tido a oportunidade de ser aluna dessa pesquisadora engajada com a ciência. Obrigada por confiar e acreditar na minha capacidade de desenvolver um projeto;

Aos meus companheiros do laboratório, Jessica, Thiago, Artur, Gabrielle, Carlos, Thauane, Aline, Milene, Aline, Braulia, Xênia, Maria, Suelen, Jonathan, Jalusy, Raquel, Renan e Priscila, que são alunos, pesquisadores, técnicos, bolsistas, muito obrigada pelas inúmeras ajudas, pelo companheirismo nas horas boas e difíceis, por me tratar com tanto carinho, sempre dando apoio para continuar seguindo confiante e persistente.

Quero agradecer aos colaboradores do projeto, Laboratório de Inflamação e sua equipe, em especial Dr. Marco Aurélio Martins, Tatiana Paula Ferreira, Maximiliano Ferrero, Amanda Cotias, Joyce Lima, Carolina Azevedo, Ana Carolina Arantes, Ana Lúcia Pires, Daniella Insuela, Patrícia Martins. Muito obrigada por toda ajuda no desenvolvimento do

projeto, pelas dicas, pelas análises e por cada material cedido, a vocês minha gratidão por não medir esforços para fortalecer a nossa pesquisa;

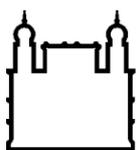
Às agências de fomento, FAPERJ, CAPES e ao IOC, agradeço em nome de todos participantes do estudo, pelo apoio financeiro de extrema importância para continuidade do desenvolver do projeto e a bolsa proporcionada a mim durante o período como aluna do Instituto. À pós-graduação, Biologia Celular e Molecular, aos membros da banca, revisor e suplentes, muito obrigada pela disponibilidade para o enriquecimento do nosso estudo e apoio. Agradeço à banca e à revisora pela disponibilidade e pelas contribuições que tenho certeza que serão muito importantes.

Devo tudo que sou a minha família e por isso gostaria de oferecer este trabalho a eles. Obrigada minha mãe Tania, por todo amor que dedicou em me criar, por não considerar os obstáculos para me ver feliz e realizada, pelo apoio em todas as horas. Aos meus irmãos Jonathan e Tamires pelo companheirismo e cuidado durante toda minha vida, por se dedicarem cada um da sua maneira a me proporcionar uma vida melhor. Ao meu pai pelo amor e carinho que sempre me tratou, este trabalho dedico a vocês;

Quero agradecer ao meu noivo e futuro esposo Thierry De Lucas, que me incentiva sempre enxergar além, por alavancar meus sonhos e junto comigo fazer acontecer. Com ele sei que a vida será muito mais prazerosa. Por todo apoio e amor, quero dedicar este trabalho a você.

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

Rio de Janeiro, 27 de Abril de 2020



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

**Imunomodulação e imunossupressão na infecção experimental murina por influenza: resposta inflamatória e resistência ao antiviral oseltamivir (Tamiflu®).**

### RESUMO

**Introdução:** Influenza é uma das principais causas de morbimortalidade mundial, afetando milhões de pessoas. Casos graves são tratados com inibidores da neuraminidase (NA), como o oseltamivir (Tamiflu®). No entanto, a alta variação genética pode levar ao surgimento de cepas resistentes a antivirais, limitando o tratamento. Vírus resistentes podem surgir espontaneamente, por uso inadequado de antivirais, ou pela disseminação viral prolongada.

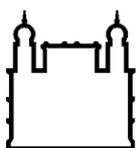
**Objetivo:** Investigar o potencial efeito de drogas imunomoduladoras e imunossupressoras, em combinação com o antiviral Tamiflu®, sobre a resposta inflamatória e a seleção de vírus mutantes resistentes a antivirais, em um modelo murino de infecção por Influenza A.

**Metodologia:** Camundongos C57/BL6 foram infectados com 1000 ou 500 *plaque-forming units* (PFU) do vírus influenza A/PR/8/34 H1N1, sendo tratados com Tamiflu® nas doses de 0,1 - 10mg/kg, ou veículo. Foram monitorados quanto à perda de peso corporal e letalidade por 21 dias. Análises de parâmetros inflamatórios, incluindo infiltrado leucocitário e produção de citocinas no lavado broncoalveolar (BAL) e infiltrado neutrofílico tecidual, bem como isolamento viral, titulação e teste de resistência ao Tamiflu® foram realizadas 7 e 10 dias pós-infecção. Foi utilizado tratamento com o imunomodulador PCA4248, um antagonista do receptor do fator de ativação plaquetária (PAFR), e com imunossupressores, o corticóide dexametasona (DEXA) e o quimioterápico ciclofosfamida (CICLO), em combinação ou não com Tamiflu®.

**Resultados:** O tratamento com Tamiflu®, na dose de 10mg/kg, reduziu a letalidade, a perda de peso e os títulos virais, além de infiltrado leucocitário e níveis de IFN- $\gamma$  no BAL e o recrutamento neutrofílico tecidual. A dose menor, de 1mg/kg, reduziu parcialmente letalidade, bem como infiltrado leucocitário e produção de citocinas, porém não interferiu com a susceptibilidade ao antiviral. O tratamento com PCA4248 não reduziu a susceptibilidade ao Tamiflu®, porém aumentou de 22% para 50% a taxa de sobrevivência dos animais infectados em relação ao grupo veículo. Quando administrada terapêuticamente em combinação com o Tamiflu®, a DEXA reduzindo a letalidade, a perda de peso e o infiltrado leucocitário, sem causar linfopenia estatística. Os vírus isolados de todos os grupos experimentais, nos dias 7 ou 10 pós-infecção, mostraram sensibilidade inalterada ao Tamiflu®. Já o tratamento com a combinação de DEXA e CICLO produziu marcada imunossupressão, com persistência viral sendo detectada até o dia 10 pós-infecção, sem alteração da susceptibilidade ao antiviral. A redução do inóculo (500 PFU) permitiu análises em tempos mais tardios, 14 e 21 dias pós-infecção. Muito embora tenha sido observado quadro acentuado de imunossupressão, não foi verificada alteração no fenótipo de sensibilidade ao Tamiflu®.

**Conclusão:** Protocolos farmacológicos imunomoduladores (PCA 4248 e DEXA) ou imunossupressores (DEXA + CICLO) usados durante a infecção experimental pelo vírus influenza A PR/8/34 H1N1 alteram o perfil inflamatório durante a infecção, mas não modificam o perfil de susceptibilidade do vírus influenza H1N1 ao antiviral oseltamivir.

Rio de Janeiro, 27 de Abril de 2020



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO OSWALDO CRUZ

**Immunomodulation and immunosuppression in experimental influenza murine infection: inflammatory response and resistance to antiviral oseltamivir (Tamiflu®).**

### ABSTRACT

**Introduction:** Influenza is a major cause of worldwide morbidity and mortality, affecting millions of people. Severe cases are treated with neuraminidase (NA) inhibitors, such as oseltamivir (Tamiflu®). However, the high genetic variation can lead to the emergence of strains resistant to antivirals, limiting treatment. Resistant viruses can emerge spontaneously through inappropriate use of antivirals, or by prolonged viral shedding. **Objective:** To investigate the potential effect of immunomodulatory and immunosuppressive drugs, in combination with the antiviral Tamiflu®, on the inflammatory response and selection of mutant viruses resistant to antivirals, in a murine model of Influenza A infection. **Methodology:** C57 / BL6 mice were infected with 1000 or 500 plaque-forming units (PFU) of the influenza A / PR / 8/34 H1N1 virus, treated with Tamiflu® at doses of 0.1 - 10mg / kg, or vehicle. They were monitored for body weight loss and lethality for 21 days. Analyses of inflammatory parameters, including leukocyte infiltrate and cytokine production in the bronchoalveolar lavage (BAL) and tissue neutrophilic infiltrate, as well as viral isolation, titration and resistance test to Tamiflu® were performed 7 and 10 days post-infection. Treatment with the immunomodulator PCA4248, an antagonist of the platelet activating factor receptor (PAFR), and with immunosuppressants, the corticoid dexamethasone (DEXA) and the chemotherapeutic cyclophosphamide (CYCLE), in combination or not with Tamiflu®, were used. **Results:** Treatment with Tamiflu®, at a dose of 10mg / kg, reduced lethality, weight loss and viral titers, in addition to leukocyte infiltrate and levels of IFN- $\gamma$  in BAL and tissue neutrophil recruitment. The lower dose, 1mg / kg, partially reduced lethality, as well as leukocyte infiltrate and cytokine production, but did not interfere with antiviral susceptibility. The treatment with PCA4248 did not reduce the susceptibility to Tamiflu®, but decreased the lethality rate of infected animals from 50% to 22% in relation to the vehicle group. When administered therapeutically in combination with Tamiflu®, DEXA reduces lethality, weight loss and leukocyte infiltrate, without causing statistical lymphopenia. Viruses isolated from all experimental groups, on days 7 or 10 post-infection, showed unchanged sensitivity to Tamiflu®. Treatment with the combination of DEXA and CYCLE, on the other hand, produced marked immunosuppression, viral consistency being detected until day 10 post-infection, without altering the susceptibility to antiviral. The reduction of the inoculum (500 PFU) allowed analyses at later times, 14 and 21 days after infection. Although a marked immunosuppression was observed, there was no change in the sensitivity phenotype to Tamiflu®. **Conclusion:** Immunomodulatory (PCA 4248 and DEXA) or immunosuppressive (DEXA + CYCLE) pharmacological protocols used during experimental influenza A infection PR / 8/34 H1N1 alter the inflammatory profile during infection, but do not modify the susceptibility profile of the influenza virus H1N1 to the antiviral oseltamivir.

# SUMÁRIO

<b>1.INTRODUÇÃO.....</b>	<b>15</b>
1.1 O VÍRUS INFLUENZA .....	15
1.2 CICLO REPLICATIVO DO VÍRUS INFLUENZA .....	17
1.3 EPIDEMIOLOGIA.....	19
1.4 HISTÓRICO.....	20
1.5. RESPOSTA IMUNOLÓGICA AO VÍRUS INFLUENZA .....	20
1.5.1. IMUNOPATOLOGIA.....	24
1.6 PREVENÇÃO .....	24
1.7 ANTIVIRAIS E RESISTÊNCIA .....	25
1.8 TRATAMENTOS IMUNOSSUPRESSORES E IMUNOMODULADORES.....	30
<b>2.OBJETIVOS .....</b>	<b>33</b>
2.1. OBJETIVO GERAL .....	33
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	33
<b>3.MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>34</b>
3.1. ANIMAIS E MODELO DE INFECÇÃO VIRAL .....	34
3.1.1 VÍRUS INFLUENZA A/PR/8/34 H1N1.....	34
3.2. TRATAMENTOS.....	34
3.2.1 TRATAMENTO COM TAMIFLU .....	34
3.2.2. TRATAMENTO COM DEXAMETASONA (DEXA) E CICLOFOSFAMIDA (CICLO).....	35
3.2.3. TRATAMENTO COM PCA4248 .....	35
3.3. AVALIAÇÃO DA LETALIDADE E PERDA DE PESO.....	36
3.4. OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE .....	36
3.5. ANÁLISE HISTOLÓGICA .....	37
3.6. CONTAGEM DE LEUCÓCITOS.....	37
3.7. DOSAGEM DE PROTEÍNAS TOTAIS NO BAL .....	37
3.8. ENSAIO DE MPO.....	38
3.9. ELISA .....	38
3.10. TITULAÇÃO DE VÍRUS.....	38
3.11. ISOLAMENTO VIRAL.....	40
3.12. QUANTIFICAÇÃO VIRAL POR ELISA.....	40
3.13. ENSAIO DE HEMAGLUTINAÇÃO .....	41
3.14. ENSAIO DE ATIVIDADE DE NEURAMINIDASE .....	41
3.15. ENSAIO DE INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DA NEURAMINIDASE.....	42
3.16. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	42
<b>4.RESULTADOS .....</b>	<b>43</b>
4.1. Dose-resposta de Tamiflu durante a infecção por Influenza A/PR/8/34.....	43
4.2. Análise dos efeitos da imunomodulação por PCA, no surgimento de vírus resistentes	46
4.3. Efeito do tratamento imunossupressor por DEXA durante 7 e 10 dias de infecção por Influenza A/PR/8/34.....	50

4.4. Imunossupressão por Dexametasona e Ciclofosfamida e seus efeitos quanto à persistência viral durante 7 e 10 dias de infecção .....	58
4.5. Efeito do tratamento imunossupressor dexametasona e Ciclofosfamida em combinação com o antiviral Tamiflu, durante a infecção por influenza A/PR/8/38, sobre o surgimento de vírus resistente .....	61
4.6. Protocolo Imunossupressor com menor inoculo viral leva a persistência viral prolongada. ....	65
<b>5.DIUSSÃO .....</b>	<b>71</b>
<b>6.CONCLUSÕES.....</b>	<b>76</b>
<b>7.PERSPECTIVAS .....</b>	<b>77</b>
<b>8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>77</b>

## LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

<b>BAL-</b> <i>Bronchoalveolar Lavage</i> - Lavado Broncoalveolar	<b>HEPES-</b> <i>N-(2-Hydroxyethyl) piperazine-N'-(2-ethane sulfonic acid)</i>
<b>BSA-</b> <i>Bovine Serum Albumin</i> - Soro Fetal Bovino	<b>HTAB-</b> <i>Hexa decyl trimetil ammonium bromide.</i>
<b>CD-</b> <i>Cluster of Differentiation</i> - Agrupamento de Diferenciação	<b>IC50-</b> <i>50% Inhibitory Concentration</i> - Concentração Inibitória
<b>CDC-</b> <i>Center for Disease Control and Prevention</i> -Centro de controle e Prevenção de doenças	<b>IFN-</b> Interferon
<b>CICLO-</b> Ciclofosfamida	<b>IL-</b> <i>Interleucina</i>
<b>COX-</b> Cicloxigenase	<b>ILC-</b> <i>Innate Lymphoid Cells</i> - Células Linfóides Inatas
<b>CTL-</b> Linfócito T citotóxico	<b>IRF-</b> <i>IFN regulator factor</i> - Fator regulador de IFNM1
<b>DC-</b> <i>Dendritic Cell</i> - célula Dendrítica	<b>M-</b> Proteína de Matriz
<b>DEXA-</b> Dexametasona	<b>MDCK-</b> <i>Madin-Darby Canine Kidney Cells</i>
<b>DMEM-</b> <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>	<b>MHC-</b> <i>Major histocompatibility complex</i> - Complexo principal de histocompatibilidade
<b>EDTA-</b> <i>Ethylene Diamine Tetracetic acid</i> - Ácido etileno diamino Tetra-acético	<b>MIP-</b> <i>Macrophage Inflammatory Protein</i>
<b>ELISA-</b> <i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>	<b>MOCK-</b> Grupo controle, não infectado
<b>HA-</b> Hemaglutinina	<b>MPO-</b> Mieloperoxidase
<b>HANKS-</b> Solução de Sais Balanceados de Hank.	<b>mRNA-</b> RNA mensageiro
<b>HEP-</b> Esterase-Hemaglutinina de Fusão	<b>NA-</b> Neuraminidase

- NALP3**-Proteína com os 3 domínios: NACHT (proteína inibidora de apoptose neural), LRR (repetição rica em leucina) e PYD (domínio PIRINA), também conhecida como criopirina codificada pelo gene NLRP3.
- NEP**- *Nuclear exporting protein*- Proteína de exportação nuclear
- NF-kb**- *Nuclear Factor Kappa B*
- NK**- *Natural Killer cell*- Células matadoras naturais
- NOD**- *Non-obese Diabetic*-Diabéticos não obesos
- NS2**- *Non-structural-2*- Proteína não estrutural 2
- PA**- Polimerase Ácida
- PAF**- *Platelet Activating Factor*- Fator de Ativação Plaquetária
- PAFR**- *Platelet Activating Factor Receptor*- Receptor do Fator de Ativação Plaquetária
- PB**- Proteína Básica
- PBS**- *Phosphate-Buffered Saline*
- PCA 4248**- [2-(phenylthio) ethyl-5methoxycarbonyl-2,4,6-trimethyl-1,4-dihydropyridine-3-carboxylate]
- PFU**- *Plaque-Forming Unit*- Unidade Formadora de Placas
- PR8**- Influenza A vírus (A/Puerto Rico/8/1934 (H1N1))
- RIG-I**- *Retinoic acid Inducible Gene- I* Gene I induzido por ácido retinóico
- RLU**- *Relative Luminescence Units*
- RNA**- Ácido Ribonucleoproteico
- RNP**- Complex Ribonucleo proteico
- SCID**- *Severe Combined Immunodeficiency*- Imunodeficiência combinada grave
- Th**- *T cell helper*- célula T auxiliar
- TLR**- *Toll like Receptor*-Receptor do tipo Toll
- TPCK**- *L-(tosylamido-2-phenyl) ethyl chloro methyl ketone*
- WT**- *Wild Type*- Selvagem

## LISTA DE FIGURAS TABELAS

<b>Tabela 2.1:</b> Tabela de Tratamentos.....	<b>36</b>
<b>Figura 1.1:</b> Estrutura do vírus Influenza A, suas proteínas de superfície e seus oito segmentos de RNA.....	<b>17</b>
<b>Figura 1.2:</b> Ciclo Replicativo do Vírus Influenza dependente da maquinaria celular.....	<b>18</b>
<b>Figura 1.3:</b> Resposta Imunológica Inata durante a infecção pelo vírus Influenza.....	<b>22</b>
<b>Figura 1.4:</b> Resposta Imunológica Adaptativa durante a infecção pelo vírus Influenza.....	<b>23</b>
<b>Figura 1.5:</b> Surgimento e perpetuação da mutação H275Y na população de vírus H1N1.. ...	<b>28</b>
<b>Figura 4.6:</b> Esquema do desenho experimental Dose Resposta Tamiflu durante a infecção por Influenza A/PR/8/34 durante 7 e 10 dias infecção. ....	<b>43</b>
<b>Figura 4.7.</b> Efeito de diferentes doses de Tamiflu durante a infecção por Influenza A/PR/8/34 . ....	<b>45</b>
<b>Figura 4.8:</b> Esquema do desenho experimental da imunomodulação por PCA4248 no surgimento de vírus resistente ao Oseltamivir.....	<b>46</b>
<b>Figura 4.9.</b> Efeito do tratamento combinado de PCA4248 e Tamiflu na infecção por influenza. ....	<b>48</b>
<b>Figura 4.10:</b> Esquema do desenho experimental da imunossupressão por Dexametasona durante 7 e 10 dias de infecção por influenza A/PR/34.....	<b>49</b>
<b>Figura 4.11.</b> Efeito do tratamento imunossupressor por Dexametasona durante 7 e 10 dias Influenza A/PR/8/34 .....	<b>50</b>
<b>Figura 4.12.</b> Efeito do tratamento imunossupressor por Dexametasona durante 7 e 10 dias Influenza A/PR/8/34 .....	<b>52</b>
<b>Figura 4.13:</b> Esquema do desenho experimental Imunossupressão por Dexametasona e Ciclofosfamida durante a infecção por Influenza .....	<b>55</b>
<b>Figura 4.14.</b> Imussupressão por Dexametasona e Ciclofosfamida e seus efeitos quanto à persistência viral durante 7 e 10 dias de infecção.....	<b>57</b>
<b>Figura 4.15:</b> Esquema do desenho experimental da imunossupressão por Dexametasona e Ciclofosfamida em combinação ou não com Tamiflu durante 10 dias de infecção. ....	<b>58</b>
<b>Figura 4.16:</b> Esquema do Desenho experimental da imunossupressão com menor inóculo viral.....	<b>60</b>

<b>Figura 4.17:</b> Esquema do desenho experimental da imunossupressão por Dexametasona e Ciclofosfamida em combinação ou não com Tamiflu durante 10 dias de infecção.....	<b>61</b>
<b>Figura 4.18.</b> Efeito do tratamento imunossupressor Dexametasona e Ciclofosfamida em combinação com o antiviral Tamiflu, durante a infecção por influenza A/PR/8/38, sobre o surgimento de vírus resistente.....	<b>63</b>
<b>Figura 4.19.</b> Efeito do tratamento imunossupressor Dexametasona e Ciclofosfamida em combinação com o antiviral Tamiflu, durante a infecção por influenza A/PR/8/38, sobre o surgimento de vírus resistente.....	<b>65</b>
<b>Figura 4.20:</b> Esquema do desenho experimental da imunossupressão por Dexametasona e Ciclofosfamida em combinação ou não com Tamiflu durante 10, 14 e 21 dias de infecção por influenza com um inóculo de 500 PFU.....	<b>66</b>
<b>Figura 4.21.</b> Efeito do Protocolo Imunossupressor com menor inóculo viral leva a persistência viral prolongada.....	<b>67</b>
<b>Figura 4.22.</b> Efeito do Protocolo Imunossupressor com menor inóculo viral leva a persistência viral prolongada.....	<b>69</b>

# 1. INTRODUÇÃO

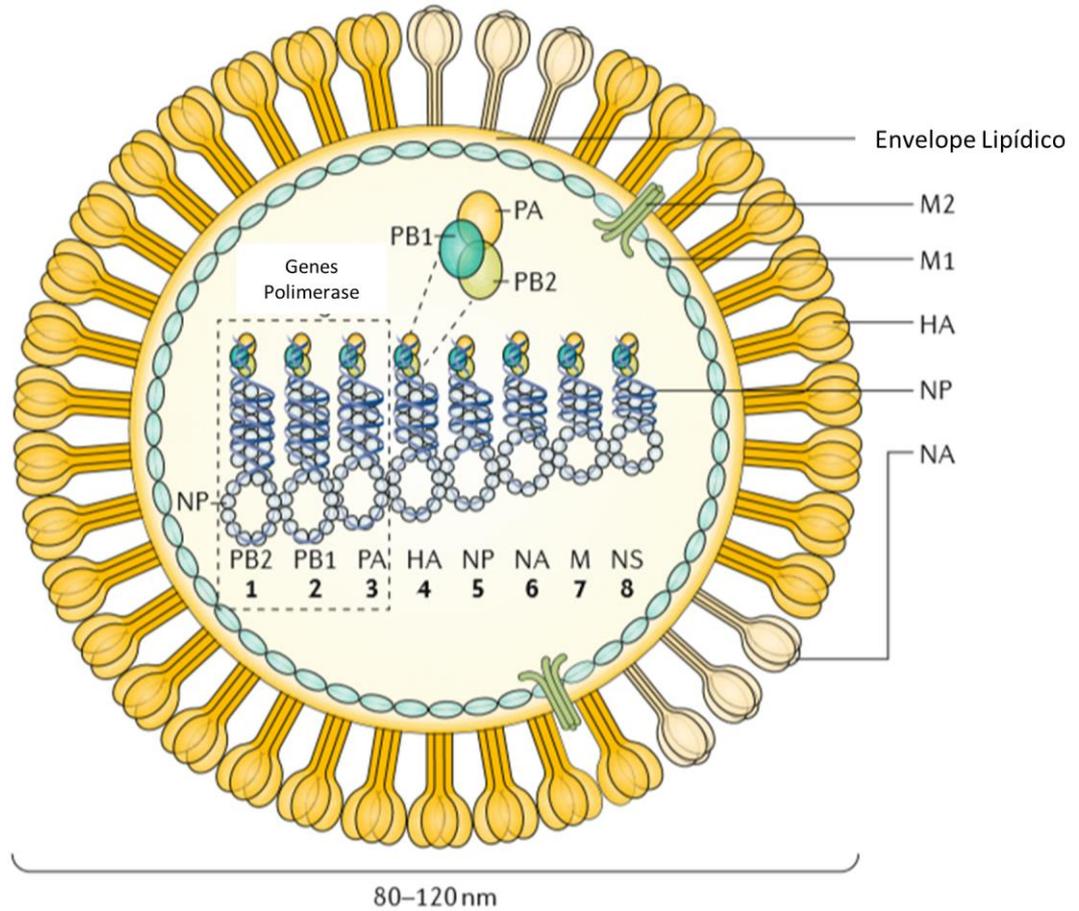
## 1.1 VÍRUS INFLUENZA

Pertencente à família *Orthomyxoviridae*, o vírus Influenza possui material genético composto por uma fita simples de RNA (1), senso negativo, com oito segmentos nos gêneros *Alphainfluenzavirus* e *Betainfluenzavirus*, além dos gêneros *Gammainfluenzavirus* e *Deltainfluenzavirus* (2). Dentre esses gêneros de Influenza, somente A, B e C são patogênicos para seres humanos, diferenciando-se pela segmentação do RNA e pelas diferenças antigênicas das nucleoproteínas e proteínas de matriz. Na superfície dos vírus Influenza A e B existem duas glicoproteínas, a Hemaglutinina (HA) e a Neuraminidase (NA), que possuem duas principais funções na atividade viral, ligação do vírus à célula e saída dos novos vírions da célula hospedeira, respectivamente. Já o gênero Influenza C possui a Glicoproteína Esterase-Hemaglutinina de Fusão (HEP), que assim como a Hemaglutinina, tem como função de se ligar ao ácido siálico da célula a ser infectada, resultando na endocitose do vírus (1).

As aves marinhas são conhecidas como os principais reservatórios de vírus influenza A, dentre elas estão: patos, gansos, gaivotas, entre outras - o vírus se instala no trato intestinal e a proteína de superfície HA, se liga a resíduos de ácido siálico da célula hospedeira em ligação  $\alpha 2,3$  com galactose e que servem como receptores para a entrada do vírus (3). O vírus influenza A tem a capacidade de infectar uma grande variedade de animais, porém existe especificidade para cada tipo de hospedeiro, apesar dos fatores ambientais facilitarem para que haja uma transmissão interespecie (4). Dentre os mamíferos, os suínos são destaque por possuírem ácidos siálicos em conformações  $\alpha,2,6$  e  $\alpha 2,3$ , característico de mamíferos e de aves respectivamente, o que abrange a possibilidade de uma coinfeção de vírus originalmente diferentes em uma mesma célula(5). O vírus da gripe Influenza A possui a capacidade de circular em diferentes animais, além do ser humano, como citado a cima, e podem ser classificados em dois tipos principais: H1N1 e H3N2, com base nas glicoproteínas, HA e NA; no total, até o momento, são 18 subtipos antigenicamente diferentes de HA, e 11 subtipos de NA(6) (7) e o vírus Influenza B se diferencia em duas linhagens distintas B/Victoria/2/87e B/Yamagata/16/88. O vírus Influenza A, por possuir seu RNA segmentado e ser capaz de infectar diversos hospedeiros, está sujeito a eventos de rearranjos, chamados de *shift* ou rearranjo antigênico, onde durante a coinfeção de dois subtipos virais em uma mesma célula hospedeira, os segmentos gênicos podem se rearranjar e originar um vírus totalmente novo. Este possível novo vírus, se bem adaptado, apresenta um grande risco para originar uma nova pandemia. O outro mecanismo de evolução do vírus Influenza A e B é o

*drift* antigênico, que são pequenas mutações gênicas que vão modificando o vírus, dando origem a novas linhagens. Devido às frequentes mutações que ocorrem nos genes que codificam as glicoproteínas HA e NA, as vacinas e anticorpos gerados em infecções anteriores podem se tornar ineficazes contra os novos vírus circulantes, podendo ainda gerar vírus resistentes aos antivirais em uso (8). A intensidade pela qual a infecção por influenza se desenvolve depende diretamente de alguns fatores, tais como: resposta imune do indivíduo, capacidade maior de infecção em certas regiões do trato respiratório superior ou inferior, morfologia e fisiologia do próprio vírus, incluindo proteínas de escape, como a NS1, que já foi descrita como causadora da retenção de RNA mensageiro da célula hospedeira, formando um complexo inibitório com próprio maquinário celular, além de inibir efeitos virais dos interferons (IFN) que ajudam na eliminação do vírus nas fases iniciais da infecção (9).

O primeiro contato do vírus influenza com o hospedeiro é através da via respiratória, onde se inicia a infecção de células epiteliais. A HA, que representa 80% das proteínas de superfície, é muito importante para a adsorção do vírus à célula, que se dá pela ligação aos ácidos siálicos presentes na superfície celular, já a NA possui uma atividade de sialidase, que permite os vírions da célula hospedeira saírem após a replicação, para que o vírus mantenham sua propagação. Além das proteínas citadas, as proteínas M2 também são encontradas no envelope lipídico do vírus e ajudam a manter o equilíbrio iônico viral. Já a proteína M1 é recoberta pelo envelope viral formando a camada interna ou *core* do vírion. Nessa camada interior podem ser encontrados proteínas de exportação nuclear e o complexo ribonucleo proteico, onde cada segmento de RNA é coberto pelas RNA polimerases PA, PB1 e PB2 pela nucleoproteína. Relacionada com a regulação gênica do vírus e da célula hospedeira, encontramos ainda uma proteína não estrutural 1 (NS1) (10) (11). Esses componentes do vírus Influenza podem ser observados na figura 1.1.

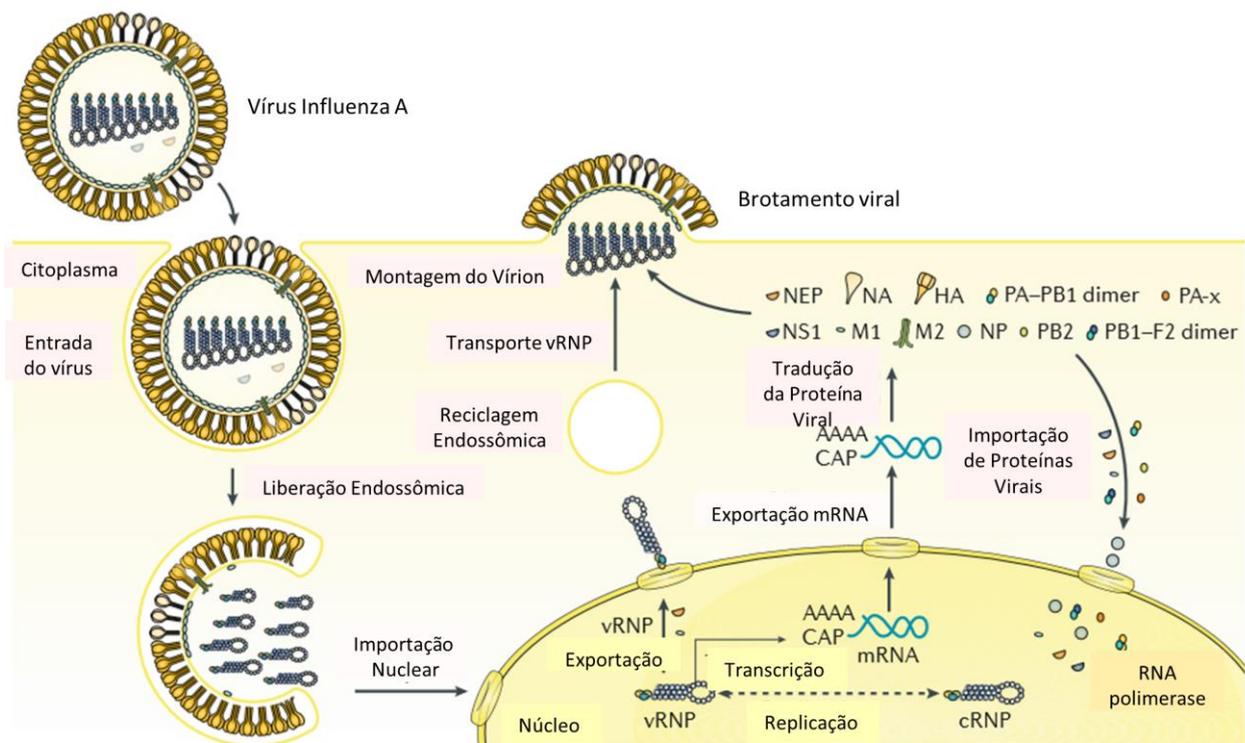


**Figura 1.1:** Estrutura do vírus Influenza A que possui de 80-120 nm: suas proteínas de superfície Neuraminidase (NA) responsável pela saída dos novos vírions da célula infectada, Hemaglutinina (HA) que se liga a célula hospedeira, proteína M2 que mantém o equilíbrio iônico viral, proteína M1 que reveste o core viral e ajuda na exportação do complexo ribonucleico, oito segmentos de RNA complexados com as endonucleases PA, PB1 e PB2. Figura adaptada de Florian Krammer *et al*, 2018(6).

## 1.2 CICLO REPLICATIVO DO VÍRUS INFLUENZA

No ciclo replicativo do vírus Influenza, faz-se indispensável a utilização de mecanismos da célula hospedeira para que a propagação viral tenha sucesso. Depois que o vírus se encontra ligado com o ácido siálico da célula, através da HA, por endocitose a partícula viral entra e no endossomo, através da entrada de prótons H<sup>+</sup> via o canal iônico M2, ocorre uma mudança conformacional na HA que mantém o domínio de ligação ao receptor HA1, e expõe o peptídeo de fusão HA2, que permite fusão das membranas do vírus com a membrana celular, liberando as RNPs para o citoplasma. Essas RNPs são direcionadas ao

núcleo celular, onde a síntese do material genético viral é feita. O RNA do vírus Influenza é utilizado como molde para RNA polimerase sintetizar o mRNA senso positivo, que dará origem ao material genético segmentado do novo vírus. Parte desse mRNA é levado para o citoplasma para tradução de proteínas estruturais e não estruturais, como, PB1, PB2, PA, M1, NS1, NEP M2 NA e HA para a composição do novo vírion (6). Para ser reconhecido pela maquinaria da célula, o vírus possui mecanismos para receber uma cauda poli-A e um cap 5' no mRNA. Após os processos de adaptação do mRNA viral à maquinaria celular, o mesmo é exportado para o citoplasma através das proteínas M1 e NEP/NS2 e, através de sinais de empacotamento, parte das proteínas são direcionadas para o núcleo para aumentar a síntese dos novos vírions e as proteínas de membrana NA, HA e M2 são posicionadas na porção apical da membrana celular para que o brotamento da nova partícula viral ocorra. Por último, e não menos importante, entra em ação a NA, que faz com que a partícula viral clive resíduos de ácido siálico de glicolípídeos e glicoproteínas para o vírus ser liberado da célula, figura 1.2.



**Figura 1.2:** Ciclo Replicativo do vírus Influenza dependente da maquinaria celular. Inicialmente o vírus influenza é endocitado pela célula hospedeira após a ligação com ácido siálico, dentro do endossomo a mudança conformacional da Hemaglutinina permite a fusão com a membrana e a acidificação no core viral, e a liberação das ribonucleoproteínas (RNPs). As RNPs são direcionadas para o núcleo onde ocorre a transcrição do RNA viral. O RNA mensageiro para ser reconhecido pela

maquinaria celular recebe um CAP 5' e uma cauda Poli-A. Em seguida esse RNAm é direcionado para o citoplasma para tradução das proteínas virais, que juntamente com material genético viral replicado no núcleo pela RNA polimerase, segue para a parte mais apical da célula para o brotamento do novo vírion. Figura adaptada de Florian Krammer *et al*, 2018 (6).

A replicação viral resulta em morte celular e complicações patológicas, além disso os produtos virais induzem a resposta inflamatória, responsável pelo recrutamento de células do sistema imune inato e adaptativo, que em excesso levam a imunopatologia ou até mesmo a pneumonia (6).

### **1.3 EPIDEMIOLOGIA**

O vírus Influenza representa uma constante preocupação para a saúde pública, sendo responsável por grandes pandemias e epidemias, com estimativa de causar de 290 a 650 mil mortes por ano no mundo (12) (13). As epidemias anuais são causadas pelos vírus influenza A e B, que sofrem regularmente mudanças em suas proteínas de superfície (NA e HA), essas mutações levam à redução da eficácia das vacinações anteriores aos presentes vírus circulantes, ou seja, os anticorpos gerados pela vacinação ou por infecções prévias possuem menor capacidade de neutralizar as novas variações do vírus, o que implica na necessidade de uma nova vacinação anualmente contra influenza. As linhagens circulantes possuem uma prevalência alternada ou de cocirculação ao longo dos anos entre Influenza A H1N1 e H3N2 e Influenza B Victoria e Yamagata, os principais acometidos com a doença são crianças e idosos. Os surtos de gripe ocorrem em épocas de baixas temperaturas e também quando há pouca umidade, o que favorece a transmissão (6). Em regiões tropicais, a ocorrência dos surtos possui um padrão menos sazonal e o vírus circula em menores níveis ao longo do ano. Em um estudo em que foi avaliada a cobertura vacinal para influenza em crianças, foi constatado que geralmente crianças são principais grupos transmissores da gripe, por isso a importância da vacinação deste grupo, o que ajuda a proteger também idosos que costumam apresentar a forma mais grave da doença (14). Estima-se que os dados de mortalidade por influenza são superestimados pelo fato do vírus estar associado a outras doenças em hospitalizações, logo muitos dados de óbitos não são analisados com agravo por gripe. Um estudo de 2018, estimou que nos EUA doenças associadas a influenza variam de 9,2 milhões a 35,6 milhões, com variação de idade (15). O Brasil possui uma diversidade grande de clima com padrões diferenciados de dispersão do vírus influenza. O sistema de vigilância nacional de influenza é composto por 130 unidades sentinela para casos de síndrome gripal (SG) e todos os hospitais também devem informar ao Ministério da Saúde os casos de síndrome

respiratória aguda grave (SRAG). Dentro dessa rede, em 2019, 5983 casos graves e 1149 óbitos foram diagnosticados como sendo causados pelo vírus influenza(16).

#### **1.4 HISTÓRICO DAS PANDEMIAS:**

Ao longo da história da humanidade, o vírus influenza ocasionou milhões de mortes. O rearranjo antigênico dos vírus Influenza A pode resultar em novos subtipos para os quais a população não apresenta uma resposta imune adequada, dessa maneira, se um novo vírus consegue se adaptar bem aos novos hospedeiros e possuir uma boa transmissibilidade, há um risco de uma pandemia (17). Uma pandemia é descrita como uma epidemia que se alastra por todo o mundo ou em regiões extensas, atravessando assim, fronteiras (18). As epidemias sazonais anuais causadas por vírus semelhantes ao ano anterior são diferentes das pandemias causadas por um novo tipo de vírus influenza que ocorrem em ciclos de 10 a 30 anos de maneira imprevisível e levam a taxas de morbimortalidade muito maior(19).

Durante o século XX houve alguns eventos importantes da doença, a Pandemia de 1918, causada pelo vírus H1N1, conhecida como a Gripe Espanhola, acarretou cerca de 50 milhões óbitos por todo o mundo (20), a maioria das vítimas foram jovens adultos, predominantemente por infecções bacterianas secundárias (21). Nos Estados Unidos o impacto foi devastador, cerca de 675mil americanos morreram, o que causou uma depressão na expectativa de vida média nos USA por mais de 10 anos(22). Seguido da Gripe Espanhola, algumas pandemias como a Gripe Asiática de 1957, causada pelo vírus H2N2, a Gripe de Hong Kong em 1968, causada pelo vírus H3N2 e em 1977 a Gripe Russa, causada novamente pelo vírus H1N1. A mais recente pandemia ocorreu em 2009, conhecida como gripe suína, o surto foi ocasionado por um vírus novo, resultante do triplo rearranjo com segmentos de RNA de vírus aviários, suínos e humanos. Estudo relata que o número de mortes confirmadas por H1N1 no ano de 2009 por laboratório e relatados à OMS, cerca de 18.000 casos, são subestimados. Estima-se que o número real de mortes seja até 15 vezes maior, chegando a números totais de até 395.000 mortes(23).

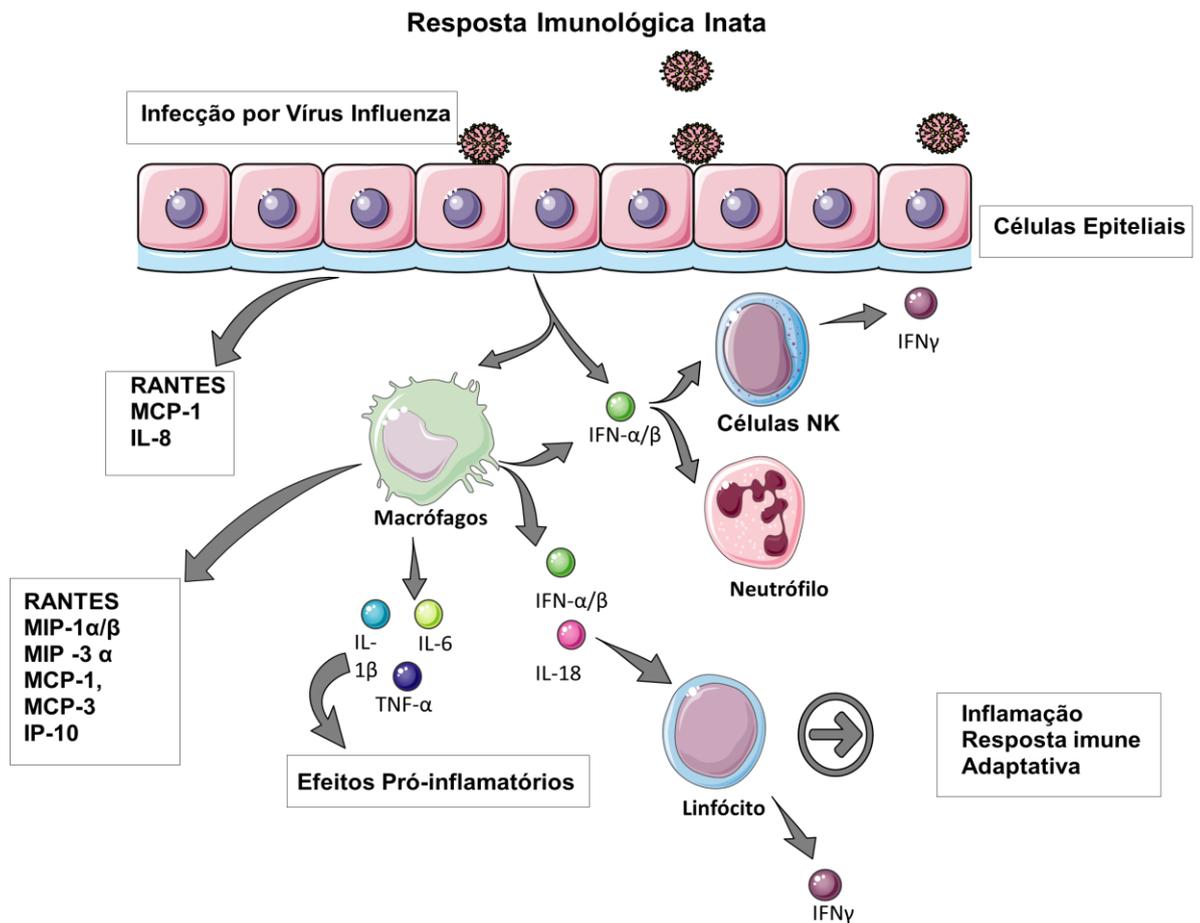
#### **1.5 RESPOSTA IMUNOLÓGICA AO VÍRUS INFLUENZA**

Para montar uma resposta antiviral, células imunes inatas precisam reconhecer o vírus invasor, através de seus Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs). Depois do primeiro contato do vírus com as células epiteliais do trato respiratório superior, essas iniciam uma resposta imune inata, ou seja, mecanismos que existem para responder ao invasor sem precisar ter um contato prévio com vírus. Após o reconhecimento do material genético do

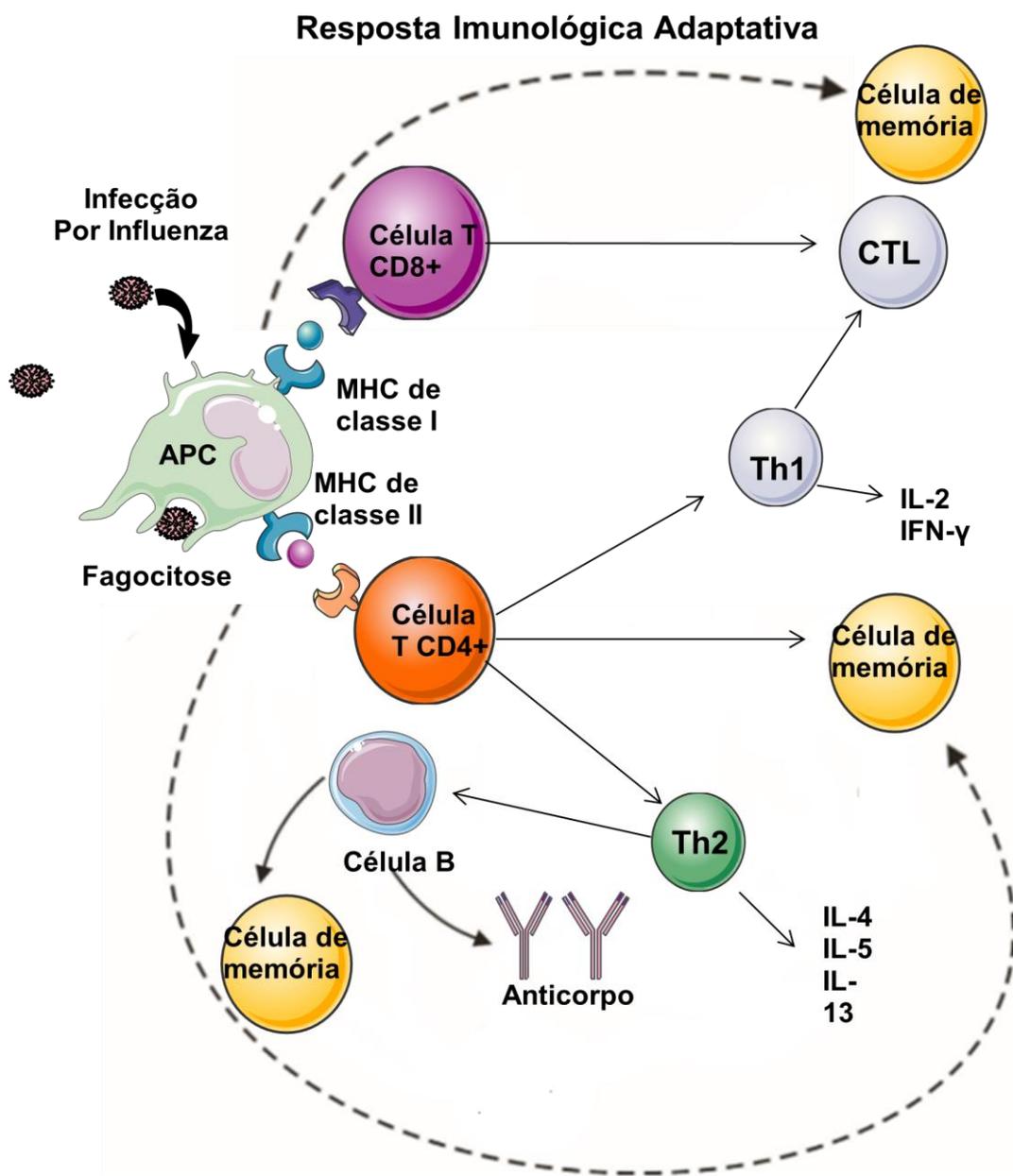
vírus (RNA viral) em suas diferentes formas (em fita simples ou dupla, com ou sem três fosfatos na extremidade 3', dependendo da etapa do ciclo de replicação), através de receptores de reconhecimento de padrões moleculares de membranas ou citosólicos, TLR3, TLR7, TLR8, RIG-1, NALP3, esses sensores sensibilizam a cascata de sinalização de fatores de transcrição IRF3 e IRF7, ativando a produção de citocinas antivirais IFN do tipo I ( $\alpha$  e  $\beta$ ) e tipo III  $\lambda$  e o fator de transcrição NF- $\kappa$ B ativa a produção de citocinas pró-inflamatórias (24)(25).

Nas vias aéreas inferiores, traquéia, brônquio principal e o pulmão, formado por bronquíolos e alvéolos, os vírus passam a infectar também macrófagos alveolares, que produzem mais mediadores inflamatórios, levando ao recrutamento de neutrófilos, células dendríticas, plasmócitos, células NK e por último os linfócitos (Figura 1.3) (26) (27). Os neutrófilos geralmente são encontrados em grandes quantidades nos pulmões e nas vias aéreas superiores, nos primeiros três dias de infecção pelo vírus Influenza (28). As respostas inflamatórias desencadeadas através da infecção pelo vírus influenza A levam ao recrutamento de linfócitos, muito importantes para o combate ao micro-organismo. Os linfócitos CD4<sup>+</sup> Th1, produzem citocinas que ativam células CD8<sup>+</sup> citotóxicas (CTL), responsáveis pelo *clearance* viral e também linfócitos B (figura 1.4). No decorrer da resposta imune as células infectadas que possuem peptídeos virais ligadas ao MHC de classe I, serão reconhecidas pelos receptores CD8 das CTLs, que induzirão a morte dessas células infectadas via apoptose, devido à ação de granzimas e perforinas. A liberação de anticorpos contra a HA por linfócitos B, impede a ligação do vírus às células do hospedeiro, neutralizando o mesmo. Já os anticorpos contra a NA, não o neutralizam, mas dificultam a propagação do vírus, ao afetarem a atividade enzimática da NA para liberação dos novos vírions da célula hospedeira (29).

Nas formas mais graves da doença, ocorre o que chamamos de “tempestade de citocinas”, que se trata da liberação excessiva de citocinas na resposta inflamatória contra a infecção, além da destruição tecidual causada pelo vírus, o que acarreta a intensa morbidade associada aos casos mais graves de infecção por influenza. Algumas terapias procuram diminuir a intensidade das respostas inflamatórias, visto que a mesma através de mediadores como, TNF- $\alpha$  e IL-6 leva à maioria dos sintomas, como caquexia, febre e perda de apetite (30)(31)(32).



**Figura 1.3:** Resposta Imunológica Inata durante a infecção pelo vírus Influenza. Vírus influenza infectando células epiteliais do trato respiratório superior e macrófagos alveolares residentes no trato respiratório inferior, induzem a liberação de citocinas pró inflamatórias, antivirais e quimiocinas em resposta à infecção viral, o que leva conseqüentemente ao recrutamento de células como NK, neutrófilos e por fim os linfócitos. Esses eventos pró-inflamatórios iniciais da infecção contribuem para a inflamação tecidual e sistêmica, o que promove grande parte dos sintomas da doença. A resposta imune adaptativa é iniciada nas vias aéreas com a chegada dos linfócitos, provenientes de órgãos linfóides secundários. Figura feita a partir de smart servier medical art (33), adaptada de Julkunen *et al*, 2001(34).



**Figura 1.4: Resposta Imunológica Adaptativa durante a infecção pelo vírus Influenza.** Indução da resposta humoral (anticorpos específicos para vírus) e celular (células T CD4 e CD8 e específicas para o vírus). A indução primária da resposta imune à infecção pelo vírus está indicada pelas setas sólidas. As setas pontilhadas indicam um encontro secundário com o vírus, ativando a formação de populações de células de memória específicas para o vírus influenza. Figura feita a partir de smart servier medical art (33), adaptada de Van der Sandt *et al*, 2012(35).

## 1.5.1 IMUNOPATOLOGIA

A infecção por influenza desencadeia uma resposta inflamatória que é crucial para depuração do vírus, como visto nos tópicos acima. Células residentes do próprio tecido infectado, possuem o importante papel na ativação para o recrutamento de outras células, tais como neutrófilos, células NK e macrófagos pró-inflamatórios, através da produção de citocinas pró inflamatórias (6).

Ao mesmo tempo que todo processo inflamatório é importante para combater o patógeno e formar a resposta imunológica adaptativa, a indução exacerbada desta cascata, conhecida como “tempestade de citocinas”, pode levar à imunopatologia da doença, o que caracteriza os casos graves. Os neutrófilos são um dos responsáveis por tais danos, uma vez que seus mecanismos para eliminar o vírus pode destruir o tecido pulmonar, como, armadilhas extracelulares ou *Neutrophil Extracellular Traps* (NETs), liberação da enzima mieloperoxidase e elastase causam danos colaterais ao tecido (36). Entretanto seu papel é importante para o *clearance* viral na fase aguda (37), por isso, muitas vezes os neutrófilos são tratados como uma “faca de dois gumes”, pois ao mesmo tempo que contribuem para a resolução do problema, também deixam muitas lesões que debilitam o tecido.

A replicação viral pode resultar em morte celular e levar a complicações patológicas. Os produtos virais também induzem a resposta pró-inflamatória, recrutando células para área inflamada, o que em excesso, induz a imunopatologia e até pneumonia(6).

A gripe induz uma resposta imunológica mais do que necessária para eliminação do patógeno (38). Todo processo inflamatório possui uma citotoxicidade elevada, o que leva a destruição do parênquima pulmonar, obstrução vascular, descamação do sistema braquial e brônquios, danos alveolares, aumento de permeabilidade vascular e edema pulmonar. Após todos esses acometimentos, o remodelamento tecidual leva a consequências como, fibrose e metaplasia escamosa, o que deixa o paciente com uma capacidade respiratória ainda mais debilitada e uma maior propensão à infecções secundárias bacterianas. Infecções bacterianas podem ainda ser piores nesse período do que as virais, já que infiltrados neutrofilicos comprometeriam mais o tecido (39)(40).

Visto que o processo inflamatório é um agente importante para uma piora da doença, muitas citocinas como IL-6, TNF- $\alpha$ , que interferem no efeito sistêmico e alguns mecanismos de ação celular, são alvos terapêuticos para modular seletivamente vias de sinalização que contribuem para lesão pulmonar, mas mantendo ainda sim a capacidade do hospedeiro de

responder de maneira eficaz a infecção pelo patógeno (41). A melhor compreensão do papel dos macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, receptores do tipo *Toll Like* e citocinas, ajudam à melhor compreensão da resposta individual de cada um durante infecção por influenza, e permitem dizer que os mecanismos imunopatogênicos são os precursores das lesões pulmonares (40).

## **1.6 PREVENÇÃO**

Uma das abordagens importantes para prevenir a influenza sazonal, são as vacinas, que no caso da gripe têm como principal benefício reduzir o número de hospitalizações e mortes em decorrência da infecção por influenza (42). Atualmente são utilizados três tipos de vacinas contendo o vírus: inativados, vivo atenuado e recombinantes, cada qual com sua particularidade sobre vantagens e desvantagens, mas todas precisando ser periodicamente ser revisadas quanto a cepa viral utilizada para composição, para corresponder antígenicamente com os vírus circulantes (43)(44).

As vacinas com vírus inativados são as mais comuns e possuem um custo benefício maior, o cultivo do vírus é feito em ovos embrionários de galinha e a imunidade gerada pela vacinação, a duração do efeito é de 6 a 12 meses, associada com baixo custo agregado na produção (45). A vacina trivalente - é distribuída pelo SUS na maior campanha de vacinação contra a gripe de rede pública no mundo, contém dois tipos de Influenza A (H1N1 e H3N2) e uma das linhagens de Influenza B (B/Victoria ou B/Yamagata). Já a vacina tetravalente, disponibilizada na rede particular, é composta pelos vírus H1N1, H3N2, um vírus B Yamagata e um vírus Influenza B Victoria. Apesar de a vacina quadrivalente ter o maior potencial em proteger contra o vírus Influenza B predominante no ano, o que muitas vezes não ocorre com a vacina trivalente, os custos para este aparentemente simples acréscimo são elevados, e há resistência a esta mudança devido aos fatores econômicos e burocráticos (46).

## **1.7 ANTIVIRAIS E RESISTÊNCIA**

Os casos mais brandos da doença são tratados por meio de analgésicos e antitérmicos, a fim de diminuir os sintomas. Já nos casos mais graves, o tratamento se dá pelo uso de antivirais, onde o principal alvo é a NA, pois possui o sítio ativo altamente conservado entre os subtipos de influenza A e B, apesar das demais regiões variáveis. Desse modo, inibidores de NA, como Tamiflu® (Oseltamivir), Zanamivir, Peramivir e Laninamivir são aprovados para o tratamento de casos agudos da doença (47). Além deles, também para uso clínico, são utilizados os inibidores do complexo trimérico de polimerases virais, formado pelas subunidades PA, PB1 e PB2, importantes para transcrição do genoma viral dentro da célula

hospedeira, são estes: Baloxavir (PA), Favipiravir (PB1) e Pimodivir (PB2) (48). Até o momento, no Brasil apenas os inibidores de NA são liberados pela Anvisa para tratar as infecções por influenza. O uso de inibidores de polimerase já foi aprovado em outros países como Japão e EUA(47). Porém, o uso de antivirais pode levar à seleção de vírus resistentes, como ocorreu com os bloqueadores da proteína de membrana M2, as adamantonas, que eram utilizados como antivirais anti-influenza e atualmente 95% dos isolados circulantes apresentam a mutação M2-S31N e são resistentes ao fármaco. Desde então, os inibidores de M2 não são mais recomendados tanto na profilaxia nem no tratamento de gripe(49). Da mesma maneira, vírus resistentes aos inibidores de NA tem surgido ao longo dos anos. Conforme o uso de antivirais é intensificado, a probabilidade de mutações virais pode aumentar, levando a uma resistência a esses antivirais por pressão seletiva. Também não podemos excluir a possibilidade de mutações espontâneas, que acontecem naturalmente de maneira aleatória e podem ser selecionadas para melhor adaptação do vírus (50). Em relação ao fármaco recém-aceito para uso clínico nos EUA, Baloxavir, já foram encontradas cepas resistentes de isolados de pacientes, mas ainda não se sabe se há eficiência na transmissão dessas mutações em humanos (51) (29).

Em uma revisão anual da WHO-AVWG sobre a suscetibilidade a antivirais, foram feitos monitoramentos quanto à suscetibilidade dos vírus Influenza (H1N1 e H3N2) ao Baloxavir em cinco países: França, Japão, Singapura, Estados Unidos e Reino Unido. Desde o período que o fármaco foi aprovado, em 2018 no Japão e nos EUA, a frequência de variações na PA foi baixa (0,08%), com uma maior taxa nos EUA. Como o uso do Baloxavir tem aumentado desde então, o monitoramento vem sendo importante para avaliação de sua eficácia (52). Amostras de pacientes do Japão e dos EUA foram analisadas e 9,7% dos pacientes (36/370), apresentaram uma substituição na PA na posição 38 e 85,3% mostraram um aumento dos títulos virais depois do tratamento com Baloxavir (53). Além disso, isolados de H1N1 pdm09 e H3N2 de pacientes tratados com Baloxavir e com substituições na mesma proteína, foram inoculados em furões por gotículas nas vias respiratórias e se mostraram muito semelhantes aos vírus selvagens quanto a sua capacidade replicativa e patogenicidade (54).

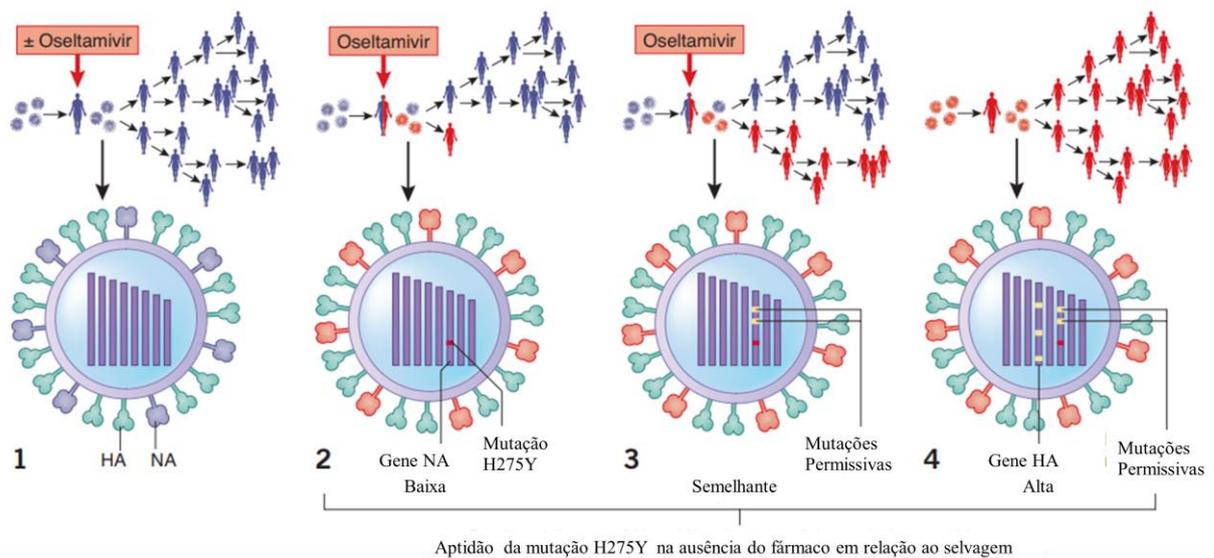
Os inibidores de NA são os comumente mais utilizados para o tratamento de gripe, principalmente em suas manifestações mais graves ou em grupos que apresentam risco elevado, mas o monitoramento da resistência a esses fármacos deve ser constante. Atualmente 0,2% dos vírus influenza circulantes apresentam resistência ao Tamiflu® (55). Pacientes com câncer são mais propícios a ter infecções por influenza (56), sabido isto, um estudo de coorte

foi realizado afim de avaliar a propagação viral em pacientes com câncer infectados pelo vírus influenza e foi detectada uma permanência viral de até 44 e 63 dias, esses mesmo pacientes foram tratados com a partir do momento que foi constatado os primeiros sintomas, o vírus foi detectado após 25 a 40 dias após o tratamento com antiviral (57). Algumas características contribuem para a evolução rápida do vírus, como grandes populações, tempo de gerações curtas e altas taxas de mutações. Uma mutação bem estabelecida que é capaz de ludibriar o sistema imunológico e conferir vantagem adaptativa ao vírus, pode ser amplamente disseminada para as próximas gerações (58). Como o processo de revisão da polimerase não acontece na replicação do influenza, a troca de nucleotídeos é muito frequente (59). As mutações pontuais nos sítios antigênicos contribuem para evolução gradual do vírus, produzindo novos subtipos de influenza capazes de burlar o sistema imune (60). O escape imune viral pode ocorrer através das mutações, principalmente nas proteínas estruturais HA e NA. Sabendo que HA é uma proteína que contém três locais funcionais: sítio de ligação ao receptor, sítio antigênico e o sítio de clivagem e que a proteína PB2 é uma das responsáveis pela replicação e a proteína NS1 é expressa em células infectadas, foi realizado um estudo para avaliar associação entre mutações nos genes HA, NA, NS1 e PB2 no vírus influenza A H1N1 pdm09. A mutação HA D222G foi associada com o aumento da gravidade da doença, assim como a mutação HA D222N, a posição 222 reside no local de absorção de receptores da proteína HA e pode possivelmente influenciar a especificidade da ligação (61). Além de outras mutações, K58I e D112G são conhecidas por aumentarem e diminuírem a estabilidade de HA, respectivamente, sem comprometer a integridade estrutural das principais regiões antigênica (62). As atuais cepas circulantes não são resistentes ao antiviral Oseltamivir em sua maioria, mas em algumas infecções isoladas podem favorecer ao aparecimento de mutações (63). A mutação H275Y é característica por uma mudança na histidina por tirosina no resíduo 275 do gene NA (64). Uma vez que as mutações e os mecanismos moleculares estão bem estabelecidos, a resistência a antivirais pode servir para fazer um estudo comparativo, avaliando como outras pressões seletivas podem atuar nos hospedeiros (65).

Em um relato da OMS de 2011, sobre a circulação de vírus Influenza A (H1N1)pdm09 resistentes a antivirais, foi reportado o isolamento de 605 vírus resistentes ao Oseltamivir carregando a substituição H275Y, sendo 28% dos casos em que havia relatos clínicos disponíveis relacionados a pacientes imunodeficientes e 72% a pacientes não-imunodeficientes, dentre os últimos, 37% não haviam recebido qualquer tratamento com o Tamiflu®; além de um variante resistente tanto ao Tamiflu® quanto ao Zanamivir, contendo a substituição I223R (66). Os vírus resistentes podem surgir com a persistência e a propagação

do vírus em pacientes imunodeficientes, pacientes que recebem doses insuficientes do antiviral ou ainda de forma aleatória (67) (68) (69) e persistir na população, como ocorreu com o vírus H1N1 que circulava anteriormente à pandemia de 2009. Para que o vírus resistente persista no organismo ou circulando no ambiente, depende da aptidão dele em relação ao vírus do tipo selvagem suscetível ao antiviral.

A mutação H275Y, uma substituição de histidina para tirosina próxima ao sítio ativo da enzima NA, conseguiu se instalar no genoma do vírus sem fazer com que ele perdesse o *fitness* viral e a capacidade infectiva, conforme demonstrado na figura 1.5. Em 2008 foi reportada uma alta taxa de vírus circulantes com a mutação de resistência ao Tamiflu® (70). Conforme o vírus pandêmico surgiu e se espalhou pelo mundo nos anos de 2009 e 2010, a linhagem de H1N1 que antes circulava e que carregava a mutação de resistência desapareceu. Não foi possível saber se o desaparecimento foi devido ao fim das epidemias sazonais ou se o vírus resistente não era tão apto quanto o vírus suscetível. Antes da pandemia de 2009 poucos países utilizavam o Tamiflu®, por isso a detecção de resistência era rara, exceto em 2008 (71). Logo após a pandemia em vários países, foi detectado em pacientes tratados, o vírus influenza A (H1N1) pdm09 H275Y, resistente ao Oseltamivir(72).



**Figura 1.5:** Surgimento e perpetuação da mutação H275Y na população de vírus H1N1. Um vírus suscetível infectando um indivíduo também suscetível, e o mesmo sendo tratado ou não com Tamiflu® (Oseltamivir), é capaz de infectar outros indivíduos saudáveis (1), porém o tratamento com o antiviral também pode levar ao surgimento de subpopulações virais que carregam a mutação H275Y

no gene NA, mas o condicionamento viral infectante ainda é muito baixo para sua perpetuação (2). Entretanto o tratamento de pessoas infectadas com subpopulações do vírus que possuem a mutação H275Y, pode gerar vírus sem a aptidão infectante comprometida a partir do surgimento de mutações permissivas, que ajudam a estabelecer melhor estas modificações genéticas (3). Depois que estiver bem estabelecida, além de outras mutações em outros genes, como HA, este vírus é propagado a indivíduos não tratados, permitindo ser uma linhagem dominante (4). Figura adaptada de Kelso *et al*, 2012 (71).

Estudos de indução de resistência sob pressão do Tamiflu® são feitos principalmente em cultura de células (73), o que não leva em consideração a complexidade de um ser vivo infectado pelos vírus influenza. No estudo em que foram feitas passagens sequenciais do vírus influenza, após dez passagens na presença crescente de Tamiflu®, foi possível ver que o isolado crescia sem problemas na presença do fármaco, mas ainda permanecia sendo inibido por Zanamivir, além da persistência na presença do Tamiflu, também permitiu ao aparecimento de mutações como H275Y (74). Similarmente, o vírus H3N9 foi isolado em placas em células MDCK (*Madin Darby Canine Kidney*) na presença crescente de Tamiflu® durante 15 passagens, após o processo foi possível ver algumas mutações nos genes NA e HA como, R305Q e E119V, e a mutação dupla S158N- G430N no gene HA (73).

Alguns estudos avaliaram a indução de resistência em modelo experimental de infecção por influenza em camundongos. Em um estudo, usando dois subtipos de vírus influenza, H1N1 e H3N2, foi observado o surgimento de variantes resistentes ao Tamiflu® somente do vírus H3N2 (75). Segundo um relato de caso de surgimento de resistência ao Tamiflu®, publicado em 2009, a presença de níveis subterapêuticos do composto quando já ocorre replicação viral pode representar um importante fator que levou à emergência de vírus resistentes (76). Um estudo mostrou que camundongos *severe combined immuno deficient* (SCID) ou *non obese diabetic/ severe combined immuno deficiency* (NOD/SCID) são mais suscetíveis à infecção pelo vírus influenza B, possuem maior tempo de permanência do vírus e os antivirais possuem limitações, devido à resposta imune deficiente (77).

O vírus Influenza é responsável por maior parte das infecções respiratórias, tanto em indivíduos imunocompetentes e imunossuprimidos, se agravando mais no último grupo que está associado a maior morbimortalidade e permanência viral (78). Alguns estudos de modelos *in vivo* já utilizam imunossupressores como Ciclofosfamida para obter um modelo animal mais próximo de um organismo imunossuprimido, o que permitiu ver uma maior permanência viral e redução de anticorpos (79). Em um estudo onde camundongos SCID

foram infectados com vírus Influenza B, foi observada uma menor resposta imune ao vírus durante a infecção, que permaneceu de forma prolongada no organismo (80).

## **1.8 TRATAMENTO COM IMUNOSSUPRESSORES E IMUNOMODULADORES.**

Glicocorticóide é uma classe de hormônio esteroidal, essencial para os mamíferos, e sua ação está associada a variados processos celulares, como a apoptose e a resposta imune. A dexametasona (DEXA) é um glicocorticóide utilizado para o tratamento de algumas doenças como as do trato respiratório: asma, sinusite, rinite, doença pulmonar obstrutiva crônica, dentre outras. Este corticóide sintético está entre os mais prescritos e possui um efeito anti-inflamatório e imunossupressor, sendo agonista do receptor de glicocorticóide (GR), o que leva à modulação da expressão gênica de mediadores protéicos nas células, com predomínio do efeito de transrepressão (81). A DEXA regula negativamente a proliferação de células T, restringindo o processo de expansão clonal celular, além disso, já foi observada a ação anti-proliferativa da DEXA, tendo em vista sua interferência na fase S da replicação celular (82). No estudo onde foi avaliada a interferência *in vitro* do tratamento com DEXA, foi visto a supressão de citocinas pró-inflamatórias como IFN- $\gamma$  e IL-2 em células viáveis e não simplesmente resultado de morte celular induzida por ação da droga (83). O tratamento com glicocorticóides já foi associado ao aumento da expressão de anexina-A1 nos neutrófilos e em outras células inflamatórias, dificultando a migração das mesmas, uma vez que esta proteína, originalmente descrita como fosfolipase A2, medeia respostas anti-inflamatórias e suprime o recrutamento de leucócitos (84). Além disso, o tratamento com glicocorticóides também foi associado à menor expressão de L-selectina, importante para mobilização de neutrófilos da medula óssea para corrente sanguínea (85) (86). Em um estudo onde foram utilizados animais nocaute para o gene Anx-1, responsável pela expressão da anexina-A1, foi constatado que para a ação completa anti-inflamatória da dexametasona, é necessária a regulação positiva do gene (87). A respeito da inibição da atividade estrogênica por glicocorticóides, há uma preocupação com a limitação do tratamento de pacientes que receberam terapias para reposição hormonal, uma vez que já se observou a depleção de estrogênio mediada por GR, o que pode levar a complicações na homeostase de terapias endócrinas (88) (89). O aumento de lactato e glicose em cavalos após administração de dexametasona, foi relacionada à interferência dos glicocorticóides no metabolismo de carboidratos, por possuir influência na gliconeogênese, essa interferência pode ser associada a sua ação imunomodulatória(90).

De fato, o tratamento com este corticoide reduz as taxas de mortalidade e diminui a resposta inflamatória devido à infecção experimental por influenza em camundongos (91). Porém, alguns estudos apontam que o uso de corticoide no tratamento de doenças virais pode aumentar a carga viral, predispondo a infecções secundárias (92). Apesar da sua eficiência ser demonstrada em alguns estudos científicos, como o que utilizou um modelo de infecção com H1N1 pandêmico de 2009 A/Beijing/501/2009, isolado de uma amostra de um paciente em estado agudo da doença (91), o tratamento com corticóide para Influenza A na clínica ainda é controverso.

O estudo de meta análise que comparou pacientes infectados com influenza acometidos com pneumonia, tratados ou não com corticoides, revelou que no caso do tratamento foi verificado aumento no número de infecções secundárias e de mortes, sendo esses pacientes tratados mais propensos ao desenvolvimento de infecções bacterianas secundárias devido à imunossupressão (93).

Pacientes com gripe no estado agudo da doença, tratados com corticóide e Tamiflu®, apresentaram redução na lesão pulmonar (94). Em concordância com essa contra-indicação, o Centro de Controle e Prevenção de Doenças dos EUA não recomenda o uso de corticóides para o tratamento de infecção por H1N1, exceto em casos específicos, como doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) e choque séptico (95).

Há diversos estudos que levam em consideração que a gravidade da doença pelo vírus influenza está associada à resposta inflamatória, que causa grandes danos teciduais. Por isso, diversas etapas da resposta imune são estudadas como alvos terapêuticos para redução da lesão verificada no contexto da inflamação (41). Dentre estes, vale ressaltar a citocina TNF- $\alpha$ , envolvida em processos importantes como imunidade inata e adaptativa, apoptose de células infectadas e diferenciação celular (96). O inibidor de TNF- $\alpha$  etanercept (Enbrel®), utilizado para tratamento de doenças com distúrbios autoimunes, foi utilizado em camundongos infectados com influenza e tendo sido atestada a redução na intensidade de parâmetros inflamatórios e na taxa de mortalidade (97).

Além dos antivirais, diversos grupos têm estudado o uso de terapias que procuram diminuir a intensidade das respostas inflamatórias, reduzindo os níveis e/ou os efeitos de mediadores inflamatórios. Como por exemplo, o papel do fator de ativação plaquetária (PAF)(98), na infecção experimental por influenza, foi estudado a partir do uso de animais deficiente no seu receptor PAFR ou com o tratamento com um antagonista, chamado PCA4248, o que levou a uma redução da inflamação após infecção experimental por

influenza, protegendo os animais da imunopatologia e letalidade causadas pela infecção, sem afetar a resposta específica contra o vírus. As respostas do hospedeiro bem orquestradas, juntamente com a depuração viral efetiva, são críticas para o desfecho clínico otimizado após infecções por influenza.

Receptores ativados por proliferadores de peroxissomo (PPAR) são receptores nucleares que funcionam como fatores de transcrição que regulam transcrição de genes. São três isotipos: PPAR $\alpha$ , PPAR $\gamma$  e PPAR $\delta$  (99). Estudo *in vivo* com camundongos desafiados com vírus PR8(A/PR/8/34 (H1N1)) mostrou os efeitos benéficos do tratamento com agonista de PPAR, levando ao aumento de sobrevivência, diminuição na produção de citocinas, além da redução dos títulos virais, esses efeitos mostraram ser mediados por PPAR $\gamma$  (100). O imunomodulador macrolídeo é um antibiótico usado em infecções bacterianas e foi mostrado induzir redução na produção de diversas quimiocinas e citocinas durante diferentes tipos de processos inflamatórios (41).

Sabendo que a enzima ciclo-oxigenase tipo 2 (COX-2) tem um papel importante no processo inflamatório causado pelo vírus influenza, vários estudos foram feitos para análise da consequência de sua inibição no contexto da infecção viral. Um estudo *in vitro* mostrou que o inibidor de COX-2 diminuiu a resposta pró-inflamatória e teve um papel antiviral direto em macrófagos humanos depois da infecção por H5N1 (101)(102). No entanto, não se sabe ainda se o uso de terapias alternativas poderia influenciar de alguma maneira o surgimento de vírus resistentes aos antivirais. Estudos são necessários para melhor esclarecer este ponto.

Com base nas observações acima, desenvolvemos o presente estudo, que constou da utilização de doses subterapêuticas do antiviral Tamiflu®, em combinação com compostos imunomoduladores como o PCA4248 - antagonista de receptor do fator de agregação plaquetária (PAF) e imunossupressores como o corticoide DEXA e o quimioterápico CICLO, em um modelo murino de infecção pelo vírus A/PR/8/34 H1N1. Utilizando diferentes protocolos de interferência no sistema imune, buscamos entender a dinâmica do surgimento de vírus mutantes, o que poderia contribuir com conhecimento a ser aplicado na maior vigilância epidemiológica do vírus influenza em pacientes imunocomprometidos, bem como para estudar novas estratégias adjuvantes na condição de infecções virais graves.

## **2.0 OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

Investigar o potencial efeito de drogas com ação imunomodulatórias e/ou imunossupressora, em combinação com o antiviral Tamiflu®, sobre a resposta inflamatória e na seleção de vírus mutantes resistentes ao antiviral em um modelo experimental murino de infecção pelo vírus influenza.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- i. Determinar o espectro de doses do antiviral Tamiflu® que confere proteção de cerca de 50% na letalidade dos animais infectados por influenza;
- ii. Investigar o efeito do inibidor de PAFR -PCA4248 - em combinação com Tamiflu® sobre a infecção por influenza e no surgimento de vírus resistentes ao antiviral;
- iii. Investigar o efeito do tratamento com DEXA em combinação com Tamiflu® sobre a infecção por influenza e no surgimento de vírus resistentes ao antiviral;
- iv. Investigar o efeito do tratamento com DEXA e CICLO em combinação com Tamiflu® sobre a infecção por influenza e no surgimento de vírus resistentes ao antiviral.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1. ANIMAIS E MODELO DE INFECÇÃO VIRAL**

Foram utilizados camundongos C57/Bl6 machos, de 8 a 10 semanas, livres de patógenos, fornecidos pelo Instituto de Ciência e Tecnologia em Biomodelos, da Fundação Oswaldo Cruz. Os animais foram submetido são processo de infecção com o vírus influenza A/PR/8/34 H1N1 (PR8), utilizando-se o inóculo de 1000PFU do vírus que causa em torno de 50% de letalidade, e de 500 PFU para o estudo com compostos indutores do quadro de imunossupressão. O vírus foi instilado por via intranasal, em animais previamente anestesiados com a combinação de cetamina (60mg/kg) e xilazina (4mg/kg). Todos os protocolos experimentais foram aprovados pelo comitê de ética CEUA/IOC LA-002/2018.

##### **3.1.1 VÍRUS INFLUENZA A/PR/8/34 H1N1**

Para infecção experimental dos animais, foi utilizado o vírus Influenza A H1N1, originalmente isolado em Porto Rico em 1934 (PR8). Trata-se de um vírus adaptado a camundongos criado pela técnica de genética reversa utilizando 8 plasmídeos contendo os diferentes segmentos gênicos do vírus original, gentilmente cedido pelo Dr. Alexandre Vieira Machado, do Centro de Pesquisas René Rachou, Fiocruz/MG. Os estoques virais criados por genética reversa foram crescidos em cultura de células MDCK para utilização nos experimentos. Para isso, foram utilizadas duas diluições diferentes do vírus, 1000 PFU ou 500 PFU, dependendo do objetivo do ensaio.

#### **3.2. TRATAMENTOS**

##### **3.2.1 TRATAMENTO COM TAMIFLU®**

Após três dias de infecção pelo vírus influenza, quando apareceram os primeiros sinais da doença (piloereção e perda de peso), os animais infectados receberam tratamentos com diferentes concentrações defosfato de oseltamivir (Tamiflu®), diluído em PBS. Inicialmente foi feito ensaio para análise de letalidade, com 32 animais divididos em 4 grupos: três grupos tratados com Tamiflu® nas doses de 0,1, 1 e 10 mg/kg, em um volume de 100 µl por animal, e um grupo que recebeu 100 µl de PBS por animal (grupo controle negativo). O tratamento foi feito por via oral (gavagem), duas vezes ao dia, até o sétimo dia após a infecção. Para o experimento de avaliação de parâmetros inflamatórios e resistência do vírus, após sete dias de infecção, foram utilizados grupos experimentais similares acrescidos de um grupo instilado

com salina em substituição ao vírus (*mock*) como controle negativo. Após a seleção de uma dose de Tamiflu® que protegesse parcialmente os animais, foi selecionada a dose de 1mg/kg para ser utilizada nos ensaios seguintes. Após cada experimento foram analisados os parâmetros de letalidade, perda de peso, infiltrado de leucocitário, título viral, isolamento viral, teste de susceptibilidade ao Carboxilato de Oseltamivir.

### **3.2.2. TRATAMENTO COM DEXAMETASONA (DEXA) E CICLOFOSFAMIDA (CICLO)**

Um grupo de animais recebeu tratamento com DEXA (5mg/kg), uma vez ao dia por gavagem, após o terceiro dia de infecção (grupo DEXA). Um segundo grupo recebeu o tratamento com DEXA combinado com 1mg/kg de Tamiflu® (DEXA+Tamiflu®), como descrito acima, e outro grupo recebeu PBS como veículo (Veículo). Em outro grupo de experimentos, DEXA foi utilizada na dose de 10mg/kg, administrada de forma combinada ao quimioterápico CICLO (150mg/kg), por via intraperitoneal, como descrito por Marathe *et al*, 2017 (103), ambos iniciados um dia antes da infecção (DEXA-Pré+CICLO). Outro o grupo experimental teve acrescido o uso do antiviral Tamiflu® (1mg/kg) (DEXA-Pré+CICLO+Tamiflu®). O tratamento com CICLO foi feito nos dias -1 e 5 pós-infecção, uma vez por dia. Em outro ensaio foi usado o mesmo protocolo imunossupressor com DEXA e CICLO, mas com inóculo de 500 PFU (diferente dos demais ensaios que utilizaram inóculo de 1000 PFU), além do tratamento com CICLO ser estendido para os dias -1, 5 e 10. Em todos os ensaios foram utilizados grupos controles *mock*, veículo e Tamiflu®. Parâmetros de análise foram similares aos descritos nos itens 3.2.1.

### **3.2.3. TRATAMENTO COM PCA 4248**

O tratamento com o imunomodulador PCA4248, antagonista de receptor de PAF, foi realizado entre os dias 3 e 7 pós-infecção, por via oral, na dose de 5mg/kg, no volume de 200ul por animal. Em outro grupo experimental, o composto PCA4248 foi utilizado em combinação com Tamiflu® (1mg/kg), de acordo com os protocolos anteriores (PCA+Tamiflu®). O grupo controle positivo foi veículo foi tratado com etanol, 200ul por animal. Parâmetros de análise foram similares aos descritos nos itens 3.2.1.

## Tabela de Tratamentos

Tratamento	Fármaco	Dias de tratamento	Análises (dias pós-infecção)	Via	Dose
<b>Antiviral</b>	Tamiflu® (Roche)	3° ao 7° dia de infecção	7 e 10	Oral	10mg/kg, 1mg/kg, 0,1mg/kg
<b>Imunomodulador</b>	PCA 4248, (TocrisBioscience)	3° ao 7° dia de infecção	10	Oral	5mg/kg
<b>Imunossupressor 1</b>	DEXA (Sigma)	Pré: -1 ao 6° ou 9° pós-infecção Pós: 3° ao 6° ou 9° dia pós infecção	7 e 10	Oral	5mg/kg
<b>Imunossupressor 2</b>	DEXA+ CICLO (Sigma)	-1 ao 9° dia pós- infecção -1 e 5 pós-infecção Ou -1, 5 e 10 pós- infecção	10, 14 ou 21	IP	10mg/kg 150mg/kg

**Tabela 3.1:** Tratamentos utilizados no modelo de infecção por influenza.

### 3.3.AVALIAÇÃO DA LETALIDADE E PERDA DE PESO

A avaliação da letalidade e da perda de peso corporal foi feita através do acompanhamento dos camundongos durante todo período do experimento, desde o momento de infecção até o dia 21 pós-infecção. Em caso de perda de peso superior a 25% do peso inicial, o animal foi morto com uma dose letal do anestésico cetamina e xilazina (150mg/kg para ambos) e considerado este dia para a letalidade.

### 3.4.OBTENÇÃO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE

As análises foram realizadas nos dias 7, 10, 14 e 21 dias após a infecção. Os animais foram sedados com cetamina (60mg/kg) e xilazina (4mg/kg) quando ocorreu a retirada do sangue, feita através de uma incisão no plexo braquial, para contagem total de leucócitos sanguíneos, após foram mortos com um dose letal da combinação dos anestésicos de cetamina (150mg/kg) e xilazina (150mg/kg).Em seguida, foi realizado o lavado broncoalveolar (BAL)

que consistiu na inserção de cânula na traqueia através da qual foi feita lavagem das vias aéreas com 2 vezes 1ml de PBS com 10% de EDTA. Após centrifugação, foi recolhido sobrenadante para quantificação de citocinas e conteúdo proteico, e o *pellet* ressuspensão para contagem de leucócitos totais e diferencial. Os pulmões foram perfundidos com 3mL de PBS para retirada do sangue, e em seguida, o pulmão esquerdo foi conservado em formol 10% para histologia e o direito processado para análise do título viral, isolamento viral, análise de mieloperoxidase (MPO).

### **3.5. CONTAGEM DE LEUCÓCITOS**

A análise de leucócitos totais constou da diluição das amostras em solução de Türk, para lise de hemácias, e contagem feita em câmara de Neubauer. Foram, também, realizados esfregaços sanguíneos e citoesfregaços do BAL, que foram corados com solução de May-Grumald-Giemsa e feita análise diferencial de leucócito sem microscópio de luz e objetiva de imersão em óleo. Cada lâmina foi contada três vezes e feita uma média das contagens.

### **3.6. QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS**

A partir do sobrenadante do BAL, foram quantificados os níveis totais de proteína pelo método de Bradford. Para isso, foi feita uma curva padrão de soro albumina bovina (BSA) utilizando-se com concentrações seriadas a partir de 4mg/mL. As amostras e as a curva padrão (2µL) foram testadas em duplicata em uma placa de 96 poços, sendo em seguida feita adição do reagente de Bradford diluído 5 vezes. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 595 nm.

### **3.7. ANÁLISE HISTOLÓGICA**

O pulmão esquerdo foi fixado em formol tamponado a 10% (24h). O tecido sofreu consecutivas etapas de desidratação com etanol e clarificação em xilol, seguindo-se impregnação o tecido em parafina para confecção dos blocos e, posterior, realização de cortes histológicos de 5 µm de espessura. Foi utilizada coloração por Hematoxilina/Eosina (H&E). A análise morfométrica foi realizada em corte submetidos ao escaneamento em sistema 3DHISTECH – Panoramic MIDI e software Panoramic Viewer, através da ferramenta de anotação a mão livre que possibilitou que toda a área do pulmão fosse delimitada, tendo a finalização da demarcação salvando/identificando cada pulmão. Além da delimitação da área total dos pulmões, foi feita também delimitação da área de hiperinsuflação, vias aéreas e vasos de grande tamanho foram excluídos da análise se no momento da delimitação as

mesmas excedem a área visualizada no aumento de 20x. Após todas as delimitações os valores do perímetro ( $\mu$ ) e área ( $\mu^2$ ) referentes as áreas demarcadas são exportadas em planilha do Excel. A finalização da avaliação morfométrica foi feita mediante cálculo realizado a partir de uma regra simples percentual, partindo do princípio que a área total do pulmão total equivale a cem por cento (100%) e a área ocupada por hiperinsuflação a incógnita ser descoberta em porcentagem.

### **3.8. QUANTIFICAÇÃO DE MPO E CITOCINAS NO TECIDO PULMONAR**

A quantificação de MPO, utilizada como uma medida indireta pela presença de neutrófilos no tecido pulmonar, e de citocinas foi realizada a partir de fragmentos de do pulmão direito. As amostras foram submetidas à maceração em 1ml da solução de PBS contendo coquetel de antiproteases (COMPLETE Roche®), após centrifugação a 10000rpm a 4°C e, o sobrenadante foi recolhido e usado para o ensaio de ELISA. O *pellet* foi ressuspense em 1 ml de Hank's. Após nova homogeneização e centrifugação foi feito choque osmótico para lise de hemácias com NaCl 0,2% seguida da adição de NaCl 1,6%. Por fim, o macerado foi ressuspense em HTAB 0,25%, que é um detergente que causará lise celular para posterior quantificação da MPO. O ensaio foi feito através da reação a 37°C da amostra processada com O-dianisidina (0,68 mg/ml), por 15 minutos, seguida de incubação com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,006% por mais 15 minutos a 37°C. Em seguida, foi adicionada 50  $\mu$ l Azida Sódica (0,2%) para parar a reação. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro, em comprimento de onda de 460 nm.

### **3.9. ELISA**

Com o sobrenadante dos pulmões processados, conforme descrito acima, ou com o sobrenadante do BAL, diluídos com Assay Buffer e soro fetal bovino (2%), foram feitas as quantificações de mediadores inflamatórios por ELISA. Foram utilizados os kits Duo Set da R&D Systems, para quantificar as citocinas: IL-6, IFN- $\gamma$ , MIP-1 $\alpha$ , KC, RANTES, comparando-se as absorbâncias das amostras diluídas, às absorbâncias das curvas-padrão, conforme instruções do fabricante. Os resultados foram expressos em pg/mL.

Em síntese, foram utilizadas placas de 96 poços, às quais foram adicionados 50 $\mu$ L/poço de anticorpos de captura diluídos em solução tampão (NaCl 1.5M, H<sub>3</sub>BO<sub>4</sub> 0,5M e NaOH 1N, pH = 7.4) e incubados por um período de 12 horas a 4°C. Posteriormente, as

placas foram lavadas com solução tampão 1 (timerosal,  $KPO_4$  1M e Tween 20 0,005%), e em seguida para o bloqueio de sítios inespecíficos com solução contendo PBS e albumina de soro bovino (BSA, 1%). Após 1 hora em temperatura ambiente, as placas foram novamente lavadas. As amostras e a curva padrão foram diluídas em solução tampão 2 (soro fetal bovino 2% em PBS) e adicionadas aos poços (50 $\mu$ L/poço). Após o período de incubação (2h a 37°C) os poços foram lavados novamente. A seguir foi adicionado (50  $\mu$ L/poço) o anticorpo de detecção biotilado (50  $\mu$ g/ mL) e prosseguiu com o período de incubação por 1 hora a 20°C e nova lavagem das placas, seguido pela fase de incubação por 1 hora a 20°C (50  $\mu$ L/poço) com a mistura neutravidina “horseradishperoxidase” (HRP) diluído no tampão 2 (soro fetal bovino 2% em PBS).

Após a última lavagem, foi adicionado o substrato (K-Blue<sup>®</sup>) (50 mL/poço) para o desenvolvimento da reação colorimétrica (aproximadamente 5 a 30 minutos), a qual foi interrompida pela adição de 50  $\mu$ L/poço de  $H_2SO_4$  (0,19 M). Foi realizada a leitura das placas em um espectrofotômetro a um comprimento de onda de 450 nm. A quantificação das citocinas foi feita por um técnico em parceria com o laboratório de inflamação do Instituto Oswaldo Cruz.

### 3.10. TITULAÇÃO DE VÍRUS

O ensaio de titulação viral foi feito para quantificar os vírus nos pulmões medindo-se a quantidade de PFU (Unidades formadoras de Placa). Para isso, preparam-se placas de 12 poços com  $5 \times 10^5$  células de MDCK por poço, na presença de DMEM + 10% de Soro Fetal Bovino. No dia seguinte foi realizado o procedimento de titulação viral, começando pela lavagem dos poços (duas vezes cada poço), para retirada da solução de DMEM com soro.

Os pulmões usados para a titulação foram pesados, e macerados em 3ml de PBS estéril, com homogeneizador de tecidos e em seguida centrifugados. O sobrenadante foi recolhido e utilizado para a titulação. As amostras de pulmões processados foram diluídas, adicionando em 200 $\mu$ l do meio DMEM em poços controle (*mock*) e 200  $\mu$ l do vírus diluído em cada poço. Foram feitas 3 a 4 diluições por amostra. Em seguida, as placas foram incubadas na estufa a 37°C e 5% de  $CO_2$  por uma hora para adsorção viral, e em seguida foi adicionada a uma solução contendo agarose a 1% com Tripsina TPCK (1 $\mu$ g/mL), BSA 1% em DMEM. As placas foram incubadas por 72 horas na estufa a 37°C e 5% de  $CO_2$ . Ao término desses três dias, a agarose foi retirada e a placa foi corada e fixada com cristal violeta em formol, seguida da contagem de placas.

Para que calcular o número de PFU (Unidades formadoras de Placa) no pulmão, foi realizado o seguinte cálculo: Diluição x 5 x Número de Placas/Peso do Pulmão. Os resultados são expressos em PFU/g de tecido. A diluição é escolhida a partir da contagem de PFU por poço que tenha quantia entre 3 a 30 placas.

### **3.11.ISOLAMENTO VIRAL**

Com objetivo de recuperar os vírus presentes nos pulmões dos animais infectados, foi realizado um protocolo de isolamento viral. Para isso, foram preparadas monocamadas de células MDCK em placas de 24 poços com  $2 \times 10^5$  células por poço. No dia seguinte, após a observação da confluência e da ausência de contaminação, a monocamada de células foi lavada duas vezes com meio de inoculação (DMEM, antibióticos, BSA 0,3%, HEPES 1M) sem tripsina. Os pulmões processados em PBS (como descrito acima) ou apenas PBS (controle negativo ou *mock*) foram adicionados aos poços (100ul por poço) com mais 200ul de meio de inoculação e incubados na estufa por 40 a 60 minutos a 37°C para adsorção viral. Em seguida, foram retiradas as amostras e sobre cada poço foi adicionado 500ul do meio de inoculação com tripsina TPCK (2µg/mL) e as placas foram incubadas novamente. Nos dias seguintes, foram feitas observações para acompanhar o efeito citopático. Após três dias, as placas foram congeladas. Para a confirmação da presença do vírus, foi feita a reação de hemaglutinação, descrita mais à frente.

### **3.12.QUANTIFICAÇÃO VIRAL POR ELISA**

Este experimento trata-se de um ELISA (Sino Biological©) do tipo sanduíche, onde foi utilizado um anticorpo primário de captura específico para a HA do vírus PR8, um ligante (peroxidase), um anticorpo secundário de detecção também específico para um segundo epítipo de HA e depois a adição do substrato, que em reação com o ligante desenvolve uma cor, medida por absorbância. A partir desse experimento, é possível quantificar a presença de HA de PR8 na amostra, levando em consideração os valores de absorbância da curva padrão. O anticorpo de captura, diluído em PBS, foi plaqueado em microplaca de 96 poços (NUNC©) que em seguida dói incubada durante a noite a 4°C. No dia seguinte cada poço foi aspirado e lavado com 3 vezes 250ul de tampão de lavagem. Após, foi adicionado a placa 200 µL de tampão de bloqueio (2% de BSA em tampão de lavagem) a cada poço, incubando à temperatura ambiente por no mínimo 1 hora. Após um novo ciclo de lavagem, as amostras são plaqueadas, e incubadas por duas horas a temperatura ambiente. Em seguida, após um novo

ciclo de lavagem, o anticorpo de detecção é incubado por 1 hora. Por fim, uma nova lavagem, e o substrato (ENHANCED K-BLUE©) é incubado por 10 a 15 minutos em temperatura ambiente protegido da luz. A solução de parada (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1M) é utilizada para interromper a reação. Para determinar a densidade óptica de cada poço imediatamente, é usando um leitor de microplacas ajustado para 450 nm.

### **3.13. ENSAIO DE HEMAGLUTINAÇÃO**

Este ensaio teve como objetivo analisar se há a presença ou não de vírus influenza nas amostras após o ensaio de isolamento viral, devido à capacidade do vírus em hemaglutinar hemácias. Foi adicionado PBS em cada poço da placa de 96 poços com fundo em U, e após, as amostras, controle positivo (vírus PR8) e negativo (PBS) nos primeiros orifícios. Sendo assim, foi feita uma diluição seriada das amostras diluídas em PBS de 1:2, descartando o volume de 50µl dos últimos poços, em seguida as hemácias advindas do sangue de cobaio (a 0,75% em PBS) são adicionadas em todos os orifícios e após mais ou menos trinta minutos os resultados quanto à presença ou ausência de hemaglutinação são avaliados. Quanto maior a diluição em que se vê hemaglutinação, maior a quantidade de vírus.

### **3.14. ENSAIO DE ATIVIDADE DE NEURAMINIDASE**

O ensaio NA-Star analisa a atividade da proteína de superfície neuraminidase (NA) dos vírus influenza, através da incubação de uma amostra viral com um substrato quimioluminescente da NA. Sendo assim, neste ensaio foram utilizados vírus influenza isolados dos pulmões dos camundongos, vírus controle, o vírus A/PR/8/34 utilizado para infectar os animais, o vírus A/Perth/261/2009, resistente e o vírus A/Perth/265/2009, sensível ao carboxilato de Oseltamivir, que foram diluídos de forma seriada na placa com tampão do Kit NA-Star, em duplicata. Após, foi adicionado em cada poço, o substrato (derivado de ácido siálico) diluído no tampão e homogeneizado. Depois da placa ser agitada por 15 segundos e incubada por 15 minutos, foi adicionado o acelerador em cada poço, seguindo a mesma ordem de administração e intervalo de tempo em que o substrato adicionado e após, feita a leitura através do luminômetro. Esta quantificação foi determinada de acordo com os valores de RLU (unidades relativas de luminescência), gerados no ensaio com cada vírus analisado. Ao final foram feitas análises das curvas, para a determinação da diluição a ser usada no ensaio de inibição de NA.

### **3.15. ENSAIO DE INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DA NEURAMINIDASE**

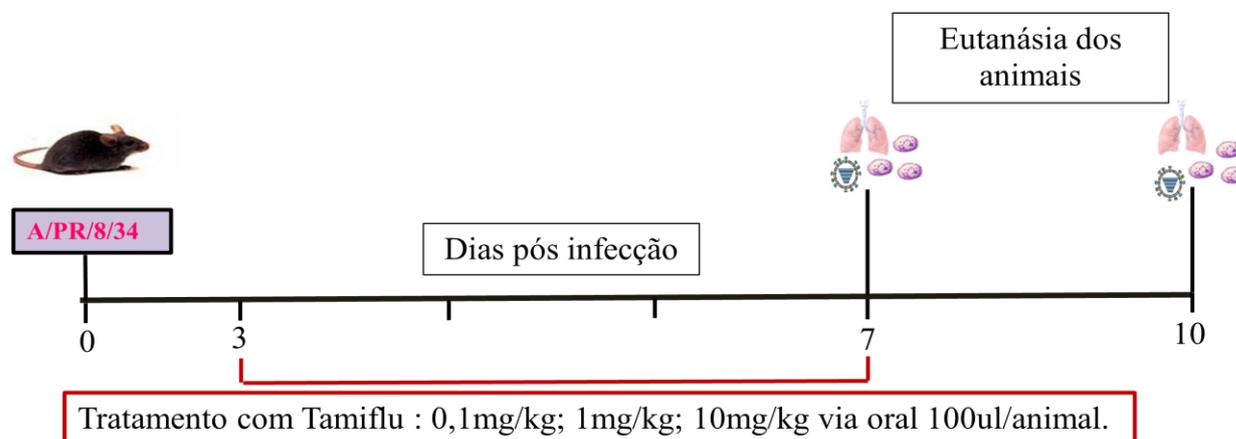
O ensaio foi feito para determinar a concentração inibitória de 50% da atividade enzimática (IC<sub>50</sub>) do Carboxilato de Oseltamivir necessária para inibir a atividade da NA do vírus Influenza. Os isolados e vírus controle diluídos de acordo com os resultados do teste de atividade da NA foram plaqueados na presença de concentrações de 0,01 nM a 1000 nM do Carboxilato de Oseltamivir, incubados por 15 minutos e depois foi adicionado o substrato do kit NA-Star seguido de mais uma incubação por 15 minutos. Por fim, foi adicionado o acelerador e feita a leitura no luminômetro. Ao final, foram feitas as análises para a determinação da IC<sub>50</sub> do antiviral.

### **3.16. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

As análises estatísticas e gráficos foram feitos no programa Graph Pad Prism 5.0. A análise de curvas letalidade foi feita pelo teste de Log-rank. Análises entre diferentes grupos nos parâmetros inflamatórios e virais foram feitas através de análise One-way ANOVA com pós-teste de Newman-Keuls entre os grupos em caso de variâncias iguais ou teste de Kruskal-Wallis com pós-teste de Dunns, em caso de variâncias diferentes. Resultados com  $p < 0,05$  foram considerados diferentes e foram representados com o símbolo \* comparando ao grupo *mock* ou ao grupo indicado pela barra abaixo e com o símbolo # comparando ao grupo veículo.

## 4.RESULTADOS

### 4.1 Análise do efeito de Tamiflu® durante a infecção por Influenza A/PR/8/34 em camundongos



**Figura 4.6:** Esquema do desenho experimental-protocolo 1 para determinação da dose-resposta de Tamiflu® eficaz na infecção de camundongos por Influenza A/PR/8/34 durante 7 e 10 dias de infecção. Infecção no dia 0 com inóculo 1000 PFU, tratamento com Tamiflu iniciado n 3º dia de infecção até o 7º dia, nas doses de 0,1 ,1 e 10mg/kg (100ul/animal). Os animais foram mortos após 7 e 10 de infecção para análise do material biológico (lavado broncoalveolar e pulmões).

Visando avaliar se diferentes doses de Tamiflu® afetariam a proteção contra Influenza A/PR/8/34 assim como o surgimento de vírus mutantes, camundongos foram tratados com as doses de 0,1, 1 e 10mg/kg, ou com o veículo após 3 dias de infecção. Foram avaliadas a letalidade e a perda de peso após a infecção com o inóculo de 1000 PFU do vírus PR8, capaz de causar cerca de 50% de letalidade, na presença ou ausência de diferentes doses de Tamiflu®. Ao todo foram utilizados 38 animais para realização do experimento, distribuídos entre os diferentes grupos. Após a infecção com vírus influenza, ocorreu uma intensa perda de peso, até o oitavo dia de infecção, com recuperação do peso em seguida (Fig.4.7.A). O grupo tratado com 10mg/kg de Tamiflu® mostrou uma recuperação mais rápida e teve menor porcentagem de perda de peso, em relação ao grupo veículo (Fig.4.7.A). Foi possível observar maior número de mortes no grupo veículo e maior sobrevivência no grupo tratado com 10mg/kg de Tamiflu®, sendo essa a dose recomendada pela literatura (Fig. 4.7.B). A dose de 1mg/kg levou a uma proteção parcial da letalidade, porém não foi estatisticamente significativa em relação ao grupo infectado não tratado. Nos grupos infectados foi possível perceber, no sétimo dia de infecção, uma quantidade grande de infiltrado de neutrófilos nas vias aéreas em relação ao grupo não infectado (*mock*), enquanto no grupo tratado com Tamiflu® (10mg/kg), a

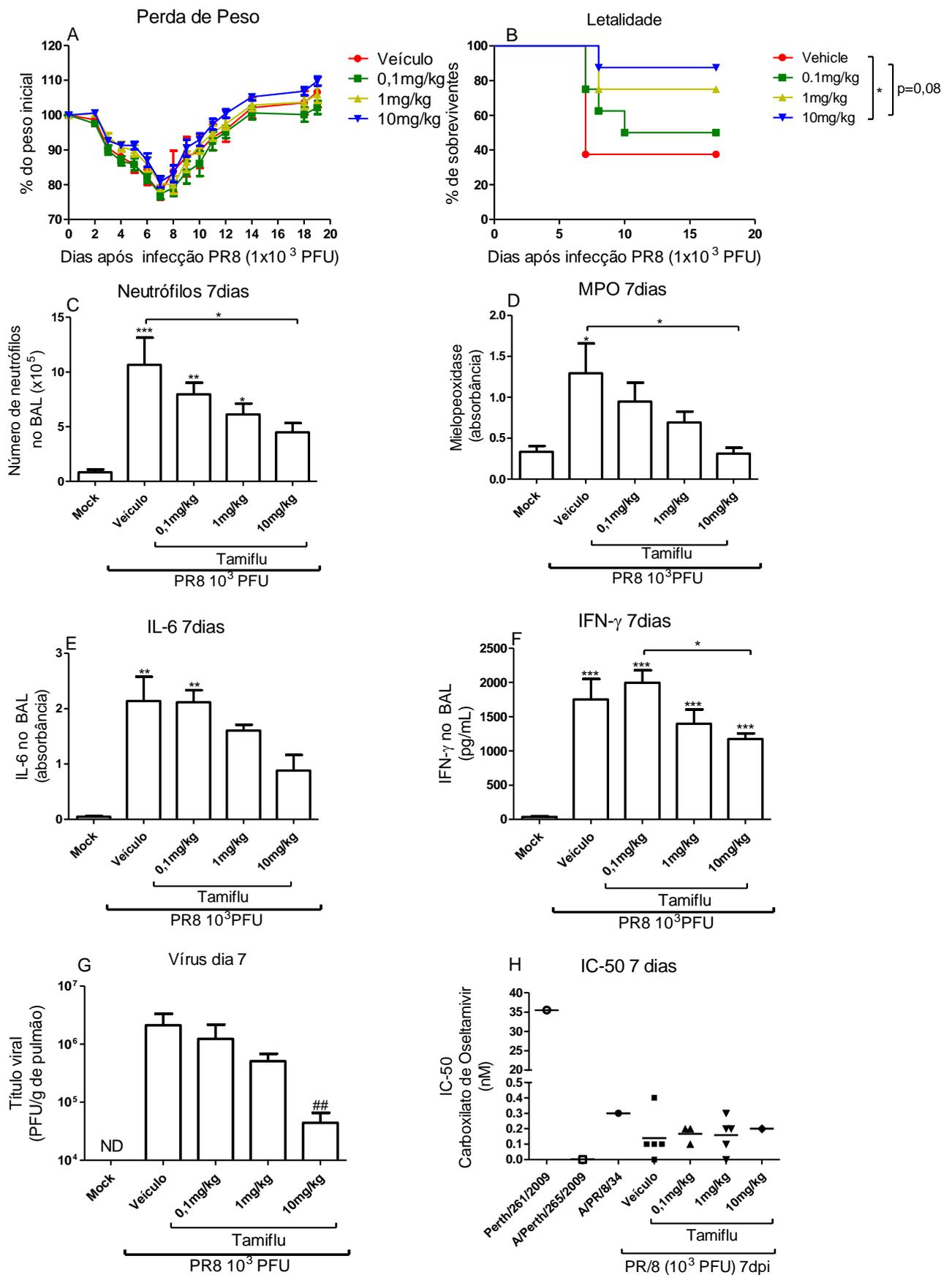
presença de neutrófilos foi menor. Nos outros grupos, que receberam tratamento com o antiviral, houve uma tendência à redução do número de neutrófilos, embora não significativa (Fig.4.7.C).

A partir da quantificação indireta de neutrófilos nos pulmões pela medida da MPO, no grupo tratado com o veículo foi observado um aumento no número de neutrófilos no tecido pulmonar, em comparação ao grupo *mock*. O tratamento com Tamiflu® (10mg/kg) reduziu a atividade de MPO em comparação ao grupo veículo. Os grupos tratados com 0,1 e 1mg/kg de Tamiflu® não apresentaram aumento significativo na atividade de MPO em relação ao grupo *Mock* (Fig.4.7.D).

A avaliação de mediadores inflamatórios por ELISA mostrou que a citocina IL-6, apresentou níveis aumentados em relação àqueles do grupo *Mock*, apenas na condição de tratamento com o veículo e com a dose de 0,1mg/kg de Tamiflu® (Fig.4.7.E). Já a citocina IFN- $\gamma$  mostrou níveis aumentados em todos os grupos infectados, sendo possível ver redução estatisticamente significativa no grupo tratado com Tamiflu®10mg/kg. em relação ao grupo tratado com a dose de 0,1mg/kg. Os demais grupos não apresentaram diferença estatística (Fig.4.7.F).

O ensaio de titulação viral foi feito para quantificar os vírus nos pulmões, medindo-se a quantidade de PFU (Unidades formadoras de Placa) em monocamadas de células MDCK. De acordo com o esperado, no grupo *mock* não foi detectada a presença de vírus, diferente dos grupos infectados, sete dias após a infecção. Apenas o grupo tratado com Tamiflu® na dose de 10mg/kg, apresentou uma redução significativa na carga viral comparado com aquela do grupo veículo (Fig.4.7.G). Após 10 dias de infecção, não foi detectado vírus em nenhum grupo (dados não mostrados).

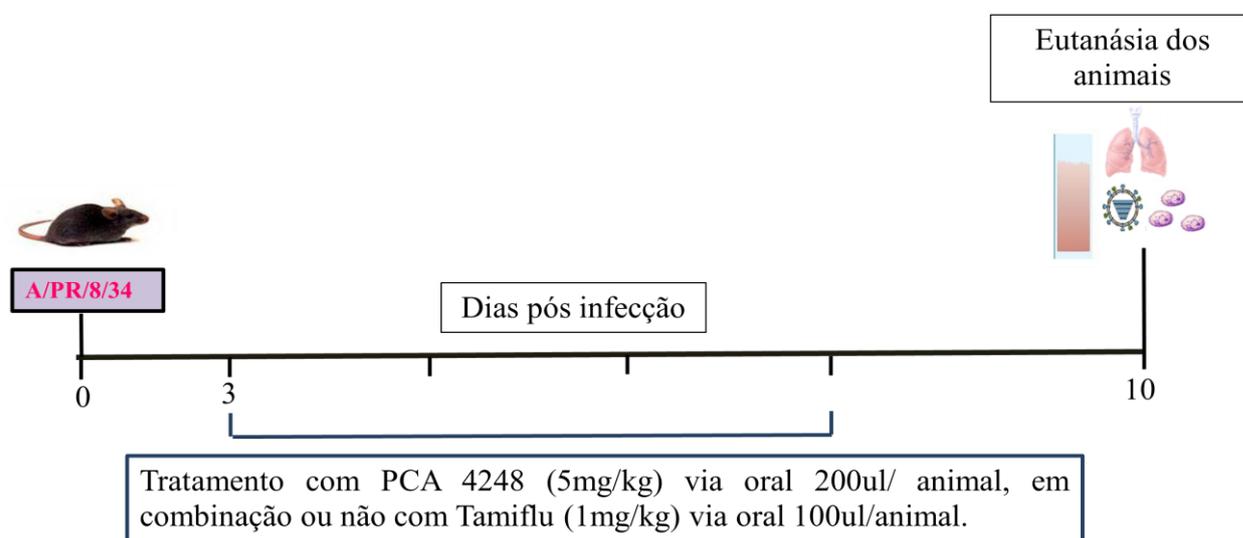
A partir dos macerados dos pulmões dos animais infetados e tratados com as diferentes doses de Tamiflu®, foram isolados vírus de amostras para o teste de atividade de NA. Através da medida da concentração inibitória de 50% do Carboxilato de Oseltamivir necessária para inibir a atividade enzimática de NA (IC50) do vírus Influenza, foi constatado que não houve uma redução na sensibilidade ao antiviral ao se reduzir a dose de Tamiflu® durante a infecção, comparando os isolados com o vírus resistente A/Perth/261/2009 e com os vírus susceptíveis A/Perth/265/2009 e PR8 (Fig.4.7.H).



**Figura 4.7.** Efeito de diferentes doses de Tamiflu® durante a infecção por Influenza A/PR/8/34. Durante 21 dias de infecção foi feita uma análise de perda de peso e letalidade de camundongos infectados por vírus influenza A/PR/8/34 H1N1 (PR8) e tratados com doses de 0,1, 1 e 10mg/kg de

Tamiflu®, do dia 3 ao dia 7 pós infecção (A e B). Número de neutrófilos (C), níveis de IL-6 e IFN- $\gamma$  na BAL (E e F). Atividade da enzima MPO no tecido pulmonar (D). Titulação do vírus por placas de lise em células MDCK (G). Concentração inibitória de Carboxilato de Oseltamivir para 50% dos vírus isolados nos diferentes animais (IC-50). Vírus controles para comparação: A/PR/8/34 utilizado para infectar os animais, o vírus A/Perth/261/2009, resistente ao Tamiflu® (H275Y) e o vírus A/Perth/265/2009, suscetível ao antiviral (WT) (H). Resultados com  $p < 0,05$  foram considerados diferentes e foram representados com o símbolo \* comparando ao grupo *Mock* ou ao grupo indicado pela barra abaixo e com o símbolo # comparando ao grupo veículo.

#### 4.2. Análise dos efeitos da imunomodulação por PCA4248 no surgimento de vírus resistentes

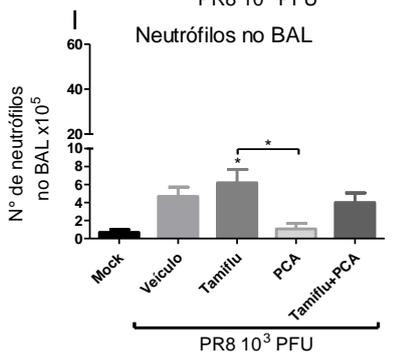
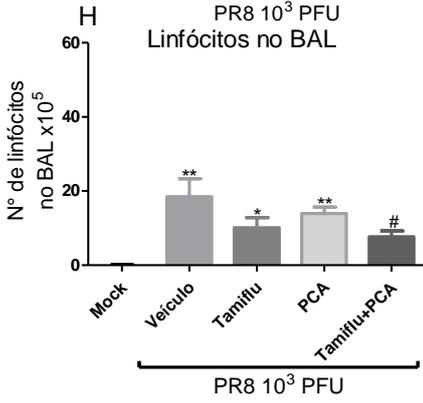
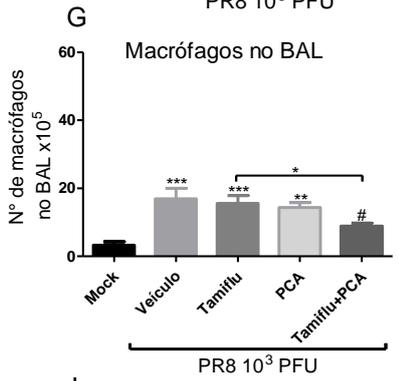
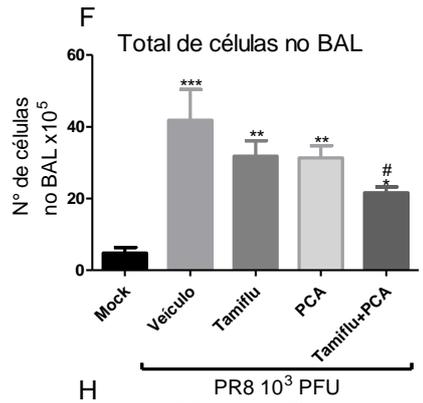
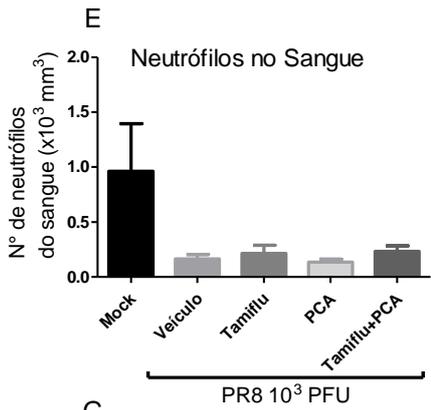
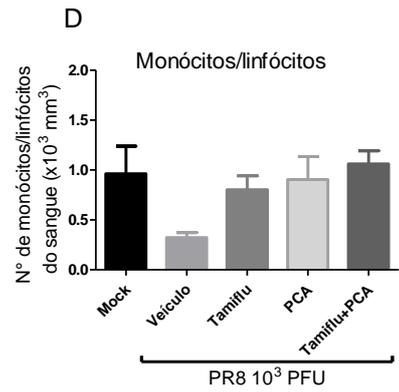
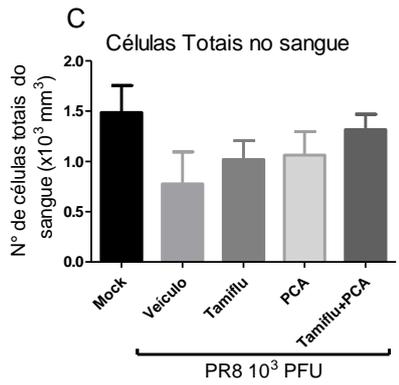
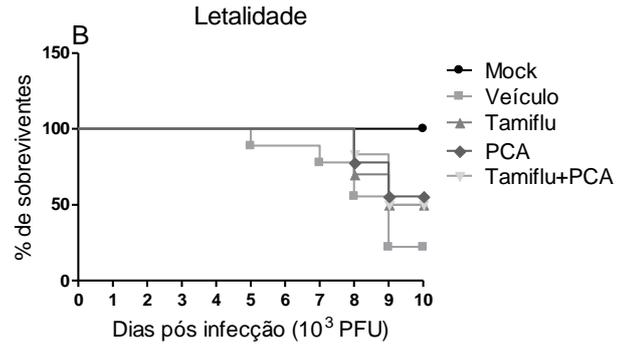
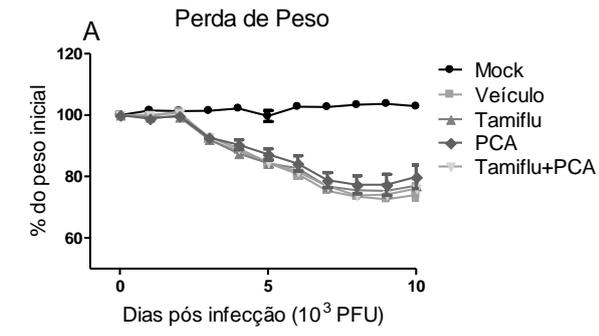


**Figura 4.8:** Esquema experimental do tratamento com o imunomodulador PCA4248 no surgimento de vírus resistente ao Tamiflu®. Camundongos C56/BL6 infectados por influenza com um inóculo de 1000 PFU, tratados com PCA 4248, iniciando no dia 3º dia de infecção até o 7º dia por via oral em combinação ou não com Tamiflu na dose de 1mg/kg. Os animais foram mortos após 10 dias para análise de sangue, lavado broncoalveolar e pulmões.

Com base nos estudos realizados com o antagonista PCA4248 (83), camundongos C57/BL6 foram infectados com vírus influenza A/PR/8/34, e três dias depois da infecção, quando há o fluxo maior de neutrófilos devido à inflamação, alguns grupos foram tratados com o composto, duas vezes ao dia, via oral, em combinação ou não com Tamiflu® (1mg/kg), até o sétimo dia de infecção. A proposta deste experimento era ver se uma imunomodulação poderia favorecer ao surgimento de vírus resistente, por isso foi realizado no décimo dia de

infecção. Foi possível observar que o tratamento com PCA4248 proporcionou uma melhora quanto às taxas de letalidades em relação ao grupo veículo, de maneira similar ao tratamento somente com Tamiflu® ou em combinação com PCA4248 (Fig.4.9.B). Em relação à perda de peso, não houve diferenças entre os grupos infectados com os diferentes tratamentos (Fig. 4.9.A). Na contagem de células no sangue após dez dias de infecção, não foi observada diferença estatística entre os grupos infectado sem relação às células totais, monócitos e linfócitos e neutrófilos no sangue (Fig.4.9.C, D e E).

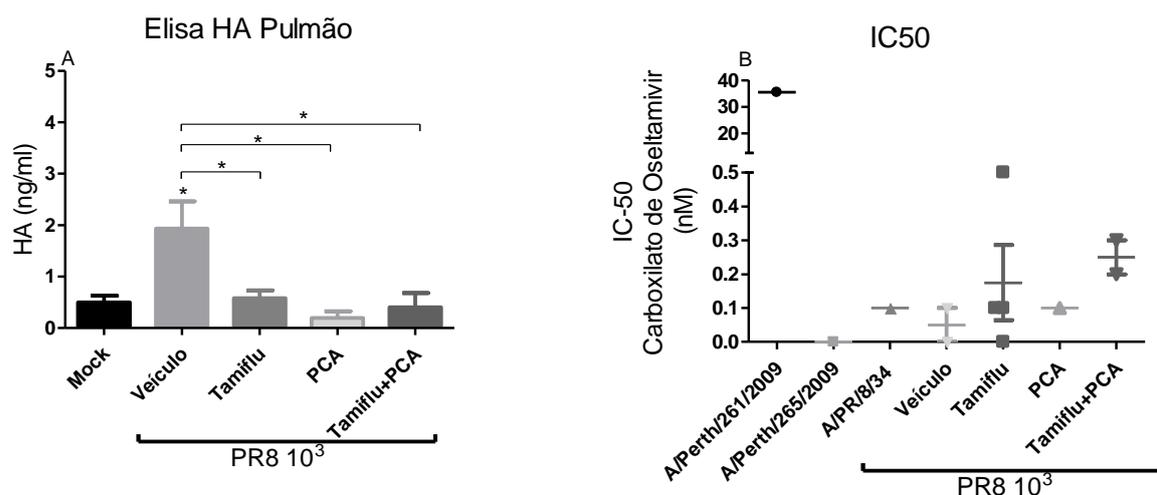
O tratamento com PCA4248 e em combinação com antiviral Tamiflu®, apresentou redução estatística no número de macrófagos em relação ao do grupo tratado somente com Tamiflu®(Fig.4.9.G). Quanto aos neutrófilos, foi vista uma redução nos grupos infectados e tratados com PCA4248 em relação ao grupo Tamiflu®(Fig.4.9.I). Em comparação ao veículo, o tratamento com o antiviral, em combinação com PCA4248, favoreceu a redução de células totais no BAL (Fig.4.9.F). Quanto à presença de linfócitos no lavado broncoalveolar, o grupo tratado com tratamento combinatório de Tamiflu® e PCA4248 apresentou redução em relação ao grupo veículo (Fig.4.9.H).



**Figura 4.9.** Efeito do tratamento combinado de PCA4248 e Tamiflu® na infecção por influenza. Monitoramento de perda de peso durante 10 dias de infecção por influenza A/PR/8/38 (A) em camundongos C57/BL6. Sobrevida dos animais infectados tratados e controles negativo (*Mock*) e positivo (veículo) para infecção (B). Contagem de células totais, monócitos/linfócitos e neutrófilos em lâminas de esfregaço sanguíneo coradas em May-Grumald-Giemsa (C, D e E). Contagem de células totais, macrófagos, linfócitos e neutrófilos nas vias aéreas dos camundongos (F,G, H e I). Resultados com  $p < 0,05$  foram considerados diferentes e foram representados com o símbolo \* comparando ao grupo *mock* ou ao grupo indicado pela barra abaixo e com o símbolo # comparando ao grupo veículo.

No ensaio de ELISA para quantificação da proteína viral HA, observamos que houve aumento na detecção da proteína viral no grupo veículo. Os grupos que receberam tratamento com Tamiflu®, PCA4248 ou a combinação de ambos, apresentaram redução na detecção de vírus no décimo dia de infecção em relação ao grupo veículo (Fig.4.10.A). Não foi possível detectar os vírus por PFU.

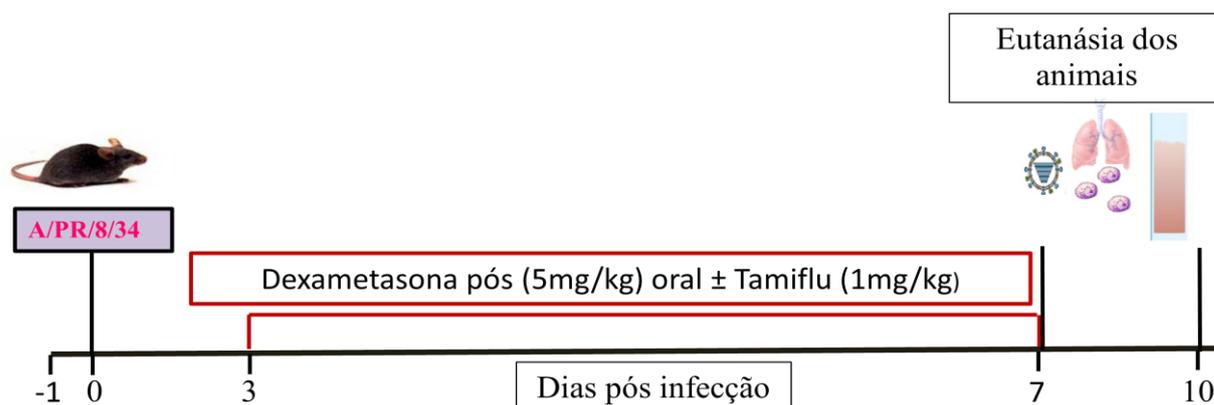
Foram isolados em células MDCK vírus de duas amostras de animais infectados com o vírus e tratado com o veículo, uma PCA4248, quatro com Tamiflu® e duas com Tamiflu® em combinação com PCA4248. Os isolados foram submetidos ao ensaio de suscetibilidade ao Carboxilato de Oseltamivir® e nenhum dos isolados mostrou redução de suscetibilidade composto (Fig.4.10.B).



**Figura 4.10.** Efeito do tratamento combinado de PCA4248 e Tamiflu® na infecção por influenza. Quantificação viral por ELISA, através da detecção da proteína de superfície do vírus hemaglutinina (HA) presente nos pulmões de cada animal, seguindo as instruções do Kit Sino Biological (A). Ensaio de inibição de NA(IC50) pelo Carboxilato de Oseltamivir. Vírus controles para comparação, além dos

isolados dos pulmões dos camundongos, são eles: A/PR/8/34 utilizado para infectar os animais, o vírus A/Perth/261/2009, resistente Tamiflu® (H275Y) e o vírus A/Perth/265/2009, suscetível ao antiviral (WT) (B). Resultados com  $p < 0,05$  foram considerados diferentes e foram representados com o símbolo \* comparando ao grupo *mock* ou ao grupo indicado pela barra abaixo.

#### 4.3. Efeito do tratamento imunossupressor por Dexametasona durante 7 e 10 dias de infecção por Influenza A/PR/8/34



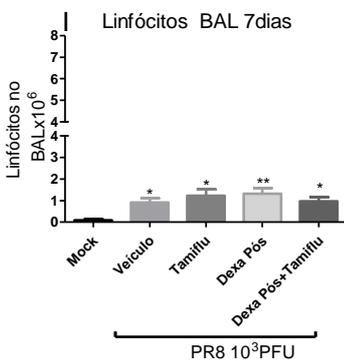
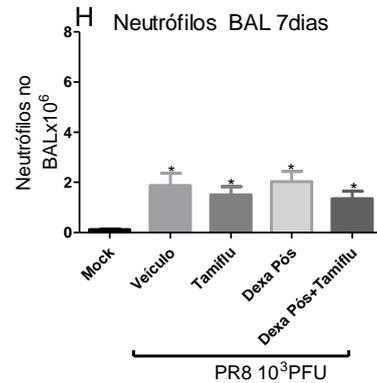
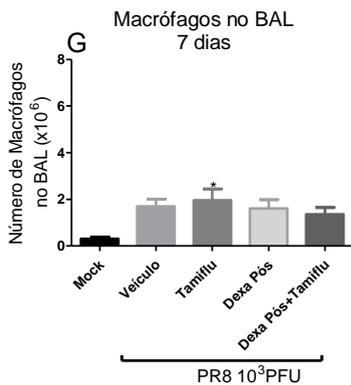
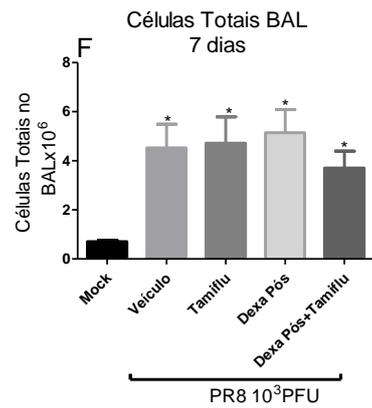
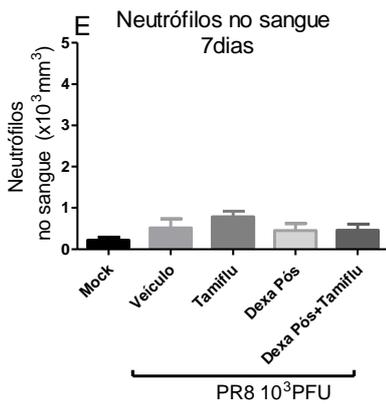
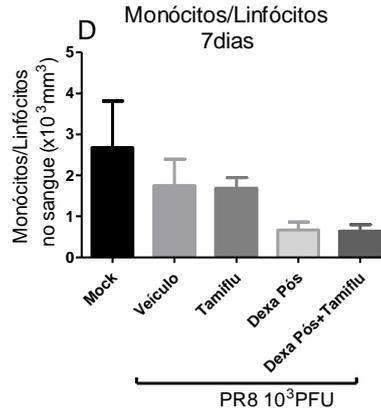
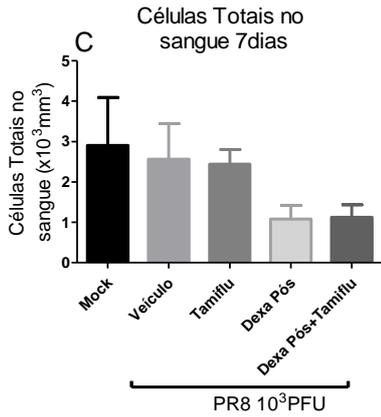
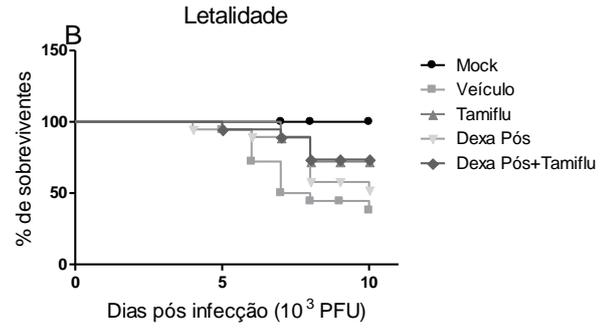
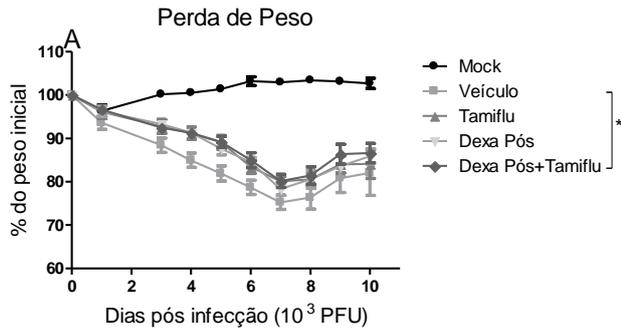
**Figura 4.11:** Esquema do desenho experimental da imunossupressão por Dexametasona durante 7 e 10 dias de infecção por influenza A/PR/34. Camundongos C56/BL6 infectados por influenza no dia 0 com inóculo de 1000 PFU. Tratamento com Dexametasona iniciado ao 3º dia de infecção até o 7º dia na dose de 5mg/kg via oral em combinação ou não com Tamiflu, na dose de 1mg/kg. Os animais foram mortos após 7 e 10 dias de infecção para análise de sangue, lavado broncoalveolar e pulmões.

Visando avaliar o efeito da imunossupressão na imunopatologia e na emergência de vírus resistentes ao Tamiflu®, foi realizado um protocolo de tratamento com o corticóide DEXA (5mg/kg) em combinação ou não com o antiviral. O tratamento foi feito nos dias 3, 4, 5 e 6 pós-infecção, e as análises foram feitas em 7 e 10 dias de infecção para o primeiro e o segundo experimentos, respectivamente. O tratamento com DEXA pós-infecção, em combinação com Tamiflu®, promoveu uma recuperação de peso mais rápida, além reduzir a taxa de letalidade aos camundongos infectados, em comparação ao grupo veículo e aos demais grupos (Fig.4.12. A e B). Os demais grupos não apresentaram diferenças significativas.

Apesar da aparente redução no número de leucócitos totais, monócitos e linfócitos no sangue periférico de animais infectados e tratados com DEXA, com ou sem Tamiflu®, não

houve diferença estatística entre os grupos infectados, igualmente na contagem de neutrófilos (Fig.4.12. C, D e E).

A partir da contagem de leucócitos no BAL, pode-se ver a intensidade da resposta inflamatória de acordo com o tratamento recebido por cada grupo. Após sete dias de infecção foi possível observar um aumento de infiltrado de leucócitos em relação ao grupo *mock* (Fig. 12.4. F). Ao se observar os diferentes tipos de tratamento, somente o grupo tratado com Tamiflu®, houve um aumento no número de macrófagos em relação ao grupo *mock* (Fig.4.12.G); já em relação ao recrutamento de neutrófilos, nenhum dos grupos infectados apresentou diferença estatística em comparação ao grupo veículo, somente em relação ao grupo não infectado (*mock*) (Fig.4.12.H). Na contagem de linfócitos, o grupo infectado e tratado dois dias depois da infecção com o imunossupressor DEXA, apresentou um aumento infiltrado de neutrófilos em relação ao grupo não infectado (*mock*) (Fig.4.12. I).

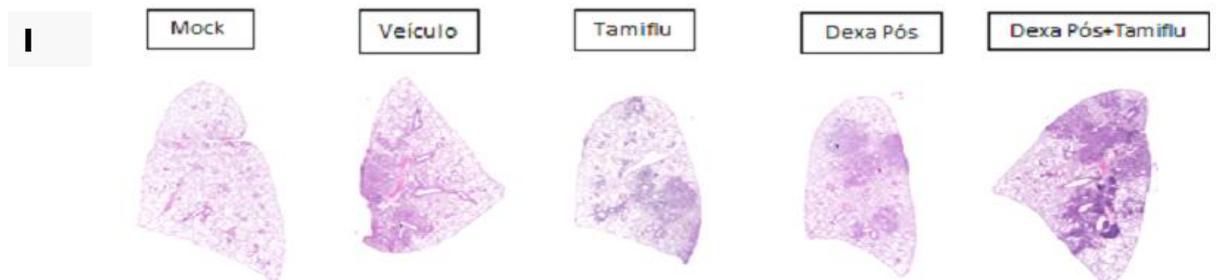
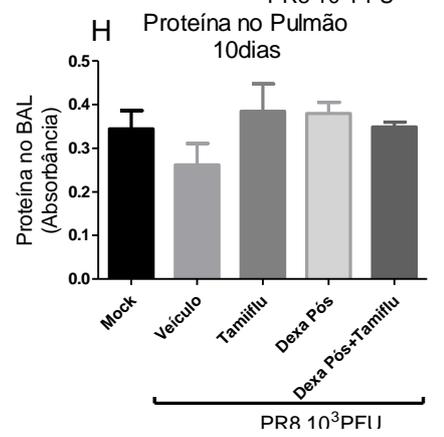
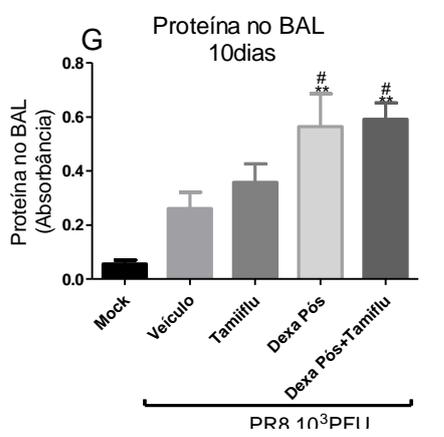
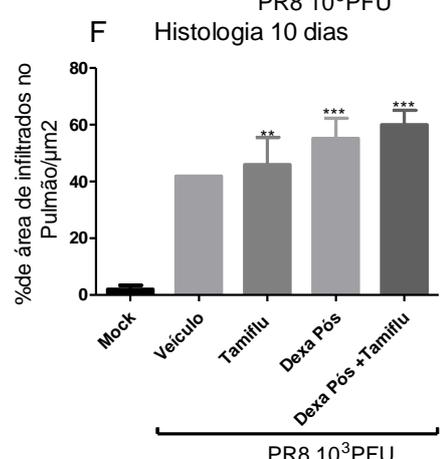
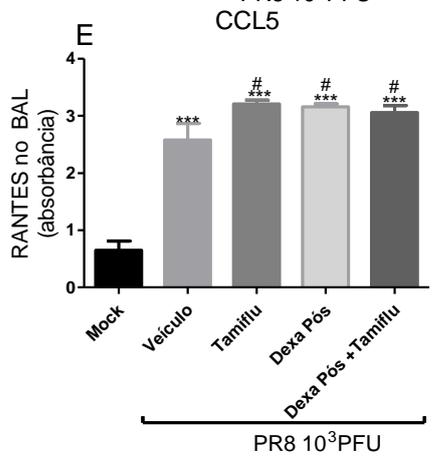
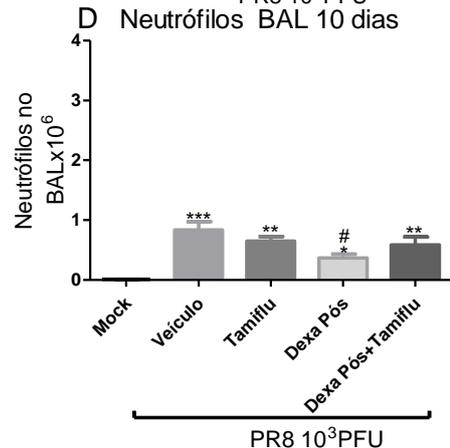
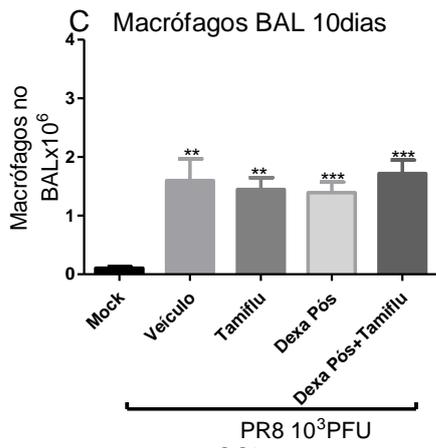
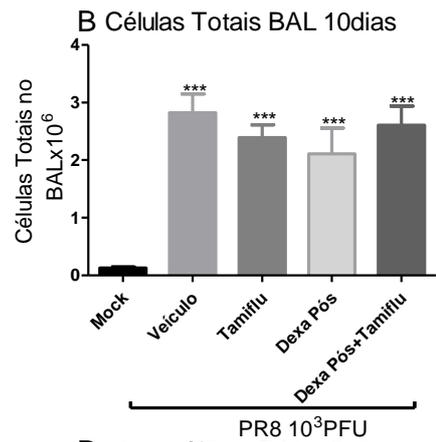
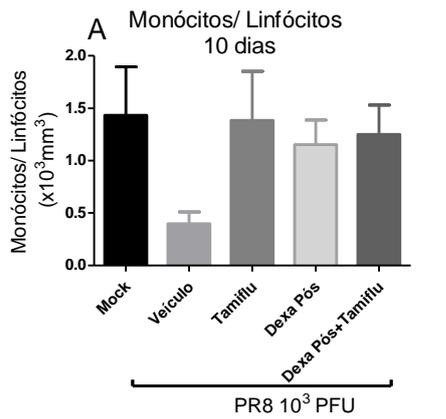


**Figura 4.12.** Efeito do tratamento com DEXA durante 7 dias de infecção por Influenza A/PR/8/34. Monitoramento de perda e letalidade de peso durante 10 dias de infecção por influenza A/PR/8/38 em camundongos C57/BL6 (A) (B). Contagem total das células presente no sangue e esfregaço para contagem de monócitos, linfócitos e neutrófilos, após 7 dias de infecção. (C, D e E). Contagem de células totais, macrófagos, neutrófilos e linfócitos nas vias aéreas dos camundongos, após 7 dias de infecção (F, G, H e I). Os gráficos são uma representação de dois experimentos de 9 a 10 animais por grupo. Resultados com  $p < 0,05$  foram considerados diferentes e foram representados com o símbolo \* comparando ao grupo *mock* ou ao grupo indicado pela barra abaixo.

A contagem de linfócitos e monócitos no sangue após dez dias de infecção não mostrou diferenças significativas entre os grupos (Fig.4.13. A), assim como a contagem total de neutrófilos (dados não mostrados). Na contagem de células feita a partir do lavado broncoalveolar, dez dias pós-infecção, foi possível ver que todos os grupos apresentaram um aumento significativo no recrutamento de leucócitos totais (Fig.4.13. B), macrófagos (Fig.4.13.C) e neutrófilos (Fig.4.13.D), mas não de linfócitos (dados não mostrados), em relação ao grupo *mock*. Em relação ao recrutamento de neutrófilos, o grupo tratado com DEXA, após a infecção, apresentou redução na contagem dessas células no BAL em comparação ao veículo (Fig.4.13.D). A análise das citocinas IL-6, IFN- $\gamma$  e da quimiocina CXCL1/KC mostrou níveis de detecção similares entre grupos infectados e reduzidos em relação aos não infectados (dado não mostrado). Já a quimiocina CCL5/RANTES mostrou-se elevada nos grupos Tamiflu®, DEXA e DEXA +Tamiflu®, em relação ao grupo *mock*, sendo que todos os grupos tratados apresentaram níveis mais elevados que o grupo veículo (Fig.4.13.E).

Na análise histológica dos pulmões, os grupos infectados e tratados com DEXA pós em combinação ou não com Tamiflu® e o grupo tratado somente com o antiviral, apresentaram um aumento no infiltrado leucocitário, em relação ao grupo não infectado (*mock*). O grupo infectado não tratado (veículo) ao final dos dias de infecção apresentou somente um animal do grupo, não sendo possível realizar o teste estatístico com este grupo. Não foi detectada diferença estatística em relação ao aumento ou redução dos infiltrados, entre os grupos infectados (Fig.4.13.F e I). Através da quantificação de proteínas no BAL foi visto que os grupos DEXA-pós e DEXA-pós combinada com Tamiflu®, mostraram um aumento na permeabilidade vascular a proteínas nas vias aéreas em relação ao grupo controle positivo (veículo) e negativo (*mock*), já em relação ao pulmão não houve diferença entre os

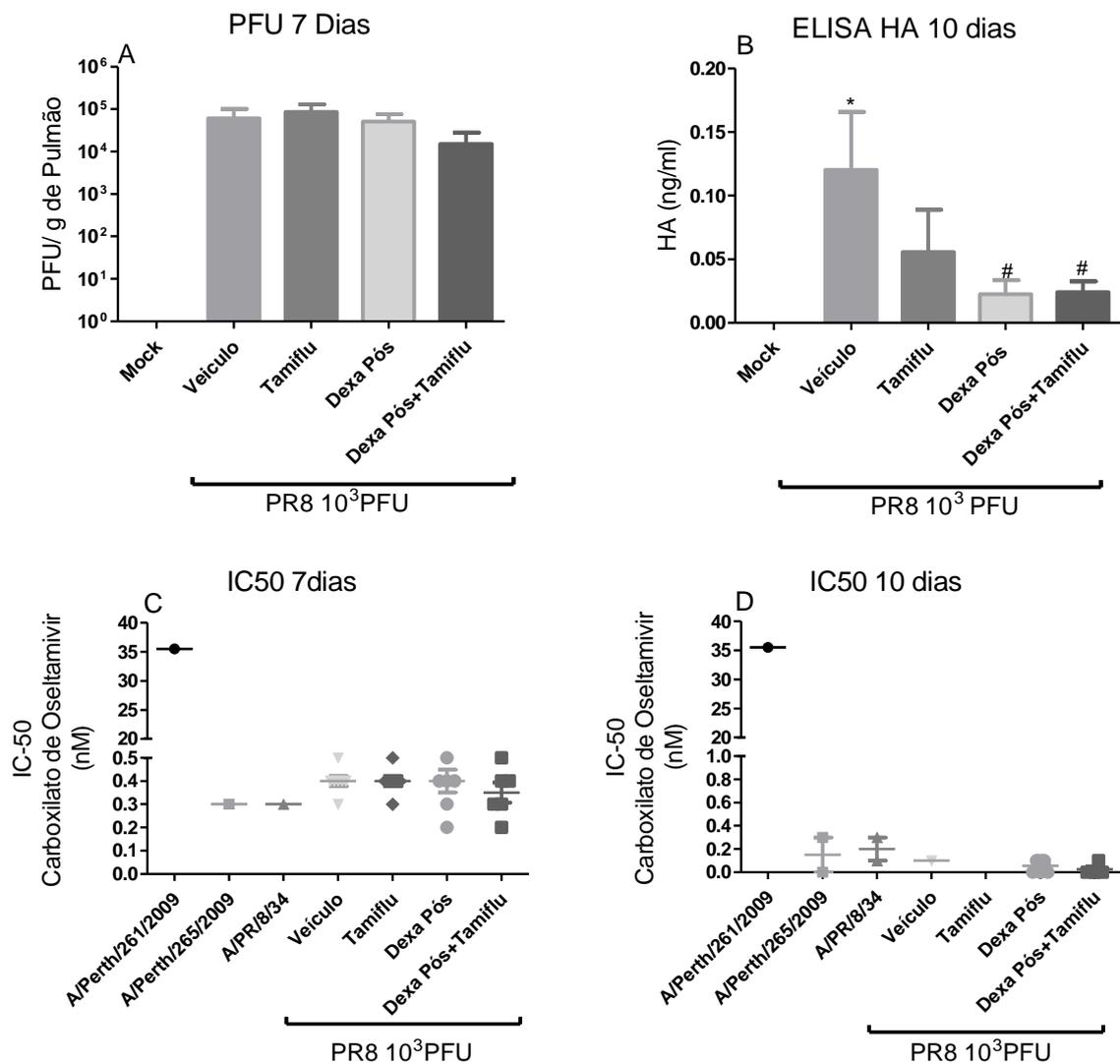
grupos, mostrando que os diversos tratamentos não influenciam quanto extravasamento de proteínas (Fig.4.13.G e H).



**Figura 4.13.** Efeito do tratamento imunossupressor por DEXA durante 10 dias de infecção por Influenza A/PR/8/34. Contagem total das células presente no sangue e esfregaço para contagem de monócitos, linfócitos após 10 dias de infecção (A). Contagem de células totais, macrófagos, neutrófilos e nas vias aéreas dos camundongos, após 10 dias de infecção (B, C e D). Quantificação por absorvância da quimiocina CCL5/RANTES (E). Análise histológica dos grupos infectados e não infectado (F e I). Quantificação de proteínas presentes no BAL e nos pulmões dos camundongos (G e H). Os gráficos são uma representação de dois experimentos de 9 a 10 animais por grupo. Resultados com  $p < 0,05$  foram considerados diferentes e foram representados com o símbolo \* comparando ao grupo *mock* e com o símbolo # comparando ao grupo veículo.

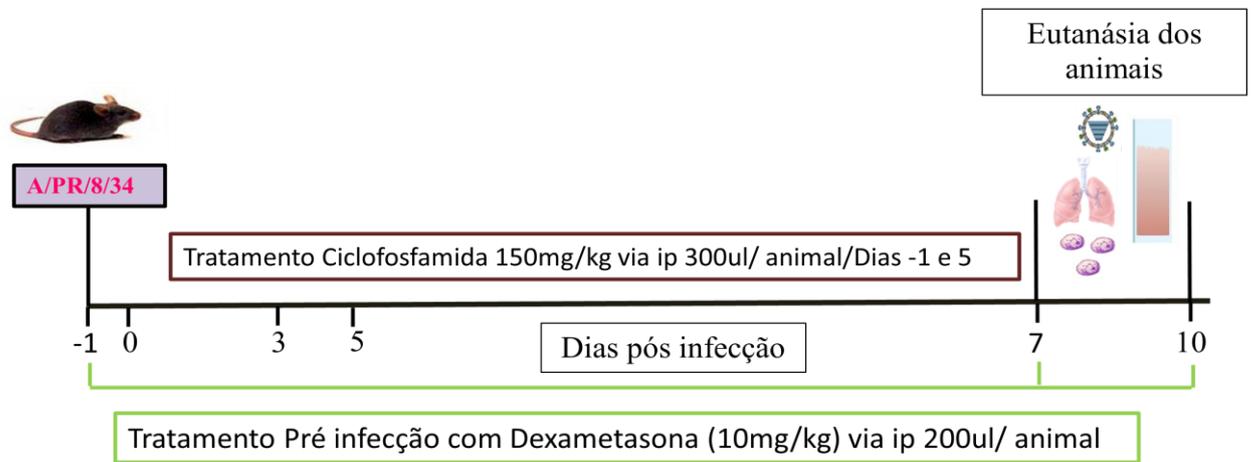
A partir das amostras dos pulmões dos camundongos infectados com o inóculo de 1000 PFU do vírus PR8, foi feita titulação viral por quantificação de placas de lise em uma monocamada de células MDCK. Não houve diferença estatística entre os grupos infectados após sete dias de infecção (Fig.4.14.A). Foi possível obter o isolamento de vírus dos pulmões de todos animais infectados após 7 dias de infecção. A eficácia do isolamento foi verificada através do ensaio de hemaglutinação com hemácias de cobaia a 0,75% diluídas em PBS (dado não mostrado). A partir desses isolados, seguimos para o ensaio de atividade de NA e de susceptibilidade ao Tamiflu®. Através deste ensaio, foi possível identificar a concentração do antiviral Tamiflu®, em que 50% dos vírus isolados são inibidos (IC-50). Sendo assim, foi constatado que não há aumento da resistência ao antiviral em decorrência do tratamento em combinação com o imunossupressor DEXA e dose subterapêutica de Tamiflu® (Fig.4.14.C).

Não foi possível detectar vírus nos pulmões após 10 dias de infecção por ensaio de placas, mas a partir do ensaio para quantificação da proteína HA por ELISA, a detecção foi possível. Os grupos tratados com DEXA-pós em combinação ou não com Tamiflu® mostraram uma redução nos títulos virais em relação ao grupo veículo (Fig.4.14. B), entretanto quando testados para avaliação de redução de susceptibilidade ao Carboxilato de Oseltamivir, nenhum dos isolados se mostrou resistente (Fig.4.14.D).



**Figura 4.14** Efeito do tratamento imunossupressor por DEXA durante 7 e 10 dias de infecção por Influenza A/PR/8/34. O ensaio de titulação viral para quantificar os vírus nos pulmões medindo-se a quantidade de PFU (Unidades formadoras de Placa) em células MDCK, após 7 dias de infecção (A). Quantificação da proteína HA por ensaio de ELISA nos pulmões de animais infectados, após 10 dias de infecção (B). Ensaio de inibição de NA foi feito para determinar a concentração inibitória de 50% da atividade enzimática (IC50) do Carboxilato de Oseltamivir necessária para inibir a atividade da NA dos vírus Influenza isolados após 7 (C) e 10 (D) dias. Neste ensaio foram utilizados vírus controles para comparação, além dos isolados dos pulmões dos camundongos, são eles: A/PR/8/34 utilizado para infectar os animais, o vírus A/Perth/261/2009, resistente ao Tamiflu® (H275Y) e o vírus A/Perth/265/2009, suscetível ao antiviral (WT). Resultados com  $p < 0,05$  foram considerados diferentes e foram representados com o símbolo \* comparando ao grupo *mock* e com o símbolo # comparando ao grupo veículo.

#### 4.4 Imunossupressão por DEXA e CICLO e seus efeitos quanto à persistência viral durante 7 e 10 dias de infecção



**Figura 4.15:** Esquema do desenho de indução de imunossupressão por DEXA e CICLO durante a infecção por Influenza. Camundongos C56/BL6 infectados por influenza no dia 0 com inóculo de 1000 PFU. Tratamento por Ciclofosfamida nos dias -1 e 5 pós infecção (150mg/kg, via ip) e Dexametasona (10mg/kg, via ip) iniciado do dia -1 até o 7º ou 10º dia de infecção. Os animais foram mortos após 7 e 10 dias para análise de sangue, lavado broncoalveolar e pulmões.

Em um novo protocolo imunossupressor, além de uma dose maior de DEXA (10mg/kg) desde o dia -1 ao dia 10 pós-infecção, foi adicionado o tratamento com o quimioterápico CICLO nos dia -1 e 5, com uma única dose nesses dias de 150mg/kg, conforme descrito por (71) para efetivamente proporcionar um ambiente favorável para maior permanência do vírus no organismo dos camundongos e assim, averiguar quanto ao surgimento de vírus resistente.

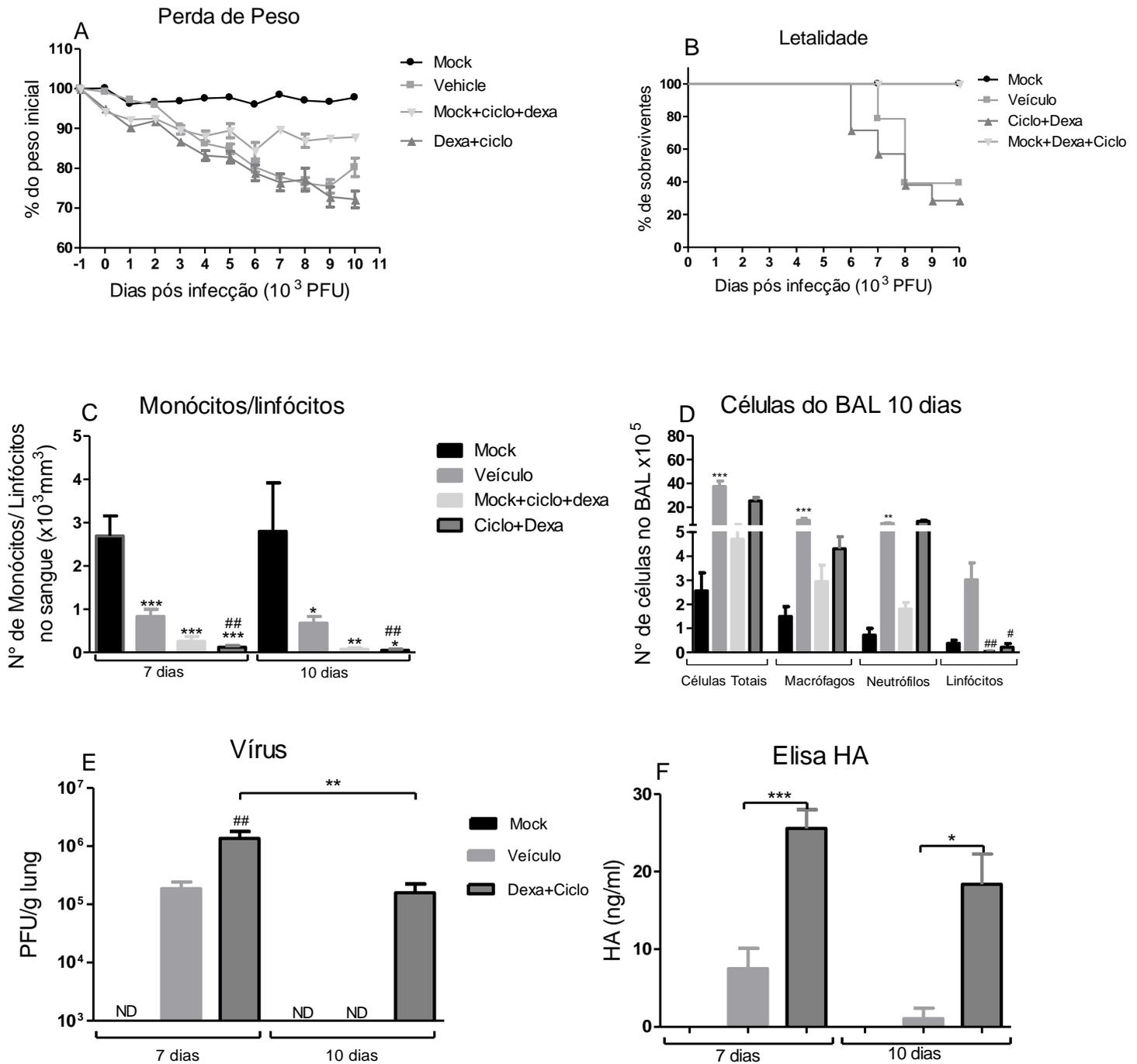
O tratamento por DEXA em combinação com CICLO nos animais infectados levou-os a uma grande perda de peso até o dia em que foram eutanasiados, sendo maior em relação ao grupo veículo, que neste mesmo período já apresentavam recuperação (Fig.4.16.A). Já quanto a letalidade, tanto o grupo veículo como o grupo tratado com DEXA e CICLO apresentaram um uma alta taxa de mortalidade (Fig.4.16.B).

Na contagem de leucócitos do sangue tanto após 7 dias e 10 dias da infecção, houve uma redução estatisticamente significativa no número de monócitos e linfócitos no sangue, devido à infecção (grupo Veículo) e devido ao tratamento imunossupressor tanto no grupo

infectado, como também no grupo não infectado em relação ao grupo *mock*. Em ambos os tempos avaliados, comparando-se o grupo Veículo com o grupo imunossuprimido infectado, observamos uma redução significativa ainda maior (Fig.4.16.C).

Na contagem de células do BAL, o tratamento imunossupressor influenciou na contagem de células totais, macrófagos e neutrófilos, mas levou principalmente à redução de linfócitos no BAL (Fig.4.16.D). Foi possível ver a persistência do vírus PR8 em animais tratados com DEXA e CICLO, até o 7º e 10º dia de infecção, sendo que no grupo veículo no 10º dia de infecção não é possível mais detectar o vírus, diferente do experimento de 7 dias, onde ainda foi possível ver a persistência do vírus no grupo veículo, porém em títulos menores que o grupo imunossuprimido (Fig.4.16.E).

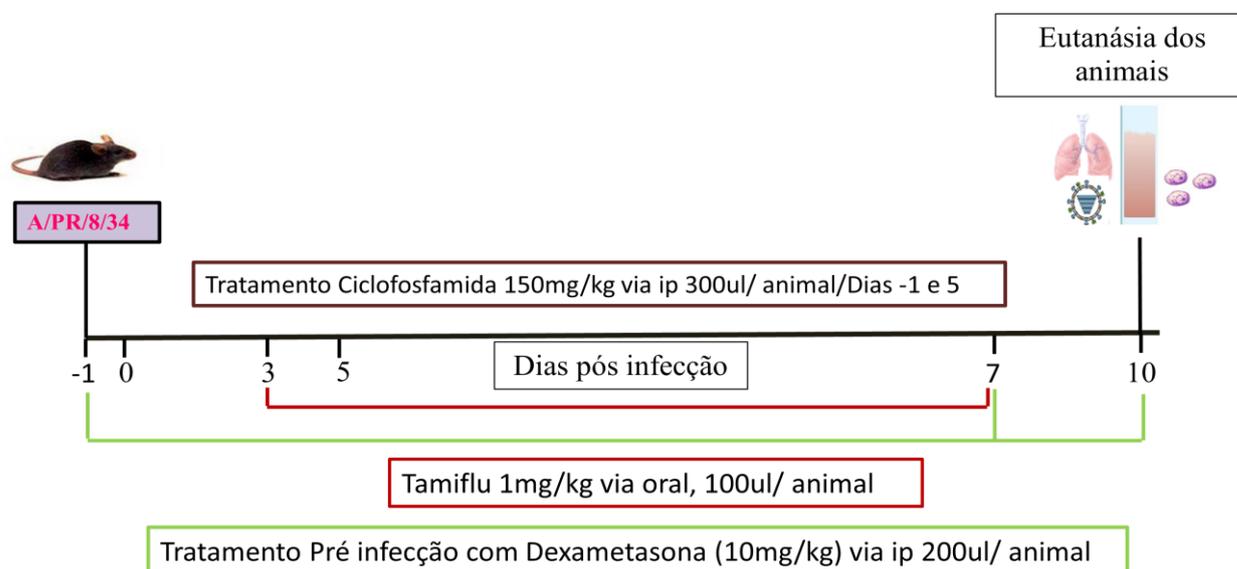
Através da quantificação da proteína de superfície hemaglutinina do vírus por ELISA, foi possível confirmar a persistência do vírus nos grupos tratados com DEXA e CICLO após 10 dias de infecção e os maiores níveis em relação ao veículo no sétimo dia de infecção (Fig. 4.16.F).



**Figura 4.16.** Imussupressão por DEXA e CICLO e seus efeitos na persistência viral durante 7 e 10 dias de infecção. Monitoramento de perda de peso durante 10 dias de infecção por influenza A/PR/8/38 (A) em camundongos C57/BL6. Sobrevida dos animais infectados tratados e controles negativo (*mock*) e positivo (veículo) para infecção (B). Contagem de monócitos, linfócitos e neutrófilos, após 7 e 10 dias de infecção. As lâminas foram fixadas em metanol e coradas em May-Grumald-Giemsa para contagem diferencial (C). Contagem de leucócitos totais, macrófagos, neutrófilos e linfócitos nas vias aéreas dos camundongos, após 10 dias de infecção (D). Ensaio de

titulação viral, para quantificar os vírus nos pulmões medindo-se a quantidade de PFU (Unidades formadoras de Placa) em células MDCK, após 7 e 10 dias de infecção (E). Quantificação Viral por ELISA específico para a hemaglutinina de PR8 (Sino Biological) nos macerados de pulmões de cada animal após 7 e 10 dias de infecção (F). Foram utilizados de 5 a 9 animais por grupo. Resultados com  $p < 0,05$  foram considerados diferentes e foram representados com o símbolo \* comparando ao grupo *mock* ou ao grupo indicado pela barra abaixo e com o símbolo # comparando ao grupo veículo.

#### 4.5 Efeito do tratamento imunossupressor DEXA e CICLO em combinação com o antiviral Tamiflu, durante a infecção por influenza A/PR/8/38, sobre o surgimento de vírus resistente



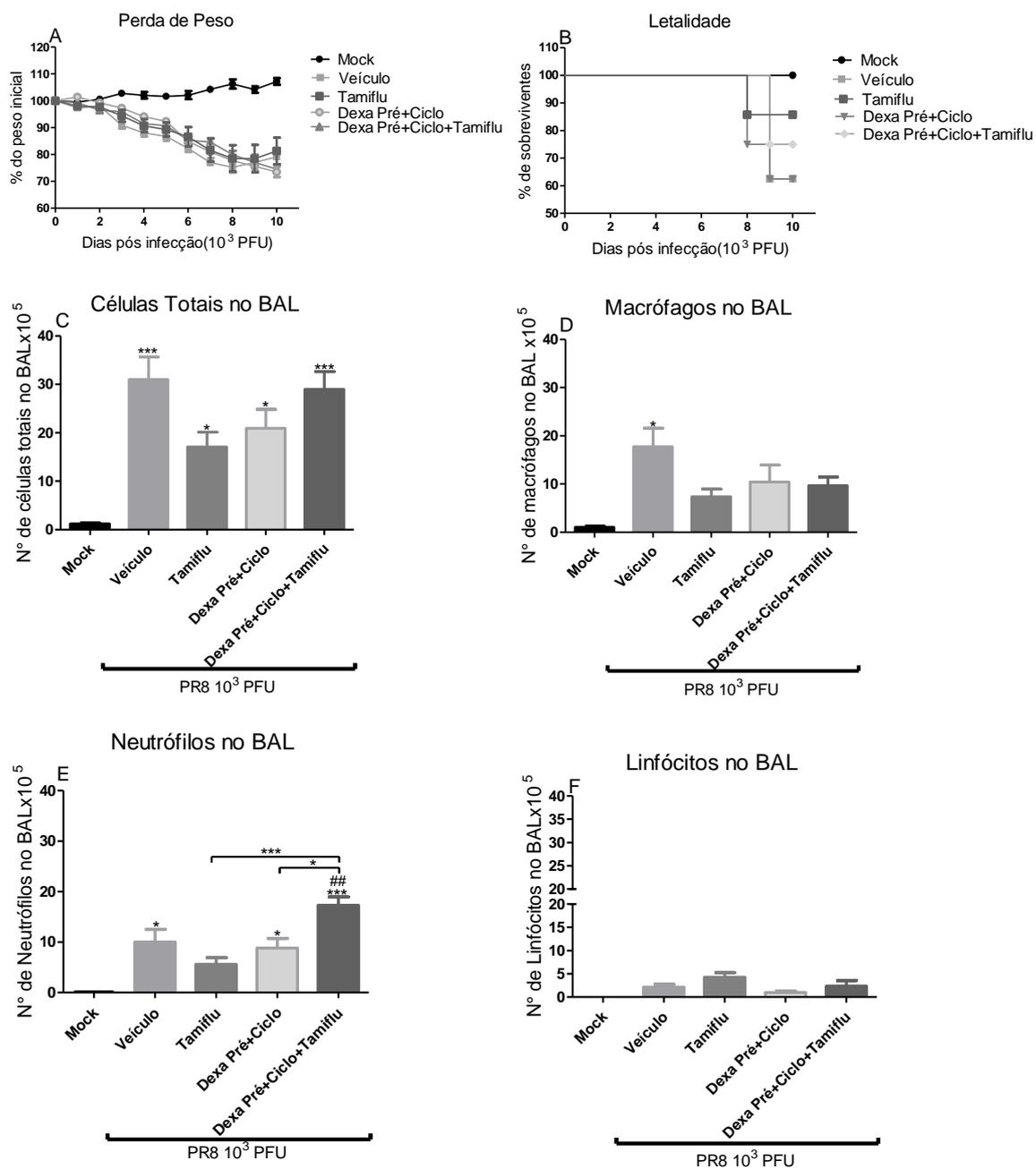
**Figura 4.17:** Esquema do desenho experimental da imunossupressão por DEXA e CICLO em combinação ou não com Tamiflu® durante 10 dias de infecção. Camundongos C56/BL6 infectados por influenza no dia 0 com inóculo de 1000 PFU. Tratamento por Ciclofosfamida nos dias -1 e 5 pós infecção (150mg/kg, via ip) e Dexametasona (10mg/kg, via ip) iniciado do dia -1 até o 7º ou 10º dia de infecção, em combinação ou não com Tamiflu na dose de 1mg/kg do 3º ao 7º dia. Os animais foram mortos após 7 e 10 dias para análise de sangue, lavado broncoalveolar e pulmões.

Já sabendo que o tratamento com DEXA e CICLO é eficiente na imunossupressão e que permite uma persistência do vírus no organismo, neste novo experimento foi adicionado o tratamento com antiviral Tamiflu®, afim de saber se a imunossupressão em combinação com o antiviral favorece ao vírus uma redução de suscetibilidade ao Tamiflu®. O tratamento imunossupressor segue como experimento anterior, mas agora com uma dose subótima de

1mg/kg de Tamiflu®, duas vezes ao dia. As análises foram realizadas no décimo dia de infecção.

Após a infecção com vírus influenza, ocorreu uma intensa perda de peso, até o oitavo dia de infecção. O grupo tratado somente com Tamiflu® mostrou uma recuperação mais rápida em relação aos outros grupos infectados, já o tratamento com DEXA e CICLO não interferiu com a perda de peso (Fig.4.18.A). Quanto à letalidade, somente o Tamiflu® aparentemente, levou a um aumento na sobrevivência em relação aos grupos infectados (Fig.4.18.B). Todos os grupos infectados tiveram um aumento de leucócitos nas vias aéreas em relação ao não grupo infectado (*mock*) (Fig.4.18.C). Entre os grupos não há diferença estatística no recrutamento de macrófagos e linfócitos no lavado broncoalveolar, somente o grupo veículo tem um aumento de macrófagos em relação ao *mock* (Fig.4.18.D e F).

O grupo tratado com DEXA, CICLO em combinação com Tamiflu, apresentou um aumento de neutrófilos no BAL, em relação ao grupo tratado somente com Tamiflu ou o grupo DEXA em combinação com CICLO (Fig.4.18.E).

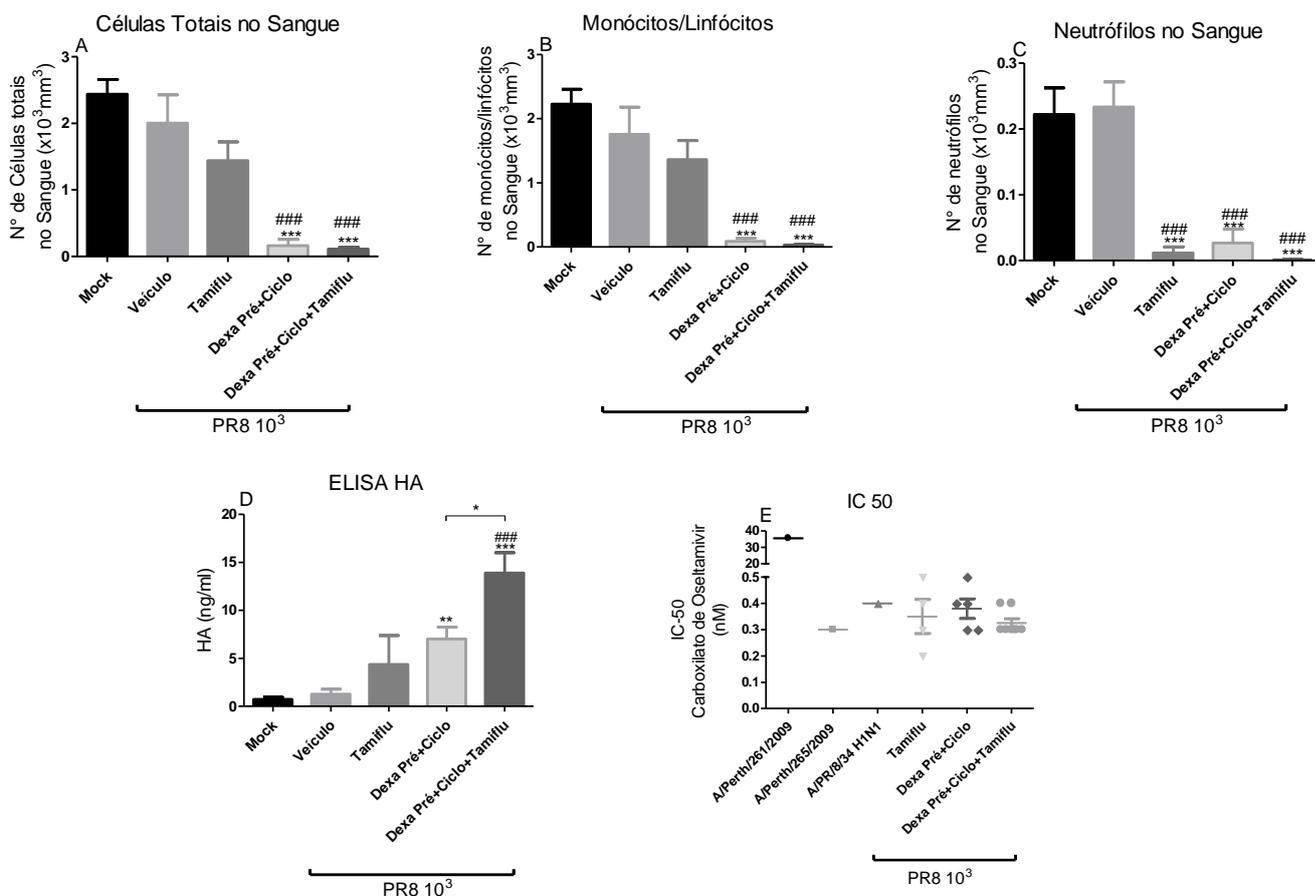


**Figura 4.18.** Efeito do tratamento imunossupressor DEXA e CICLO, em combinação com o antiviral Tamiflu®, sobre o surgimento de vírus resistente à infecção por influenza A/PR/8/38. Monitoramento de perda de peso durante 10 dias de infecção por influenza A/PR/8/38 (A) em camundongos C57/BL6. Sobrevida dos animais infectados tratados e controles negativo *mock* e positivo (veículo) para infecção (B). Contagem de leucócitos totais, macrófagos, neutrófilos e linfócitos nas vias aéreas dos camundongos, após 10 dias de infecção (C,D ,E e F). Os animais foram distribuídos entre 4 a 8 por grupo. Resultados com  $p < 0,05$  foram considerados diferentes e foram representados com o símbolo \* comparando ao grupo *mock* ou ao grupo indicado pela barra abaixo e com o símbolo # comparando ao grupo veículo.

O tratamento com DEXA e CICLO, em combinação ou não com Tamiflu, provocou uma intensa redução no número de leucócitos totais no sangue incluindo monócitos, linfócitos e neutrófilos, em comparação com o do grupo veículo (Fig.4.19.A, B e C).

Através da quantificação da proteína HA no BAL, foi possível ver que através do tratamento imunossupressor, o vírus inoculado nos animais permaneceu replicando até o 10º dia de infecção, diferente dos grupos tratados com Tamiflu® e veículo (Fig.4.19.D).

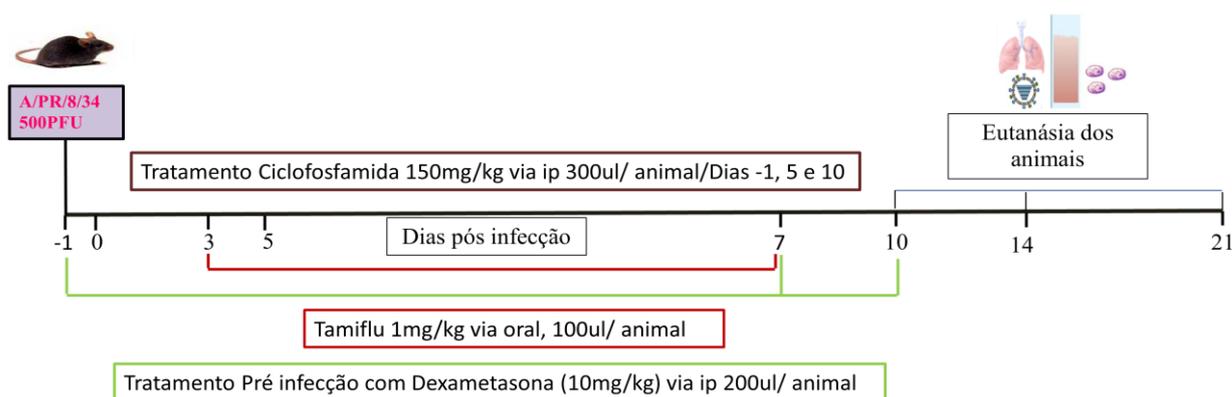
No ensaio, foram utilizados dois isolados como controle para análises, um de Perth de vírus resistente e um de vírus suscetível ao Tamiflu®, também de Perth. Nenhum dos isolados dos infectados, apresentaram uma redução de suscetibilidade Carboxilato de Oseltamivir, mesmo após a permanência no organismo dos camundongos até o 10º dia de infecção (Fig.4.19.E). Não foi possível isolar nenhum vírus detectável dos animais do grupo veículo.



**Figura 4.19.** Efeito do tratamento imunossupressor DEXA e CICLO em combinação com o antiviral Tamiflu®, sobre o surgimento de vírus resistente na infecção por influenza A/PR/8/38. Contagem total

e diferencial de leucócitos no sangue e esfregaço de lâminas coradas em May-Grumald-Giemsa para contagem de células totais, monócitos, linfócitos e neutrófilos, após 10 dias de infecção. (A, B e C). Quantificação viral por ELISA específico para a hemaglutinina (Sino Biological) nos macerados de pulmões de cada animal após 10 dias de infecção (D). O ensaio de inibição de neuraminidase foi feito para determinar a concentração inibitória de 50% da atividade enzimática (IC50) do Tamiflu® necessária para inibir a atividade da NA do vírus Influenza. Vírus controles para comparação, além dos isolados dos pulmões dos camundongos, foram eles: A/PR/8/34 utilizado para infectar os animais, o vírus A/Perth/261/2009, resistente ao Tamiflu® (H275Y) e o vírus A/Perth/265/2009, suscetível ao antiviral (WT) (E). Os animais foram distribuídos entre 4 a 8 por grupo. Resultados com  $p < 0,05$  foram considerados diferentes e foram representados com o símbolo \* comparando ao grupo *mock* ou ao grupo indicado pela barra abaixo e com o símbolo # comparando ao grupo veículo.

#### 4.6 Protocolo Imunossupressor com menor inóculo viral leva à persistência viral prolongada.

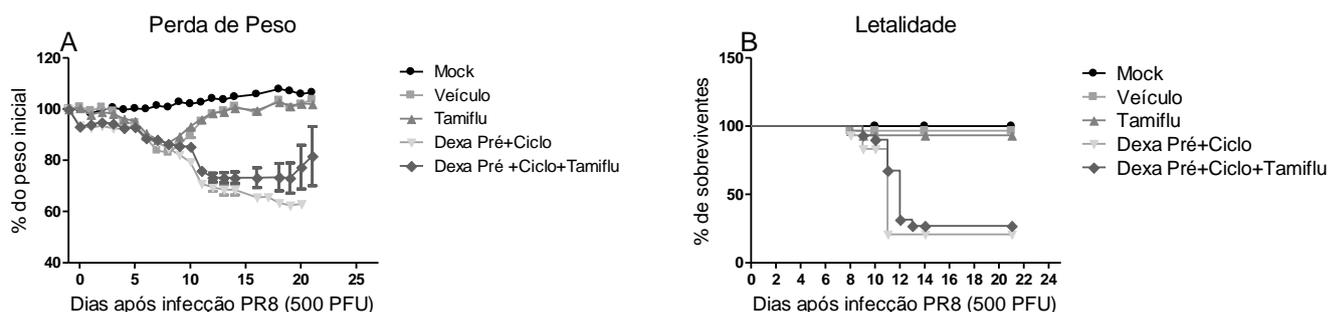


**Figura 4.20:** Esquema do desenho experimental do protocolo para imunossupressão por DEXA e CICLO em combinação ou não com Tamiflu® durante 10, 14 e 21 dias de infecção por influenza com um inóculo de 500 PFU. Camundongos C56/BL6 infectados por influenza no dia 0. tratamento por Ciclofosfamida nos dias -1, 5 e 10 pós infecção (150mg/kg, via ip) e Dexametasona (10mg/kg, via ip) iniciado do dia -1 até o 7º ou 10º dia de infecção, em combinação ou não com Tamiflu na dose de 1mg/kg do 3º ao 7º dia. Os animais foram separados em diferentes grupos de 10, 14 e 21 dias, com os mesmos tratamentos e controles negativos e positivos, após os respectivos dias foram mortos para análise de sangue, lavado broncoalveolar e pulmões.

De acordo com os experimentos anteriores, vimos que o tratamento com DEXA e CICLO é eficiente na imunossupressão e permite uma persistência do vírus no organismo. No entanto, devido à perda de peso acentuada nos animais tratados com o regime de imunossupressão, foi

necessário reduzir o inóculo viral utilizado, visando realizar análises em tempos mais tardios. Neste novo experimento foi avaliado o efeito do tratamento com imunossupressor sobre a infecção induzida com um menor inóculo viral (500 PFU), afim de saber se a imunossupressão, em combinação com o antiviral, poderia favorecer a redução da susceptibilidade do vírus ao Tamiflu®, levando à maior permanência do vírus no organismo e consequentemente a uma menor taxa de mortalidade.

O tratamento imunossupressor levou à perda de peso até o 21º dia de infecção, os grupos infectados e tratados com antiviral em combinação mostraram uma perda de peso um pouco menor, e a curva de perda de peso revelou uma leve recuperação ao final do experimento (Fig. 4.20. A). O inóculo viral de 500 PFU levou a uma menor letalidade nos grupos infectados que receberam veículo e Tamiflu®, ao contrário do verificado com tratamento imunossupressor que levou ao aumento na taxa de letalidade (Fig.4.20.B).



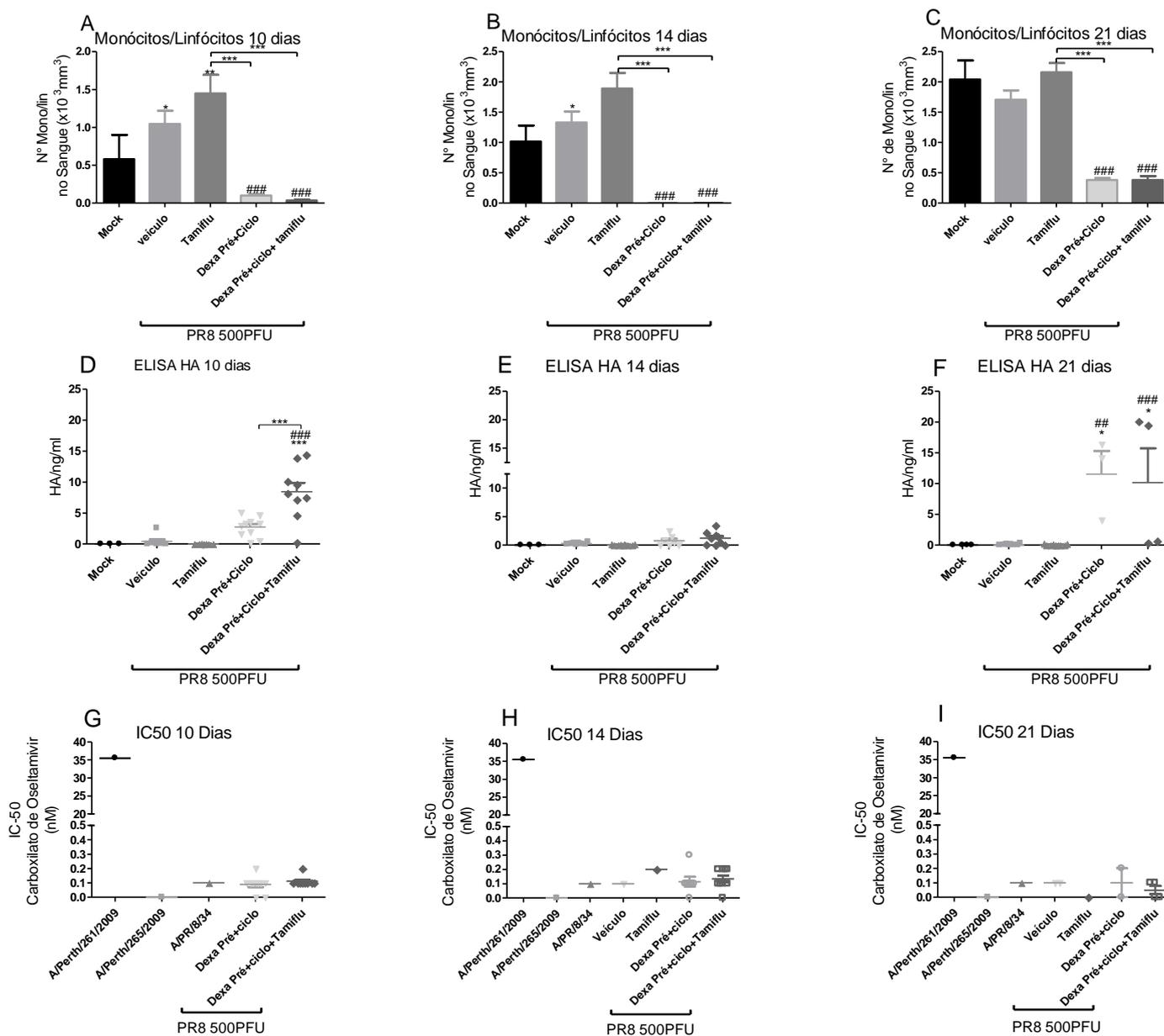
**Figura 4.21.** Efeito do tratamento Imunossupressor com menor inóculo viral leva à persistência viral prolongada. Monitoramento de perda de peso durante 21 dias de infecção por influenza A/PR/8/38 (A) em camundongos C57/BL6. Sobrevida dos animais infectados tratados e controles negativo (*mock*) e positivo (veículo) para infecção (B). Para cada grupo foram utilizados de 10 a 30 animais, divididos para as análises de 10, 14 e 21 dias.

Quando avaliados parâmetros inflamatórios, 10 dias após infecção, não foi observada diferença estatística entre os grupos infectados, todos apresentaram aumento no infiltrado leucocitário nas vias aéreas. Os grupos infectados e tratados com DEXA e CICLO apresentaram uma redução no número de linfócitos e neutrófilos no BAL (dados não mostrados). Depois de 14 dias de infecção, os grupos com tratamento imunossupressor em combinação, ou não com Tamiflu®, apresentaram aumento no recrutamento de leucócitos totais em comparação ao grupo tratado somente com o antiviral, além da redução no total de

células em relação ao veículo. Não houve diferença entre os grupos quanto ao número de macrófagos e neutrófilos (dados não mostrados). Depois de 10, 14 e 21 dias os grupos imunossuprimidos por DEXA e CICLO e tratados em combinação com Tamiflu®, apresentaram redução estatisticamente significativa de monócitos e linfócitos no sangue em relação ao grupo infectado tratado com o veículo ou com o antiviral somente (Fig.4.21.A, B e C).

Mesmo com a extensão dos dias de infecção, e utilizando um inóculo menor (500 PFU), foram isolados vírus até o 21º dia dos grupos imunossuprimidos, e também depois de 10 e 14 dias de infecção, como esperado. A quantificação da proteína viral HA revelou aumento em relação ao grupo infectado e tratado com o veículo após apenas em 10 e 21 dias pós infecção (Fig.4.21. D, EeF)

Os isolados virais foram submetidos ao ensaio de atividade e inibição da NA, mas mesmo depois de 21 dias de infecção na condição do tratamento imunossupressor e com o inóculo menor do vírus influenza, não foi observada redução de suscetibilidade ao Tamiflu®(Fig. 4.21 G, H, I).



**Figura 4.22.** Efeito do tratamento Imunossupressor sobre a persistência viral prolongada na condição de infecção com menor inóculo (500 PFU). Contagem diferencial de linfócitos e monócitos no sangue, após 10, 4 e 21 dias de infecção (A, B e C). Quantificação Viral por ELISA específico para a HA (Sino Biological) nos macerados de pulmões de cada animal após 10,14 e 21 dias de infecção (D, E e F). O ensaio de inibição de HA foi feito para determinar a concentração inibitória de 50% da atividade enzimática (IC50) do Tamiflu® necessária para inibir a atividade da NA do vírus Influenza depois de 10, 14 e 21 dias de infecção. Vírus controles para comparação, além dos isolados dos pulmões dos camundongos, são eles: A/PR/8/34 utilizado para infectar os animais, o vírus A/Perth/261/2009, resistente ao Tamiflu® (H275Y) e o vírus A/Perth/265/2009, suscetível ao antiviral (WT) (G, H e I). Para cada grupo foram utilizados de 10 a 30 animais, divididos para as análises de 10, 14 e 21 dias. Resultados com  $p < 0,05$  foram considerados diferentes e foram representados com o símbolo \*

comparando ao grupo *mock* ou ao grupo indicado pela barra abaixo e com o símbolo # comparando ao grupo veículo.

## 5.DISCUSSÃO

Este estudo teve como objetivo avaliar a resposta inflamatória de camundongos infectados com vírus influenza A/PR/8/34 H1N1 (PR8) submetidos ao tratamento com diferentes compostos, administrados isoladamente ou em combinação, incluindo o antiviral Tamiflu®, o imunomodulador antagonista de PAFR (PCA 4248), do imunossupressor DEXA e do quimioterápico CICLO, avaliando igualmente o comportamento do vírus quanto à possível aquisição de resistência ao antiviral. De maneira geral, verificamos que, utilizando uma dose subterapêutica do antiviral Tamiflu®, em combinação com imunomoduladores ou imunossupressores, verificamos haver pequenas alterações da resposta inflamatória, e eventualmente persistência da carga viral nos pulmões, porém este quadro não levou a redução da susceptibilidade ao tratamento com Tamiflu®.

No primeiro esquema experimental, em que foi feita análise do efeito de várias doses do antiviral Tamiflu®, o tratamento foi iniciado após 3 dias da infecção, sendo possível concluir que o tratamento com a dose de 10mg/kg produziu redução na perda de peso e aumento na sobrevivência dos animais, enquanto que a dose sub-terapêutica de 1mg/kg, embora tenha determinado uma proteção parcial, esta não foi estatisticamente significativa. De acordo com outros trabalhos na literatura, a dose de 10mg/kg em camundongos é eficiente em proteger contra a infecção por influenza, mostrando que animais infectados tiveram um ganho de peso maior (104). Em um desses estudos, para averiguar a dosagem ideal contra a patogenicidade do vírus, viu-se que, dependendo do vírus, a dosagem de 0,1mg/kg, 1mg/kg ou 10mg/kg, e a durabilidade do tratamento, podem produzir respostas diferentes, tendo maior sucesso na dose de 10mg/kg (105). A melhora parcial resultante da dose de 1mg/kg poderia levar, em pacientes, à interrupção do tratamento. Porém, o uso de doses sub-ótimas ou até mesmo interromper tratamento com antivirais, enquanto pacientes permanecem em processo de resposta inflamatória na presença do vírus, deve ser evitado devido às maiores chances de aparecimento de vírus resistentes a antivirais (106). A susceptibilidade de um isolado viral ao Tamiflu® pode ser considerada normal se o IC-50 for menor ou igual a 10 vezes aos valores de IC-50 de vírus circulantes; é considerada reduzida se estiver entre 10 e 100 vezes ou altamente reduzida se for maior que 100 vezes, de acordo com os dados de IC-50 encontrados em ensaios de inibição da atividade de NA (107). No entanto, através do ensaio de suscetibilidade ao Tamiflu®, não foi possível detectar redução de susceptibilidade ao antiviral, em um período de tratamento de 5 dias utilizando-se de um esquema experimental com três doses diferentes do antiviral (0,1, 1 e 10mg/kg).

A resposta inflamatória nos grupos infectados tende a ser mais intensa devido ao processo de combate ao vírus, mas no grupo tratado com Tamiflu® (10mg/kg), a presença de neutrófilos é menor, mostrando assim que o tratamento com o antiviral, para casos de infecção aguda por Influenza A é eficaz em combater ao vírus, e em consequência, reduzir a resposta inflamatória causada pela infecção. Mesmo as doses sub-ótimas não sendo recomendadas na literatura para o tratamento de casos agudos de Influenza A, foi possível ver uma tendência à redução no recrutamento do número de neutrófilos nas vias aéreas. A medida de neutrófilos nos pulmões pode ser feita de forma indireta, pela quantificação da MPO, uma enzima abundante nos neutrófilos (108). Nos resultados foi possível ver que em um intervalo de 5 dias de tratamento com 10mg/kg de Tamiflu®, houve uma redução no recrutamento de neutrófilos no tecido pulmonar; enquanto que com as outras doses, não foi observado o aumento de MPO nos pulmões em relação ao grupo não infectado. Este resultado enfatiza mais uma vez a recomendação do tratamento na dose recomendada, sendo esse capaz de reduzir tanto a multiplicação viral, quanto à inflamação associada à infecção.

Dados prévios mostraram que o mediador PAF atua através do receptor metabotrópico PAFR, sendo este regulado positivamente durante infecção por influenza (109). Assim, foi utilizado o antagonista PCA4248, para tratar animais desafiados pelo vírus, que determinou aumento na taxa de sobrevivência e redução de infiltrado leucocitário nas vias aéreas dos camundongos (98). Nesse estudo foi levantada a possibilidade da imunomodulação por PCA4248, influenciar no surgimento de vírus resistente ao Tamiflu®. Foi possível observar que o tratamento produziu efeitos similares aos do antiviral no que tange a recuperação de peso corporal, letalidade e redução de infiltrado leucocitário no BAL. Uma clara diminuição no número de neutrófilos foi observada no grupo infectado e tratado somente com PCA4248, em comparação ao grupo que recebeu o Tamiflu®. A análise dos isolados virais testados dos diferentes grupos, mostrou que o imunomodulador não alterou a suscetibilidade do vírus ao antiviral.

O uso de corticoides na infecção por influenza ainda é um ponto controverso na literatura. Em alguns estudos foi constatado que o uso de corticoides no tratamento de infecção experimental em camundongos com Influenza A causa uma melhora na lesão pulmonar (91), devido à diminuição na resposta inflamatória ao patógeno pela menor produção de citocinas (110), o que poderia deixar o organismo mais vulnerável a outras infecções. Outro estudo observou maior proliferação do vírus em células humanas em cultura, depois do tratamento com corticóide (111). Visando entender se esse efeito anti-inflamatório causado do corticoide, em combinação com o antiviral Tamiflu®, poderia favorecer o

surgimento de alterações genéticas no vírus, outro esquema experimental foi realizado nesse estudo, para proporcionar ao mesmo vírus Influenza A (PR8) ambientes diferentes para sua propagação *in vivo*. Para tanto, foi utilizado o tratamento terapêutico com o corticoide DEXA, em combinação ou não com o antiviral Tamiflu®, e as análises foram realizadas 7 e 10 dias após a infecção. Os anti-inflamatórios esteroidais são potentes em inibir a resposta inflamatória, porém não agem diretamente contra o patógeno, deixando assim, o organismo vulnerável a ocorrência de outras infecções. Além disso, permitem a permanência do vírus por um tempo mais prolongado no organismo, o que pode favorecer sua propagação e diferenciação, podendo levar a um aumento da resistência a antivirais. Sabe-se que em perus infectados com vírus influenza (H1N2 e H3N2) e tratados com DEXA, foi observada uma maior permanência do vírus nas vias aéreas, em função do quadro de imunossupressão estabelecido, o que permitiu a maior propagação do vírus no organismo (112). A DEXA é utilizada para tratamento paralelo de doenças como a leucemia linfocítica aguda, pois atua regulando negativamente linfócitos e inibindo respostas de natureza autoimunes (113). Neste estudo, verificamos que o tratamento com DEXA pós infecção, em combinação ou não com Tamiflu®, após sete dias de infecção, produziu discreta redução no número de leucócitos totais no sangue nos animais infectados. Deve ser ressaltado que o protocolo utilizado para tratamento com DEXA não foi capaz de causar imunossupressão. Muito embora não tenha sido identificada diferença na contagem de placas de lise do vírus, os grupos tratados com DEXA posteriormente à infecção, em combinação ou não com Tamiflu®, apresentaram menor detecção da proteína viral HA após dez dias de infecção. Isto nos permitiu inferir que a DEXA parece interferir de forma negativa na propagação do vírus. Além disso, nenhuma das amostras virais, provenientes de animais submetidos aos diferentes tipos de tratamento, mostraram redução na susceptibilidade ao antiviral durante o ensaio com concentração inibitória para 50% (IC50). É possível especular que o tratamento com DEXA não causou quadro de imunossupressão, e ainda foi eficiente em acelerar o combate ao vírus sem, entretanto, favorecer o surgimento de resistência ao antiviral.

Em um estudo em que camundongos SCID foram infectados com o vírus Influenza B, foi verificada menor resposta imune ao vírus, o que favoreceu sua permanência no organismo por período mais prolongado (77). Isto permite afirmar sobre a fragilidade do sistema imune de organismo submetido à imunossupressão na condição do combate ao vírus. Pacientes imunocomprometidos quando infectados por patógenos virais são mais suscetíveis a serem acometidos por doenças graves, e por isso, as chances de surgimento de vírus resistentes no organismo imunocomprometido são maiores em comparação a uma população saudável (114).

Em busca de avaliar o comportamento do vírus em tempos mais tardios da infecção, foi realizado um protocolo de imunossupressão alternativo, no qual foi utilizada DEXA, em dose mais elevada, em associação o quimioterápico CICLO, tendo como baseo protocolo descrito em estudo com camundongos BALB/c fêmeas inoculadas com o vírus influenza B (103). Foram avaliados os tempos de 7 e 10 dias pósinfecção, de forma aavaliar a permanência do vírus no organismo. Os animais mostram uma perda de peso e letalidade de forma antecipada ao verificado no grupo tratadocom o veículo. Análise sanguínea revelou redução no conteúdo leucocitário nos grupos tratados com DEXA e CICLO, o que foi sugestivo de que o tratamento possa ter interferido coma produção de células na medula óssea. Foi observada redução no infiltrado leucocitário no BALcom diminuição do número de linfócitos, o que poderia sugerir um comprometimento na montagemda resposta imune adaptativa nesses animais, os deixando mais suscetíveis a infecções secundárias e, também, à proliferação do vírus no organismo.Com base nestes achados, afirmamos que foi possível obter um quadro de imunossupressão bem sucedida pelo uso combinado de DEXA e CICLO, uma vezque até os dias 7 e 10 pós-infecção, pode ser detectada a presença de vírus nos pulmões, tanto por ensaio de placa quanto pela detecçãode HA. O surgimento de um vírus resistente pode ocorrer de forma espontânea, por pressão do antiviral em dosagem desregulada, ou através de pacientes imunocomprometidos, que podem produzir vírus viáveis por períodos mais prolongados que aqueles imunocompetentes. De forma alinhada com estes achados, em um estudo do nosso laboratório, com pacientes hospitalizados imunossuprimidos, portadores de câncer, foi verificadoque a detecção de vírus influenza pode ocorrer por até 63 dias, e que esses pacientes são mais propensos a infecções por influenza(57).

Na sequência, tendo como base o modelo de imunossupressão definido, avaliamos o efeito do tratamento com uma dose subótima de Tamiflu®, 1mg/kg, em combinação com DEXA e CICLO, 10 dias após a infecção. Os animais tratados com DEXA e CICLO mantiveram a perda de peso, diferentemente daquelesque foram tratados apenas com Tamiflu®. Mostraram, também, marcada redução no número deleucócitosno sangue, em relação ao grupo infectado tratadocom o veículo. O tratamento com Tamiflu®, DEXA e CICLO produziu redução do infiltrado de neutrófilos nos pulmões. Com este protocolo foi possível detectar e isolar vírus até 10º dia de infecção, muito embora não tenha sido observada diferença quanto ao nível de susceptibilidade ao Tamiflu®. A fim de analisar se em condições mais tardias de infecção e com menor inóculo do vírus, na condição de imunossupressão causada por DEXA e CICLO, o vírus aumentaria as chances de uma redução de suscetibilidade ao antiviral, foram utilizados os tempos de análise de 10, 14 e 21 dias de infecção, e tratamento nos dias -1, 5 e 10 com CICLO e do dia -1 ao 9º com DEXA,

em combinação ou não com o Tamiflu®. Foi possível isolar vírus até o dia 21 pós-infecção, nos grupos imunossuprimidos, o que suporta a hipótese na presença de um ambiente favorável há a permanência viral, mesmo na presença de um antiviral. Confirmando dados prévios, vimos que o tratamento com DEXA+ CICLO produziu marcada linfopenia sanguínea, possivelmente consequência de depleção na produção de células na medula óssea. Com os isolados foi feito o ensaio de atividade e inibição da NA, porém não foi detectada alteração na susceptibilidade ao Tamiflu®. Em um estudo prévio de outro grupo, foram detectadas em a presença de mutações no vírus influenza de amostras de pacientes imunocomprometidos, testadas através da técnica PCR digital (ddpcr). Esta técnica é bastante sensível e permite observar polimorfismos em um único nucleotídeo que conferem resistência ao Tamiflu® e detectar precocemente resistência viral, o que não é possível através de ensaios como IC50 (115). Considera-se, então, a possibilidade de que tenham ocorrido pequenas trocas de nucleotídeos nas nossas condições experimentais, embora não tenha sido avaliado. Além disso, sabe-se que, dentre os vírus influenza A, o subtipo H3N2 possui uma dinâmica evolutiva mais acelerada que o H1N1, devido à sua maior deriva antigênica, que leva à formação de mais *clusters* antigênicos (116), isto poderia explicar o fato do vírus em questão testado nesse estudo, H1N1, não ter apresentado variedade genotípica que poderia comprometer sua susceptibilidade ao Tamiflu®, quando da análise de diferentes tipos de tratamento.

Este estudo afirma que em ambientes favoráveis, como organismos imunossuprimidos, o vírus persiste e que a possibilidade de uma mutação não pode ser descartada, que tratamentos alternativos com corticoides, em combinação com um antiviral, podem reduzir o quadro agudo da resposta inflamatória desencadeada pelo vírus, apesar de corticoides não serem aceitos pela OMS devido às contradições existentes quanto a seus benefícios e efeitos colaterais. A imunomodulação se mostrou positiva para redução da inflamação e não foi capaz de alterar a sensibilidade do vírus ao Tamiflu®. Tais condições estudadas para avaliação do surgimento de vírus resistentes, fazem parte da vigilância do vírus influenza, a fim de colaborar com medidas preventivas a situações favoráveis para tal acontecimento.

## 6. CONCLUSÕES

Através de diferentes protocolos farmacológicos de imunomodulação – antagonista de PAFR ou glicocorticóide Dexametasona – e de imunossupressão – Dexametasona em combinação com o quimioterápico Ciclofosfamida – em combinação com o antiviral Tamiflu® durante a infecção experimental por influenza A/PR/8/34 H1N1 demonstramos ser possível modular negativa ou positivamente a resposta inflamatória e a persistência viral sem afetar o perfil de susceptibilidade do vírus influenza ao antiviral Tamiflu®. Os conhecimentos gerados podem ter implicações na vigilância de vírus resistentes em pacientes submetidos a esses tratamentos. Em resumo, demonstramos que:

- O uso da dose de Tamiflu® considerada subótima (1mg/kg), foi capaz de reduzir parcialmente a letalidade, replicação viral e o componente inflamatório induzido pela infecção sem reduzir a susceptibilidade ao antiviral;
- Assim como demonstrado anteriormente, o tratamento com o inibidor de PAFR, PCA428 resulta em proteção parcial durante a infecção experimental por influenza, mas não possui efeito aditivo se combinado com o antiviral Tamiflu, nem altera o perfil de susceptibilidade dos vírus ao antiviral;
- O uso do corticoide Dexametasona não levou à persistência do vírus nem ao aumento de resistência ao antiviral, porém quando administrado pós-infecção, ou combinada com dose subótima Tamiflu®, foi capaz de diminuir a morbidade e, parcialmente, os títulos virais;
- Embora a adoção de um protocolo imunossupressor de Dexametasona com Ciclofosfamida combinado ou não com Tamiflu, tenha levado à persistência viral no organismo, este não foi capaz de alterar a susceptibilidade ao Carboxilato de Oseltamivir, mesmo em condições de inóculo viral reduzido e tempo avançado de infecção.

## **7.PERSPECTIVAS**

- Finalizar as análises histológicas
- Analisar a presença de mutações pontuais nos vírus isolados dos pulmões de animais submetidos aos diferentes tratamentos através do sequenciamento do genoma completo dos isolados pela plataforma Illumina

## 8.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Hutchinson EC. Influenza Virus. Trends Microbiol. 2018;26(9):809–10.
2. ICTV. Virus Taxonomy [Internet]. 2018.
3. Webster RG, Yakhno M, Hinshaw VS, Bean WJ, Copal Murti K. Intestinal influenza: Replication and characterization of influenza viruses in ducks. Virology. 1978;84(2):268–78.
4. Kim SM, Kim Y, Pascua PNQ, Choi YK. Avian Influenza A Viruses: Evolution and Zoonotic Infection. 2016;37(1069–3424):501–511.
5. Ito T, Couceiro JNSS, Kelm S, Baum LG, Krauss S, Castrucci MR, et al. Molecular Basis for the Generation in Pigs of Influenza A Viruses with Pandemic Potential. J Virol. 1998;72(9):7367–73.
6. Fouchier RAM, Peiris M, Kedzierska K, Doherty PC, Palese P, Shaw ML, et al. Influenza A Virus Evolution and Emergence. Nat Rev Dis Prim. 2018;4(1):1–21.
7. Wei C-J, Crank MC, Shiver J, Graham BS, Mascola JR, Nabel GJ. Next-generation influenza vaccines: opportunities and challenges. Nat Rev Drug Discov. 2020;
8. Han J, Perez J, Schafer A, Cheng H, Peet N, Rong L, et al. Influenza Virus: Small Molecule Therapeutics and Mechanisms of Antiviral Resistance. Curr Med Chem. 2018;25(38):5115–27.
9. Darwish, I., S. Mubareka and WCL. Immunomodulatory therapy for severe influenza. Expert Rev Anti Infect Ther. 2011;7:807–22.
10. Cheung T. e LLP. Biology of influenza a virus. Ann N Y Acad Sci. 2007;1102:1–25.
11. Bouvier NM e PP. The biology of influenza viruses. Vaccine. 2008;26:49–53.
12. Paget J, Spreeuwenberg P, Charu V, Taylor RJ, Iuliano AD, Bresee J, et al. Global mortality associated with seasonal influenza epidemics: New burden estimates and predictors from the GLaMOR Project. J Glob Health. 2019;9(2):1–12.
13. Organization WH. Up to 650 000 people die of respiratory diseases linked to seasonal flu each year
14. Cohen SA, Chui KKH, Naumova EN. Influenza vaccination in young children reduces influenza-associated hospitalizations in older adults, 2002-2006. J Am Geriatr Soc. 2011;59(2):327–32.

15. Rolfes MA, Foppa IM, Garg S, Flannery B, Brammer L, Singleton JA, et al. Annual estimates of the burden of seasonal influenza in the United States: A tool for strengthening influenza surveillance and preparedness. *Influenza Other Respi Viruses*. 2018;12(1):132–7.
16. Ministério de Saúde. Monitoramento de casos reportados de Síndrome Respiratória guda grave (SRAG) hospitalizados
17. Epstein SL, Price GE. Cross-protective immunity to influenza A viruses. *Expert Rev Vaccines*. 2010;9(11):1325–41.
18. Last JM. Dictionary of epidemiology [1]. Vol. 47, *Journal of Epidemiology and Community Health*. 1993. 430 p.
19. GL, Bennett, J.E., Dolin R. Principles and Practice of Infectious Diseases. 7th ed. Inc E, editor. Philadelphia; 2010.
20. Shanks GD. Insights from unusual aspects of the 1918 influenza pandemic. *Travel Med Infect Dis* . 2015;13(3):217–22.
21. Morens DM, Taubenberger JK, Fauci AS. Predominant Role of Bacterial Pneumonia as a Cause of Death in Pandemic Influenza: Implications for Pandemic Influenza Preparedness. *J Infect Dis*. 2008;198(7):962–70.
22. Glezen WP. Emerging infections: Pandemic influenza. *Epidemiol Rev*. 1996;18(1):64–76.
23. Dawood FS, Iuliano AD, Reed C, Meltzer MI, Shay DK, Cheng PY, et al. Estimated global mortality associated with the first 12 months of 2009 pandemic influenza A H1N1 virus circulation: A modelling study. *Lancet Infect Dis*. 2012;12(9):687–95.
24. Le Goffic R, Bouguyon E, Chevalier C, Vidic J, Da Costa B, Leymarie O, et al. Influenza A Virus Protein PB1-F2 Exacerbates IFN- $\beta$  Expression of Human Respiratory Epithelial Cells. *J Immunol*. 2010;185(8):4812–23.
25. Petrova VN, Russell CA. The evolution of seasonal influenza viruses. *Nat Rev Microbiol*. 2018;16(1):47–60.
26. Julkunen I, Sareneva T, Pirhonen J, Ronni T, Melen K MS. Molecular pathogenesis of influenza A virus infection and virus-induced regulation of cytokine gene expression. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2001;2–3:171–80.
27. Chen X, Liu S, Goraya MU, Maarouf M, Huang S, Chen JL. Host immune response to influenza A virus infection. *Front Immunol*. 2018;9(MAR):1–13.
28. Kohlmeier JE WD. Immunity to respiratory viruses. *Annu Rev Immunol*. 2009;27:61–82.

29. Omoto S, Speranzini V, Hashimoto T, Noshi T, Yamaguchi H, Kawai M, et al. Characterization of influenza virus variants induced by treatment with the endonuclease inhibitor baloxavir marboxil. *Sci Rep.* 2018;8(1):1–15.
30. Hussell T, Snelgrove R, Humphreys IR WA. Co-stimulation: novel methods for preventing viral-induced lung inflammation. *Trends Mol Med.* 2004;8:379–86.
31. Coccia EM, Severa M, Giacomini E, Monneron D, Remoli ME, Julkunen I et al. Viral infection and Toll-like receptor agonists induce a differential expression of type I and lambda interferons in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol.* 2004;34:(3).
32. Le Goffic R, Pothlichet J, Vitour D, Fujita T, Meurs E, Chignard M et al. CE. Influenza A virus activates TLR3-dependent inflammatory and RIG-I-dependent antiviral responses in human lung epithelial cells. *J Immunol.* 2007;6:3368-72.
33. Servier. Smart Servier Medical Art. [cited 2020 Mar 13].
34. Julkunen I, Sareneva T, Pirhonen J, Ronni T, Melén K, Matikainen S. Molecular pathogenesis of influenza A virus infection and virus-induced regulation of cytokine gene expression. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2001 [cited 2018 Jun 14];12:171–80.
35. van der Sandt CE, Kreijtz JHCM, Rimmelzwaan GF. Evasion of influenza A viruses from innate and adaptive immune responses. *Viruses.* 2012;4(9):1438–76.
36. Zhu L, Liu L, Zhang Y, Pu L, Liu J, Li X, et al. High Level of Neutrophil Extracellular Traps Correlates with Poor Prognosis of Severe Influenza A Infection. *J Infect Dis.* 2018;217(3):428–37.
37. Németh T, Mócsai A. Feedback Amplification of Neutrophil Function. *Trends Immunol.* 2016;37(6):412–24.
38. Taubenberger JK, Morens DM. The Pathology of Influenza Virus Infections. *Annu Rev Pathol Mech Dis.* 2008 Feb [cited 2019 Jun 11];3(1):499–522.
39. Small C-L, Shaler CR, McCormick S, Jeyanathan M, Damjanovic D, Brown EG, et al. Influenza Infection Leads to Increased Susceptibility to Subsequent Bacterial Superinfection by Impairing NK Cell Responses in the Lung. *J Immunol.* 2010;184(4):2048–56.
40. Damjanovic D, Small CL, Jeyanathan M, McCormick S, Xing Z. Immunopathology in influenza virus infection: Uncoupling the friend from foe. *Clin Immunol.* 2012;144(1):57–69.
41. Ramos I, Fernandez-Sesma A. Modulating the innate immune response to

- influenza A virus: Potential therapeutic use of anti-inflammatory drugs. *Front Immunol.* 2015;6(JUL):1–19.
42. Yedidia T Ben, Rudolph W. Development of a universal influenza vaccine. *Bioprocess Int.* 2019;9(SUPPL. 8):46–9.
  43. Rajão DS, Pérez DR. Universal vaccines and vaccine platforms to protect against influenza viruses in humans and agriculture. *Front Microbiol.* 2018;9(FEB):1–21.
  44. Xie H, Wan XF, Ye Z, Plant EP, Zhao Y, Xu Y, et al. H3N2 Mismatch of 2014-15 Northern Hemisphere Influenza Vaccines and Head-to-head Comparison between Human and Ferret Antisera derived Antigenic Maps. *Sci Rep [Internet].* 2015;5(July):1–10.
  45. Young B, Sadarangani S, Jiang L, Wilder-Smith A, Chen MIC. Duration of influenza vaccine effectiveness: A systematic review, meta-analysis, and meta-regression of test- negative design case-control studies. *J Infect Dis.* 2018;217(5):731–41.
  46. Lee BY, Bartsch SM, Willig AM. The economic value of a quadrivalent versus trivalent influenza vaccine. *Vaccine .* 2012;30(52):7443–6.
  47. Takashita E, Morita H, Ogawa R, Nakamura K, Fujisaki S, Shirakura M, et al. Susceptibility of influenza viruses to the novel cap-dependent endonuclease inhibitor baloxavir marboxil. *Front Microbiol.* 2018;9(DEC):1–7.
  48. Beigel JH, Nam HH, Adams PL, Krafft A, Ince WL, El-Kamary SS, et al. Advances in respiratory virus therapeutics – A meeting report from the 6th isirv Antiviral Group conference. *Antiviral Res.* 2019;167(April):45–67.
  49. Ma C, Zhang J, Wang J. Pharmacological characterization of the spectrum of antiviral activity and genetic barrier to drug resistance of M2-S31N channel blockers. *Mol Pharmacol.* 2016;90(3):188–98.
  50. WEBSTER RG, MONTO AS, J. BT LR. *Textbook of Influenza.* Blackwell W E, editor. 2013. chapter 25.
  51. O’Hanlon R, Shaw ML. Baloxavir marboxil: the new influenza drug on the market. *Curr Opin Virol .* 2019;35(Table 1):14–8.
  52. Takashita E, Daniels RS, Fujisaki S, Gregory V, Gubareva L V, Huang W, et al. Global update on the susceptibilities of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors and the cap-dependent endonuclease inhibitor baloxavir, 2017–2018. *Antiviral Res .* 2020;104718.
  53. Uehara T, Hayden FG, Kawaguchi K, Omoto S, Hurt AC, De Jong MD, et al.

- Treatment-Emergent Influenza Variant Viruses With Reduced Baloxavir Susceptibility: Impact on Clinical and Virologic Outcomes in Uncomplicated Influenza. *J Infect Dis.* 2020;221(3):346–55.
54. Imai M, Yamashita M, Sakai-Tagawa Y, Iwatsuki-Horimoto K, Kiso M, Murakami J, et al. Influenza A variants with reduced susceptibility to baloxavir isolated from Japanese patients are fit and transmit through respiratory droplets. *Nat Microbiol* . 2020;5(1):27–33.
  55. Lackenby A, Besselaar TG, Daniels RS, Fry A, Gregory V, Gubareva L V., et al. Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors and status of novel antivirals, 2016–2017. *Antiviral Res* . 2018;157:38–46.
  56. Casper C, Englund J, Boeckh M. How I treat influenza in patients with hematologic malignancies. *Blood.* 2010;115(7):1331–42.
  57. Souza TML, Salluh JIF, Bozza FA, Mesquita M, Soares M, Motta FC, et al. H1N1pdm influenza infection in hospitalized cancer patients: Clinical evolution and viral analysis. *PLoS One.* 2010;5(11).
  58. Shao W, Li X, Goraya MU, Wang S, Chen JL. Evolution of influenza a virus by mutation and re-assortment. *Int J Mol Sci.* 2017;18(8).
  59. Ahlquist P. RNA-dependent RNA polymerases, viruses, and RNA silencing. *Science (80- )*. 2002;296(5571):1270–3.
  60. Carrat F, Flahault A. Influenza vaccine: The challenge of antigenic drift. *Vaccine.* 2007;25(39–40):6852–62.
  61. Goka EA, Vallely PJ, Mutton KJ, Klapper PE. Mutations associated with severity of the pandemic influenza A(H1N1)pdm09 in humans: a systematic review and meta-analysis of epidemiological evidence. *Arch Virol.* 2014;159(12):3167–83.
  62. Byrd-Leotis L, Galloway SE, Agbogu E, Steinhauer DA. Influenza Hemagglutinin (HA) Stem Region Mutations That Stabilize or Destabilize the Structure of Multiple HA Subtypes. *J Virol.* 2015;89(8):4504–16.
  63. van der Vries E, Schutten M, Fraaij P, Boucher C, Osterhaus A. Influenza virus resistance to antiviral therapy . 1st ed. Vol. 67, *Advances in Pharmacology*. Copyright © 2013 Elsevier Inc. All rights reserved.; 2013. 217–246 p.
  64. Ana Avellón, 1 Maria Cabrerizo, 1 Teresa de Miguel, Pilar PérezBreña, Antonio Tenorio, Jose Luis Pérez, Maria Victoria Martínez de Aragón and GT. Widespread Oseltamivir Resistance in Infl uenza A Viruses (H1N1), South

- Africa. *Emerg Infect Dis* . 2008;14:11.
65. Xue KS, Moncla LH, Bedford T, Bloom JD. Within-Host Evolution of Human Influenza Virus. *Trends Microbiol* . 2018;26(9):781–93.
  66. Global monitoring of antiviral resistance in currently circulating human influenza viruses, November 2011. 2011;(45):497–508.
  67. Klimov AI, Rocha E, Hayden FG, Shult PA, Roumillat LF CN. Prolonged shedding of amantadine-resistant influenza A viruses by immunodeficient patients: detection by polymerase chain reaction-restriction analysis. *J Infect Dis*. 1995;5:1352-5.
  68. Ghedin E, Holmes EC, Depasse J V., Pinilla LT, Fitch A, Hamelin ME, et al. Presence of oseltamivir-resistant pandemic A/H1N1 minor variants before drug therapy with subsequent selection and transmission. *J Infect Dis*. 2012;206(10):1504–11.
  69. van der Vries E, Stittelaar KJ, van Amerongen G, Veldhuis Kroeze EJB, de Waal L, Fraaij PLA, et al. Prolonged Influenza Virus Shedding and Emergence of Antiviral Resistance in Immunocompromised Patients and Ferrets. *PLoS Pathog*. 2013;9(5).
  70. Meijer A, Lackenby A, Hungnes O, Lina B, van der Werf S, Schweiger B, et al. Oseltamivir-Resistant Influenza Virus A (H1N1), Europe, 2007–08 Season. *Emerg Infect Dis*. 2009;15(4):552–60.
  71. Kelso A, Hurt AC. Drug-resistant influenza viruses: Why fitness matters. *Nat Med*. 2012;18(10):1470–1.
  72. Community Transmission of Oseltamivir-Resistant A ( H1N1 ) pdm09 Influenza. 2011;2541–2.
  73. Molla A, Kati W, Carrick R, Steffy K, Shi Y, Montgomery D, et al. In Vitro Selection and Characterization of Influenza A (A/N9) Virus Variants Resistant to a Novel Neuraminidase Inhibitor, A-315675. *J Virol*. 2002;76(11):5380–6.
  74. Seibert CW, Kaminski M, Philipp J, Rubbenstroth D, Albrecht RA, Schwalm F, et al. Oseltamivir-Resistant Variants of the 2009 Pandemic H1N1 Influenza A Virus Are Not Attenuated in the Guinea Pig and Ferret Transmission Models. *J Virol*. 2010;84(21):11219–26.
  75. Pizzorno A, Abed Y, Plante PL, Carbonneau J, Baz M, Hamelin MÈ, et al. Evolution of oseltamivir resistance mutations in influenza A(H1N1) and A(H3N2) viruses during selection in experimentally infected mice. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(11):6398–405.

76. Baz M, Abed Y, Papenburg J, Bouhy X, Hamelin ME BG. Emergence of oseltamivir-resistant pandemic H1N1 virus during prophylaxis. *N Engl J Med.* 2009;361:23.
77. Philippe Noriel Q. Pascua, Heba H. Mostafa, Bindumadhav M. Marathe PV, Charles J. Russell RJW& EAG. Pathogenicity and peramivir efficacy in immunocompromised murine models of influenza B virus infection. *Sci Rep.* 2017;7:7345.
78. Radwan HM, Cheeseman SH, Lai KK, Ellison RT. Influenza in Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients during the 1997-1998 Influenza Season. *Clin Infect Dis.* 2000;31(2):604–6.
79. Baz M, Carbonneau J, Rhéaume C, Cavanagh MH, Boivin G. Combination Therapy with Oseltamivir and Favipiravir Delays Mortality but Does Not Prevent Oseltamivir Resistance in Immunodeficient Mice Infected with Pandemic A(H1N1) Influenza Virus. *Viruses.* 2018;10(11).
80. Pascua PNQ, Mostafa HH, Marathe BM, Vogel P, Russell CJ, Webby RJ, et al. Pathogenicity and peramivir efficacy in immunocompromised murine models of influenza B virus infection. *Sci Rep .* 2017;7(1):1–15.
81. Grady JA, Davis EG, KuKanich B, Sherck AB. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of dexamethasone after oral administration in apparently healthy horses. *Am J Vet Res.* 2010;71(7):831–9.
82. Giles AJ, Hutchinson MKND, Sonnemann HM, Jung J, Fecci PE, Ratnam NM, et al. Dexamethasone-induced immunosuppression: Mechanisms and implications for immunotherapy. *J Immunother Cancer.* 2018;6(1):1–13.
83. Fellman CL, Archer TM, Wills RW, Mackin AJ. Effects of cyclosporine and dexamethasone on canine T cell expression of interleukin-2 and interferon-gamma. *Vet Immunol Immunopathol.* 2019;216(October 2018):109892.
84. Parente L, Solito E. Annexin 1: More than an anti-phospholipase protein. *Inflamm Res.* 2004;53(4):125–32.
85. Cronstein BN, Kimmel SC, Levin RI, Martiniuk F, Weissmann G. A mechanism for the antiinflammatory effects of corticosteroids: The glucocorticoid receptor regulates leukocyte adhesion to endothelial cells and expression of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 and intercellular adhesion molecule 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89(21):9991–5.
86. Perretti M, Ahluwalia A. The microcirculation and inflammation: Site of action for glucocorticoids. *Microcirculation.* 2000;7(3):147–61.

87. Yang YH, Morand EF, Getting SJ, Paul-Clark M, Liu DL, Yona S, et al. Modulation of Inflammation and Response to Dexamethasone by Annexin 1 in Antigen-Induced Arthritis. *Arthritis Rheum.* 2004;50(3):976–84.
88. Rosen J, Miner JN. The search for safer glucocorticoid receptor ligands. *Endocr Rev.* 2005;26(3):452–64.
89. Gong H, Jarzynka MJ, Cole TJ, Jung HL, Wada T, Zhang B, et al. Glucocorticoids antagonize estrogens by glucocorticoid receptor-mediated activation of estrogen sulfotransferase. *Cancer Res.* 2008;68(18):7386–93.
90. Soma LR, Uboh CE, Luo Y, Guan F, Moate PJ, Boston RC. Pharmacokinetics of dexamethasone with pharmacokinetic/pharmacodynamic model of the effect of dexamethasone on endogenous hydrocortisone and cortisone in the horse. *J Vet Pharmacol Ther.* 2005;28(1):71–80.
91. Li C, Yang P, Zhang Y, Sun Y, Wang W, Zou Z, et al. Corticosteroid Treatment Ameliorates Acute Lung Injury Induced by 2009 Swine Origin Influenza A (H1N1) Virus in Mice. *PLoS One.* 2012;7(8):1–7.
92. Brun-Buisson C, Richard JCM, Mercat A, Thiébaud ACM, Brochard L. Early corticosteroids in severe influenza A/H1N1 pneumonia and acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 2011;183(9):1200–6.
93. Ni YN, Chen G, Sun J, Liang BM, Liang ZA. The effect of corticosteroids on mortality of patients with influenza pneumonia: A systematic review and meta-analysis. *Crit Care.* 2019;23(1):1–9.
94. Quispe-Laime AM, Bracco JD, Barberio PA, Campagne CG, Rolfo VE, Umberger R, et al. H1N1 influenza A virus-associated acute lung injury: Response to combination oseltamivir and prolonged corticosteroid treatment. *Intensive Care Med.* 2010;36(1):33–41.
95. Who. WHO Guidelines for Pharmacological Management of Pandemic Influenza A(H1N1) 2009 and other Influenza Viruses. *WHO Guidel Pharmacol Manag Pandemic Infl A(H1N1) 2009 other Infl Virus.* 2010;(February):1–32.
96. Sethu S, Melendez AJ. New developments on the TNF $\alpha$ -mediated signalling pathways. *Biosci Rep.* 2011;31(1):63–76.
97. Shi X, Zhou W, Huang H, Zhu H, Zhou P, Zhu H, et al. Inhibition of the inflammatory cytokine tumor necrosis factor-alpha with etanercept provides protection against lethal H1N1 influenza infection in mice. *Crit Care.* 2013;17(6).

98. Garcia CC, Russo RC, Guabiraba R, Fagundes CT, Polidoro RB, Tavares LP, et al. Platelet-activating factor receptor plays a role in lung injury and death caused by influenza A in mice. *PLoS Pathog.* 2010;6(11).
99. Rosenson RS, Wright RS, Farkouh M, Plutzky J. Modulating peroxisome proliferator-activated receptors for therapeutic benefit? Biology, clinical experience, and future prospects. *Am Heart J* . 2012;164(5):672–80.
100. Cloutier A, Marois I, Cloutier D, Verreault C, Cantin AM, Richter M V. The prostanoid 15-Deoxy- $\Delta$  12,14-prostaglandin-J2 reduces lung inflammation and protects mice against lethal influenza infection. *J Infect Dis.* 2012;205(4):621–30.
101. Lee SMY, Cheung C, Nicholls JM, Hui KPY, Leung CYH, Uiprasertkul M, et al. Hyperinduction of Cyclooxygenase-2–Mediated Proinflammatory Cascade: A Mechanism for the Pathogenesis of Avian Influenza H5N1 Infection. *J Infect Dis.* 2008;198(4):525–35.
102. Li C, Li C, Zhang AJX, To KKW, Lee ACY, Zhu H, et al. Avian influenza a h7n9 virus induces severe pneumonia in mice without prior adaptation and responds to a combination of zanamivir and COX-2 inhibitor. *PLoS One.* 2014;9(9):1–12.
103. Marathe BM, Mostafa HH, Vogel P, Pascua PNQ, Jones JC, Russell CJ, et al. A pharmacologically immunosuppressed mouse model for assessing influenza B virus pathogenicity and oseltamivir treatment. *Antiviral Res* . 2017;148(July):20–31.
104. Leyva-Grado VH, Palese P. Aerosol administration increases the efficacy of oseltamivir for the treatment of mice infected with influenza viruses. *Antiviral Res* . 2017;142:12–5.
105. Hui-Ling Yen, Arnold S. Monto, Robert G. Webster and EAG. Virulence May Determine the Necessary Duration and Dosage of Oseltamivir Treatment for Highly Pathogenic A/Vietnam/1203/04 Influenza Virus in Mice. *J Infect Dis* . 2005;192:665:–72.
106. Hurt AC, Chotpitayasunondh T, Cox NJ, Daniels R, Fry AM, Gubareva L V., et al. Antiviral resistance during the 2009 influenza A H1N1 pandemic: Public health, laboratory, and clinical perspectives. *Lancet Infect Dis.* 2012;12(3):240–8.
107. WHO. Meetings of the WHO working group on surveillance of influenza antiviral susceptibility – Geneva, November 2011 and June 2012. 2012;2011(39):369–80.

108. LAZAREVIĆ-PASTI T, LESKOVAC A V V. Myeloperoxidase Inhibitors as Potential Drugs. *Metab CD*, editor. 2015. 16(3):168-90.
109. Van Der Sluijs KF, Van Elden LJR, Nijhuis M, Schuurman R, Florquin S, Shimizu T, et al. Involvement of the platelet-activating factor receptor in host defense against *Streptococcus pneumoniae* during postinfluenza pneumonia. *Am J Physiol - Lung Cell Mol Physiol*. 2006;290(1):194–200.
110. Zhang Y, Sun W, Svendsen ER, Tang S, MacIntyre RC, Yang P, et al. Do corticosteroids reduce the mortality of influenza A (H1N1) infection? A meta-analysis. *Crit Care*. 2015;19(1).
111. Thomas BJ, Porritt RA, Hertzog PJ, Bardin PG, Tate MD. Glucocorticosteroids enhance replication of respiratory viruses: Effect of adjuvant interferon. *Sci Rep*. 2014;2014:1–11.
112. Ali A, Ibrahim M, Eladi AE, Saif YM, Lee CW. Enhanced replication of swine influenza viruses in dexamethasone-treated juvenile and layer turkeys. *Vet Microbiol* . 2013;162(2–4):353–9.
113. Kaufman M, Limaye SA, Driscoll N, Johnson C, Caramanica A, Lebowicz Y, et al. A combination of rituximab, cyclophosphamide and dexamethasone effectively treats immune cytopenias of chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2009;50(6):892–9.
114. Englund, J., Feuchtinger, T. & Ljungman P. Viral infections in immunocompromised patients. *Biol Blood Marrow Transpl*. 2011;17:S2–S5.
115. Pichon M, Gaymard A, Josset L, Valette M, Millat G, Lina B, et al. Characterization of oseltamivir-resistant influenza virus populations in immunosuppressed patients using digital-droplet PCR: Comparison with qPCR and next generation sequencing analysis. *Antiviral Res*. 2017;145:160–7.
116. Bedford T, Suchard MA, Lemey P, Dudas G, Gregory V, Hay AJ, et al. Integrating influenza antigenic dynamics with molecular evolution. *Elife*. 2014;2014(3):1–26.