

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

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DO RECEPTOR β 2-ADRENÉRGICO DURANTE A
INFECÇÃO PELO VÍRUS INFLUENZA EM MODELO MURINO**

Lídia Paula Faustino

Belo Horizonte

2020

LÍDIA PAULA FAUSTINO

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DO RECEPTOR β 2-ADRENÉRGICO DURANTE A
INFECÇÃO PELO VÍRUS INFLUENZA EM MODELO MURINO**

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

Orientador: Alexandre de Magalhães Vieira Machado

Coorientador: Alexander Birbrair

Belo Horizonte

2020

LÍDIA PAULA FAUSTINO

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DO RECEPTOR β 2-ADRENÉRGICO DURANTE A
INFECÇÃO PELO VÍRUS INFLUENZA EM MODELO MURINO**

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

Banca Examinadora:

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

Prof. Dr. Alexander Birbrair (UFMG) - Titular

Dr. Flávio Guimarães da Fonseca (UFMG) - Titular

Dra. Jaqueline Araújo Fiuza (IRR) - Titular

Dra. Natália Satchiko Hojo de Souza (IRR) - Suplente

Dissertação defendida e aprovada em Belo Horizonte: 04/09/2020

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do IRR
CRB/6 1975

F275a Faustino, Lídia Paula.
2020

Avaliação do papel do receptor β 2-adrenérgico durante a infecção pelo vírus influenza em modelo murino/ Lídia Paula Faustino – Belo Horizonte, 2020.

XIII, 47 f.: il; 2019 x 291mm.

Bibliografia: f. 45-47

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

1. Vírus da Influenza/metabolismo. 2. Quinase de Receptor Adrenérgico beta. 3. Mecânica da Respiração I. Título. II. Machado, Alexandre de Magalhães (Orientação). III. Birbrair, Alexander (Coorientação)

CDD – 22 ed. 616.203



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Centro de Pesquisa René Rachou

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

Ata da ducentésima quinquagésima quarta defesa de Mestrado Acadêmico do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, da aluna Lídia Paula Faustino orientada pelo Dr. Alexandre de Magalhães Vieira Machado e coorientada pelo Dr. Alexander Birbrair.

Aos quatro dias do mês de setembro do ano de dois mil e vinte, às nove horas, realizou-se por web conferência o exame da ducentésima quinquagésima quarta defesa de dissertação de Mestrado Acadêmico do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou/FIOCRUZ MINAS, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências – área de concentração Biologia Celular e Molecular, Genética e Bioinformática. A dissertação da aluna **Lídia Paula Faustino Rocha** intitula-se **“Avaliação do papel do receptor B2-Adrenérgico durante a infecção pelo vírus influenza em modelo murino”**. A banca examinadora foi constituída pelos professores: Dr. Alexandre de Magalhães Vieira Machado – IRR/FIOCRUZ MINAS (Orientador /Presidente), Dra. Jacqueline Araújo Fiúza – IRR/ FIOCRUZ MINAS (Titular) e Dr. Flávio Guimarães da Fonseca - UFMG (Titular). Após exposição, a candidata foi arguida oralmente pelos membros da banca tendo como resultado:

APROVADA

() APROVADA CONDICIONALMENTE: Quando o trabalho final necessitar de elaboração adicional ou revisões parciais.

() NÃO APROVADA

Uma vez encerrado o exame, eu, Dr. Alexandre de Magalhães Vieira Machado, presidente da banca, assino a presente ata e atesto a participação remota dos membros da Banca Examinadora. Belo Horizonte, 04 de setembro de 2020.

Dr. Alexandre de Magalhães Vieira Machado – IRR/FIOCRUZ MINAS (Orientador/Presidente)

Dra. Jacqueline Araújo Fiúza – IRR/ FIOCRUZ MINAS (Titular)

Dr. Flávio Guimarães da Fonseca – UFMG (Titular)

*Dedico este trabalho a
minha mãe, por abdicar dos
seus dias em função dos meus.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço ao meu orientador, Dr. Alexandre de Magalhães Vieira Machado pelos ensinamentos e por desprender parte do seu tempo na orientação deste trabalho, sempre cordial e preocupado com a minha formação.

Agradeço também ao professor Dr. Alexander Birbrair por auxiliar na orientação deste estudo e ao professor Dr. Remo Russo por ceder gentilmente o laboratório de Fisiologia Pulmonar e sua equipe para realização de parte dos experimentos.

Ainda, agradeço a aluna de doutorado, Ana Paula de Faria Gonçalves pela colaboração e participação fundamental neste trabalho.

Sou grata aos colegas do grupo de Imunologia de Doenças Virais e do laboratório de Imunopatologia por compartilharem sua rotina e conhecimento, pelos momentos de alegria e solidariedade proporcionados.

Também agradeço a coordenação de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou pela oportunidade de fazer parte do programa e as agências de fomento CNPq, CAPES e FAMIG pelo financiamento e apoio a pesquisa.

E principalmente agradeço a minha mãe pela dedicação e compreensão imensuráveis. Pela espera a noite, ansiosa para saber do meu dia. Por se orgulhar e ainda esperar mais a cada dia. Também não poderia deixar de agradecer a Angélica, por não me deixar caminhar sozinha, incentivar e apoiar a busca pela concretização dos meus objetivos. E por fim, agradeço a toda a minha família por ter crescido e viver em um ambiente de amor, carinho e respeito, entendendo as ausências nas reuniões familiares e pelo extenso apoio.

RESUMO

A infecção pelo vírus influenza pode provocar desde infecções assintomáticas, quanto casos graves de infecção respiratória, sendo frequentemente mortais, sobretudo em idosos. Nesse sentido, a infecção pelo vírus influenza ocasiona cerca de cinco milhões de casos graves no mundo, resultando em cerca de 500.000 mortes por ano. A gravidade da infecção está relacionada tanto com a resposta imune do hospedeiro quanto à virulência do patógeno. Nesse contexto, o sistema imune deverá atuar buscando a restauração da homeostase. Para isso, sua coordenação de forma sistêmica e, sobretudo, ao nível do trato respiratório é fundamental para a resolução das lesões causadas pela infecção. Um dos mecanismos chave que coordenam as ações da resposta imune é o Sistema Nervoso Simpático (SNS). Desse modo, o presente estudo teve como objetivo investigar a relevância e a integração da sinalização adrenérgica e o sistema imune por meio receptor β 2-AR durante infecção pelo vírus influenza A, adaptado a camundongo. Camundongos β 2 KO foram empregados como modelo de infecção com o vírus influenza adaptado a camundongos: A/PR8/34. Após 6 dias de infecção foi avaliada a mecânica pulmonar, contagem celular e proteínas no BALF, carga viral pulmonar e sobrevivência e peso. Embora não tenha sido observada diferença na carga viral, os animais β 2 KO apresentaram aumento do número de linfócitos e redução do número de neutrófilos no lavado bronco alveolar (BALF) e maior comprometimento das funções ventilatórias dos pulmões dos camundongos, quando comparado aos animais do grupo controle. Curiosamente, ainda que não haja diferença na perda de peso entre os animais β 2 KO em relação ao grupo controle, os animais do grupo β 2 KO apresentaram maior mortalidade quando inoculados com uma dose letal do vírus PR8. Desta forma, os achados obtidos são sugestivos de que o β 2-AR é relevante para mecanismos de ventilação pulmonar e possuem papel importante no recrutamento de células do sistema imune durante a resposta inflamatória no tecido pulmonar durante infecção pelo vírus influenza e finalmente, para a sobrevivência dos animais infectados.

Palavras-chave: vírus influenza, receptor β 2-AR, mecânica pulmonar.

ABSTRACT

Influenza A virus infection might cause a broad range of infections, from asymptomatic infections to severe and often deadly respiratory ones, especially in the elderly. In this sense, influenza virus infection causes about 5 million serious cases worldwide, resulting in around 500.000 deaths per year. The severity of the infection is related to the host immune response and to the virulence of the pathogen. In this context, the immune system must act to restore homeostasis. It plays a pivotal role at systemic level and above all, at the level of the respiratory tract, being fundamental for the resolution of the lesions caused by the infection. One of the key mechanisms that coordinate the actions of the immune response is the Sympathetic Nervous System (SNS). Thus, in the present study we aimed to investigate the relevance and integration of adrenergic signaling and the immune system during influenza A infection. β 2-AR knockout mice were infected with an influenza A virus adapted to mice: A/PR8/34. Six days after infection, it was evaluated lung mechanics, cell count and proteins quantification in the BALF, pulmonary viral load and survival and weight loss of the infected animals. Although no difference in viral load was observed after the infection, β 2 KO mice showed increased number of lymphocytes and a reduction in the number of neutrophils in the bronchial alveolar lavage (BALF). In addition, these animals showed greater impairment of the ventilatory functions of the lungs, when compared to animals from control group. Interestingly, although there is no difference in weight loss between β 2 KO mice and control group, β 2 KO knockout mice showed higher mortality when inoculated with a lethal dose of the PR8 virus. Overall, our findings suggested that β 2-AR is relevant for pulmonary ventilation mechanisms and play an important role in the recruitment of immune cells and, finally, for mice survival.

Keywords: Influenza A virus, β 2-AR receptor, lung mechanics.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Desenho esquemático do vírus influenza A	15
Figura 2 –	Modelo de transcrição primária de vRNA do vírus influenza	17
Figura 3 –	Diagrama de complacência pulmonar	18
Figura 4 –	Volumes respiratórios durante respiração normal e durante inspiração e expiração máximas	19
Figura 5 –	Transdução de sinal pelo receptor β -adrenérgico	22
Figura 6 –	Avaliação da mecânica pulmonar de camundongos infectados com vírus influenza	34
Figura 7 –	Contagem diferencial de leucócitos no BALF de camundongos infectados com vírus influenza	36
Figura 8 –	Total de proteínas mensuradas no BALF de camundongos infectados com vírus influenza	37
Figura 9 –	Carga viral e curva de sobrevivência de camundongos infectados com vírus influenza	38

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AMP – Monofosfato de adenosina

β 2-AR – Receptor β 2 adrenérgico

BALF - *Bronchoalveolar Lavage Fluid*

BIOP – Biotério de Produção

BSA – Albumina sérica bovina

CFTR – Condutância transmembrana da fibrose cística

cm – centímetros

CO₂ – Dióxido de carbono

DMEM – *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

EPM – Erro padrão da média

ENaC – Canal de sódio epitelial

GDP – Guanosina difosfato

GPCR – Receptor acoplado a proteína G

GTP – Guanosina trifosfato

H₂O – Água

HA – Hemaglutinina

IFN- γ – Interferon gama

IgG1 – Imunoglobulina G de classe 1

IL-2 – Interleucina 2

IL-4 – Interleucina 4

IL-6 – Interleucina 6

IP - Intraperitoneal

IRR – Instituto René Rachou

KO – *Knockout*

kDa - Quilodalton

LPS – Lipopolissacarídeo

MDCK - *Madin-Darby canine kidney cells*

µg - Microgramas
µL – Microlitros
mg – Miligrama
MHC-II – Complexo de histocompatibilidade de classe II
min – Minuto
mL – Mililitros
mm – Milímetros
mRNA – RNA mensageiro
NA – Neuraminidase
NK – *Natural Killer*
nm – Nanometros
NP - Nucleoproteína
NPC – Complexo do Poro Nuclear
NS2 – Proteína Não Estrutural 2
°C – Graus Celsius
PA – Polimerase Ácida
pb – Pares de base
PB1 – Subunidade polimerase PB1
PB2 – Subunidade polimerase PB2
PBS – *Phosphate-Buffered Saline*
PFU – Unidade Formada de Placa
PKA – Proteína cinase A
PRRs – Receptores de reconhecimento padrão
RNA – Ácido Ribonucleico
RNP – Ribonucleoproteico
RPM – Rotação por minuto
sec - Segundos
SFB – Soro Fetal Bovino
SNS – Sistema Nervoso Simpático
T CD4+ – Células T auxiliares

T CD8+ – Células T citotóxicas

TGF- β – Fator de crescimento transformante beta

Th1 – Células T auxiliares 1

Th2 – Células T auxiliares 2

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral alfa

TPCK - Tripsina

vRNA – RNA viral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Vírus Influenza A	15
1.1.1 Estrutura do genoma	16
1.1.2 Ciclo de replicação	16
1.1.3 Transcrição do RNA	16
1.1.4 Patogênese	17
1.2 Mecânica respiratória pulmonar	18
1.2.1 Complacência e resistência pulmonar	18
1.2.2 Volumes pulmonares	19
1.3 Receptor β 2-adrenérgico	20
1.3.1 Estrutura	21
1.3.2 Sinalização β 2-adrenérgica em epitélio alveolar	22
1.4 A importância dos receptores β 2-adrenérgicos na regulação imune	22
2 JUSTIFICATIVA	25
3 OBJETIVOS	26
3.1 Objetivo geral	26
3.2 Objetivos específicos	26
4 METODOLOGIA	27
4.1 Preparação do estoque viral	27
4.1.1 Cultivo celular	27
4.1.2 Amplificação viral	27
4.2 Manutenção dos animais	28
4.3 Inoculação viral em animais	28
4.4 Avaliação da mecânica respiratória	29
4.5 Coleta de lavado bronco alveolar (BALF - <i>bronchoalveolar lavage fluid</i>)	29
4.5.1 Contagem diferencial de leucócitos	29
4.5.2 Mensuração de proteínas no BALF	30
4.6 Avaliação da carga viral nos pulmões	30
4.7 Sobrevivência e peso	31
4.8 Análise estatística	31
5 RESULTADOS	32
5.1 Avaliação da mecânica pulmonar	32
5.2 Contagem diferencial de leucócitos no BALF	35

5.4 Carga viral pulmonar, curva de sobrevivência e peso	37
6 DISCUSSÃO	39
7 CONCLUSÃO	44
8 REFERÊNCIAS	45

1 INTRODUÇÃO

A infecção pelo vírus influenza pode provocar sérias complicações respiratórias, que se tornam mais importantes em grupos de risco, podendo levar esses indivíduos a óbito. Ainda, a infecção viral provoca cerca de 5 milhões de casos graves, de modo que decorrem em 500.000 mortes por ano (VASILEIOU et al., 2017).

Assim, o processo patológico provocado pela infecção do vírus influenza pode acarretar tanto infecções assintomáticas quanto infecções respiratórias graves. A gravidade da infecção está relacionada com a interação com o hospedeiro, a resposta imune e a virulência do patógeno (TAUBENBERGER; MORENS, 2008). Dessa forma, diante do exposto, pacientes idosos, crianças menores de dois anos, asmáticos, alérgicos e que possuem inflamação crônica no trato respiratório, ou ainda, que apresentem resposta imune polarizada para o tipo Th2 estão mais susceptíveis a complicações por influenza e a infecções bacterianas secundárias (VASILEIOU et al., 2017). Em contrapartida, durante a infecção por influenza, o RNA viral presente na célula hospedeira pode ser reconhecido por vários receptores de reconhecimento padrão (PRRs) que são capazes de induzir a secreção de Interferons do Tipo I produzidos principalmente por macrófagos, citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, com a finalidade de recrutar outras células, caracterizando uma resposta Th1 (RAJ et al., 2014). Desse modo, quando exacerbada, essa resposta mediada por fagócitos provocam a liberação de oxidantes e proteases que, por sua vez, provocam lesões teciduais no epitélio alveolar e no endotélio capilar (GALHARDO; MARTINEZ, 2003).

Nesse contexto, o sistema imune responderá buscando a restauração do equilíbrio. Para isso, sua coordenação de forma sistêmica se torna fundamental para a resolução do processo patogênico. Um dos mecanismos chave que coordenam as ações da resposta imune é o Sistema Nervoso Simpático (SNS). Assim foi demonstrado que os receptores adrenérgicos, abrangendo o β 2-adrenérgico (β 2-AR), que estão presentes no pulmão, sítio de infecção viral, também são expressos em diferentes células do sistema imune (KOLMUS et al., 2015). Ao mesmo tempo, o parênquima dos órgãos linfoides, que é innervado principalmente por neurônios simpáticos, libera noradrenalina nesses sítios poucas horas após o reconhecimento de antígenos (SANDERS, 2012).

1.1 Vírus Influenza A

O vírus Influenza A é pertencente à família *Orthomyxoviridae* e se caracteriza pela polaridade negativa dos segmentos de RNA que compõem seu genoma viral. Análises por microscopia eletrônica demonstram que o Influenza A possui forma esférica ou filamentosa, apresentando cerca de 100 nm de diâmetro e 300 nm de comprimento. Seus subtipos são definidos conforme o tipo de glicoproteínas em sua superfície, a Hemaglutinina (HA) e a Neuraminidase (NA) (BOUVIER; PALESE, 2008).

A HA é fundamental na interação entre a partícula viral e a célula hospedeira quando realiza ligações terminais α -2,6 ou α -2,3 com o ácido siálico presente na superfície celular. Por outro lado, a NA exerce um papel importante na liberação das partículas virais neoformadas da superfície da célula hospedeira ao clivar a ligação estabelecida entre a HA e o ácido siálico (MEDINA; GARCÍA-SASTRE, 2011). No envelope viral se encontra também a proteína M2 que compõe os canais iônicos presentes no vírus. Ainda, na partícula viral são encontradas outras proteínas não estruturais como a NS2 e as proteínas NP (nucleoproteína), subunidades da polimerase (PB1 e PB2) e PA (polimerase ácida), que formam o complexo ribonucleoproteico (RNP) (BOUVIER; PALESE, 2008) (FUJII et al., 2003) (KUIKEN et al., 2012) (Figura 1).

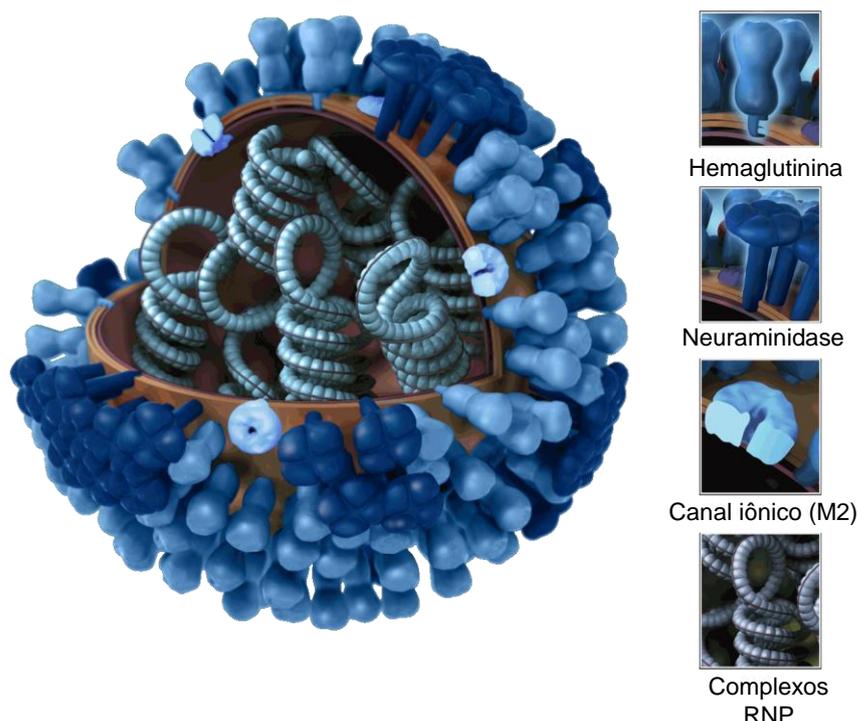


Figura 1 – Desenho esquemático do vírus influenza A. Fonte: adaptado de CDC, 2019.

1.1.1 Estrutura do genoma

O genoma viral é constituído de oito segmentos de vRNA de fita simples e polaridade negativa (HA, NA, M, NS, PA, PB1, PB2 e NP). Cada fita de vRNA está associada a um RNP, que apresenta em sua estrutura aproximadamente uma molécula de NP para cada 24 nucleotídeos (HUTCHINSON et al., 2010). O vRNA se encontra associado com a NP e ao complexo polimerase, constituído das proteínas PB1, PB2 e PA (EISFELD et al., 2014).

1.1.2 Ciclo de replicação

A infecção viral tem início quando a glicoproteína HA interage com a célula hospedeira por meio do receptor de membrana ácido siálico e o vírus é internalizado. Após a internalização, a vesícula endossomal é acidificada promovendo mudanças na conformação da HA, fundindo as membranas viral e endossomal, permitindo assim a liberação dos RNPs que migram para o citoplasma. Quando alcançam o citoplasma, os RNPs têm acesso ao núcleo através dos complexos do poro nuclear (NPC) e no compartimento nuclear, acontece a transcrição primária para produzir o RNA mensageiro (mRNA) viral, que é exportado novamente para o citoplasma e traduzido por meio dos ribossomos celulares (AARTJAN; FODOR, 2016). Posteriormente à tradução algumas proteínas são direcionadas para o núcleo (PB1, PB2, PA, NS2 e NP) e outras proteínas são direcionadas diretamente para a membrana plasmática (HA, NA e M2).

1.1.3 Transcrição do RNA

Após a penetração na célula hospedeira os RNPs são direcionados ao núcleo para iniciar a replicação do material genético viral. O início do processo de transcrição é dependente no *primer 5'-capped* da célula infectada e das proteínas do complexo polimerase viral, PB2 e PA (Figura 2). Assim, quando o domínio *cap* da proteína PB2 reconhece o RNA *capped* hospedeiro o domínio endonuclease da polimerase ácida (PA) o cliva. Em seguida, a extremidade 3' do *primer capped* é transferida pelo sítio ativo da endonuclease para o sítio ativo da polimerase. Dessa forma, o alongamento da fita é iniciado quando os nucleotídeos são adicionados na extremidade 3' do *primer capped* por complementariedade. Durante o alongamento a fita obtida e a fita molde irão sair por canais distintos e específicos (EISFELD et al., 2014).

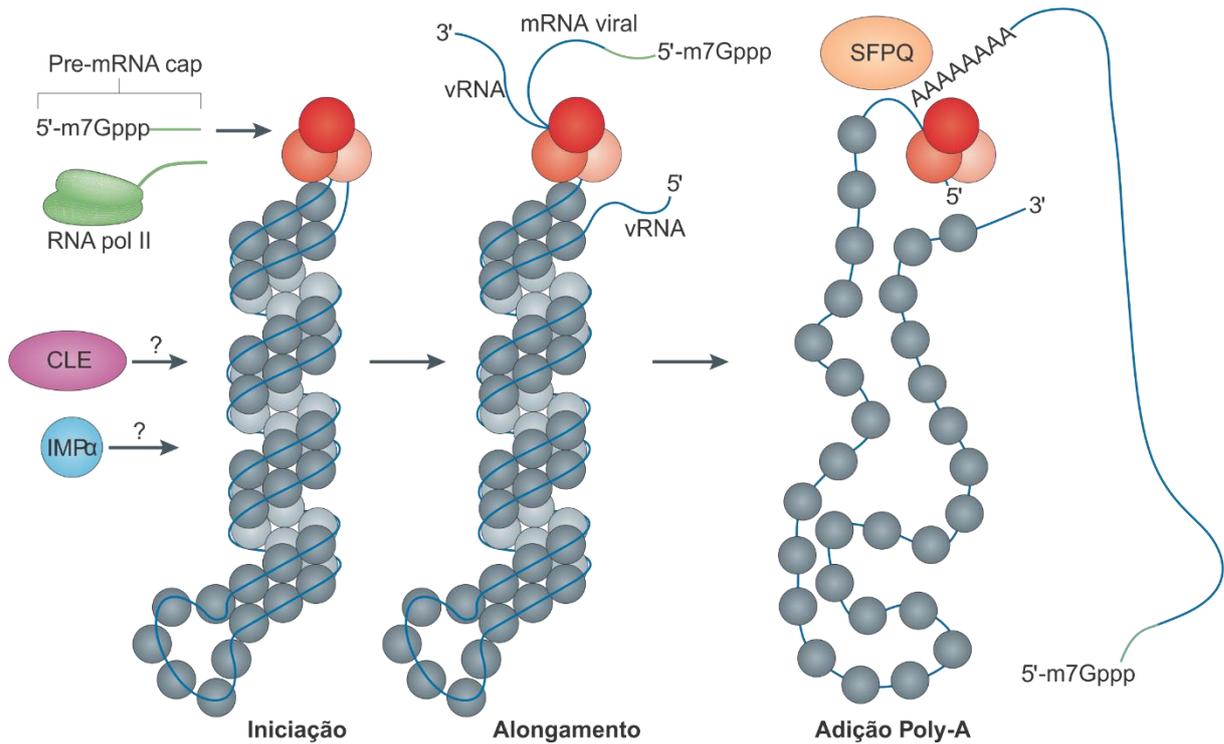


Figura 2 – Modelo de transcrição primária de vRNA do vírus influenza.

Fonte: adaptado de EISFELD, 2014.

1.1.4 Patogênese

O processo patológico provocado pela infecção do vírus influenza pode acarretar tanto infecções assintomáticas quanto infecções respiratórias graves. A gravidade da infecção está relacionada com a interação com o hospedeiro, a resposta imune e a virulência do patógeno (TAUBENBERGER; MORENS, 2008). Os mecanismos da resposta imune inata formam uma barreira importante de combate ao vírus. O RNA viral presente na célula hospedeira pode ser reconhecido por vários receptores de reconhecimento padrão (PRRs) que são capazes de induzir a secreção de Interferons do Tipo I produzidos principalmente por macrófagos, citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas. Assim, as quimiocinas produzidas no sítio da infecção são capazes de recrutar outras células imunes, como monócitos, neutrófilos e células *natural killer* (NK) (RAJ et al., 2014). Desse modo, quando exacerbada, essa resposta mediada por fagócitos provocam a liberação de oxidantes e proteases que provocam lesões teciduais no epitélio alveolar e no endotélio capilar podendo levar a morte do indivíduo (GARCIA et al., 2010).

1.2 Mecânica respiratória pulmonar

1.2.1 Complacência e resistência pulmonar

Na fisiologia respiratória a resistência pulmonar é definida como a resistência oferecida pelas vias aéreas frente a passagem de ar. Em contrapartida, a complacência pulmonar é descrita como a capacidade dos pulmões distenderem, e a elastância é a capacidade de retorno à posição de repouso (GRINNAN e TRUWIT, 2005). A complacência é determinada pela seguinte equação:

$$C = \frac{\Delta V}{\Delta P}$$

Onde, C representa a complacência, ΔV corresponde a variação do volume e ΔP representa a variação da pressão. Desse modo, a elastância é determinada pelo inverso da complacência. A complacência é determinada por medidas estáticas de pressão de distensão em diferentes volumes pulmonares e pode ser feita durante a inspiração ou expiração (GAAB et al, 2007). Essas medidas obtidas ao longo do ciclo respiratório permitem a construção da curva de pressão-volume observada na figura 3, as duas curvas são denominadas de curva de complacência inspiratória e expiratória. As características representadas neste gráfico são determinadas pelas forças elásticas pulmonares, que se dividem em duas partes: força elástica do tecido pulmonar propriamente dito e forças elásticas, provocadas pela tensão superficial do líquido que reveste os compartimentos alveolares (NELSON e COX, 2014)

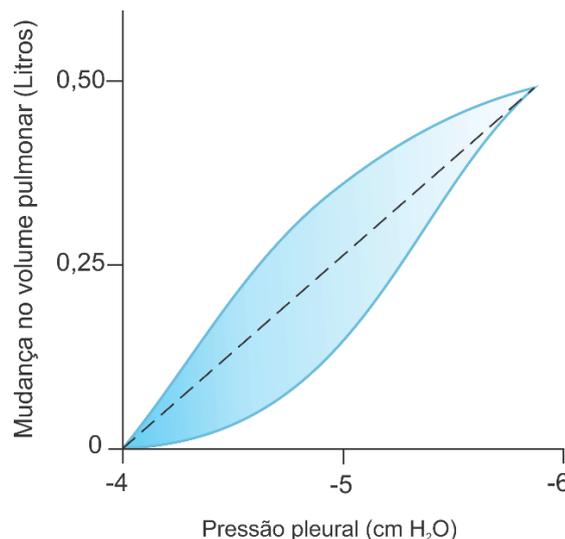


Figura 3 - Diagrama de complacência pulmonar. Fonte: adaptado de NELSON e COX, 2014.

1.2.2 Volumes pulmonares

O estudo da ventilação pulmonar é realizado por meio do registro do movimento de ar para o interior e exterior dos pulmões, conforme descrito anteriormente. Tais registros são importantes para determinar os parâmetros adotados durante a ventilação mecânica. Para fins didáticos, o fluxo de ar nos pulmões pode ser subdividido em quatro volumes e quatro capacidades. Quando somados, esses volumes equivalem ao volume máximo que os pulmões podem expandir (Figura 4) (GRINNAN e TRUWIT, 2005).

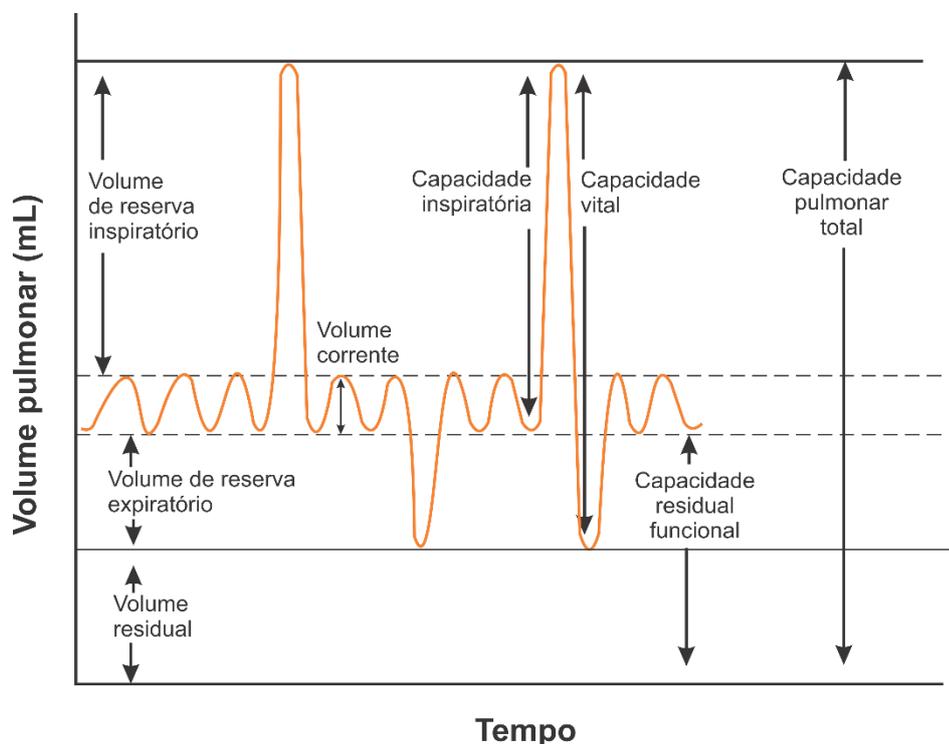


Figura 4 - Volumes respiratórios durante respiração normal e durante inspiração e expiração máximas. Fonte: adaptado de NELSON e COX, 2014.

O volume corrente é determinado como o volume de ar inspirado ou expirado, durante a respiração normal. E, o volume de reserva inspiratório é o volume extra de ar que pode inspirado, quando se inspira com força total, além do volume corrente, citado anteriormente. Em contrapartida, o volume de reserva expiratório é o volume máximo de ar que pode ser expirado na expiração forçada. Por fim, o volume residual é o volume de ar restante nos pulmões, após a expiração mais forçada (COSTA e JAMAMI, 2001).

1.2.3 Capacidades pulmonares

Quando esses eventos pulmonares são descritos, é levada em consideração a combinação de dois ou mais volumes citados anteriormente. As combinações obtidas recebem o nome de capacidades pulmonares. Dentre as mais importantes está a capacidade inspiratória, que é resultante da soma entre volume corrente e o volume de reserva inspiratório, que representa a quantidade de ar que pode ser respirada a partir do nível expiratório normal e distendendo os pulmões até o máximo. Por outro lado, a quantidade de ar restante nos pulmões, ao final da expiração, é chamada de capacidade residual funcional e corresponde ao volume de reserva expiratório e ao volume residual. A avaliação da capacidade vital também é muito importante, pois essa capacidade representa a quantidade máxima de ar que a pessoa pode expelir dos pulmões, após primeiro enchê-los à sua extensão máxima e então expirar, também à sua extensão máxima. Essa capacidade corresponde ao volume de reserva inspiratório somado ao volume corrente e ao volume de reserva expiratório. Por fim, a soma entre a capacidade vital descrita anteriormente e, o volume residual determinam a capacidade pulmonar total (NELSON e COX, 2014) (GLAAB et al, 2007).

1.3 Receptor β 2-adrenérgico

Os receptores acoplados a proteína G (GPCR) são amplamente conhecidos e considerados importantes alvos farmacológicos. Desse modo, cerca de 50% das drogas comercializadas foram produzidas para atuar em algum GPCR. Os receptores β -adrenérgicos são exaustivamente estudados e são considerados modelos de estudos em torno de GPCR. Os receptores β -adrenérgicos possuem três subtipos com funções distintas. O primeiro subtipo, o β 1-adrenérgico está envolvido com aumento da frequência e força de contração cardíaca, enquanto o β 2-adrenérgico (β 2-AR) desempenha um papel importante no relaxamento da musculatura lisa, participando dos processos de broncodilatação e vasodilatação. Por outro lado, o receptor β 3-adrenérgico estimula a lipólise e termogênese (KUROSE, 2004).

Essa classe de receptores responde às catecolaminas, compostos que possuem um núcleo catecol (anel benzênico com dois grupos hidroxil adjacentes) e

uma cadeia lateral amina. A noraepinefrina pode ser tomada como um importante exemplo de catecolamina em função da sua atuação como principal neurotransmissor do Sistema Nervoso Simpático (SNS). Nesse sistema os neurônios pós-ganglionares são fundamentalmente noradrenérgicos e liberam esse neurotransmissor que pode agir tanto em receptores α -adrenérgicos quanto em receptores β -adrenérgicos (RANG et al., 2011).

1.3.1 Estrutura

O receptor β 2-adrenérgico é codificado por uma única cópia de 1.200 pares de base (pb) localizada no braço longo do cromossomo 5 humano. A proteína traduzida apresenta 413 aminoácidos e peso molecular de aproximadamente 46,5 kDa (MUTLU; FACTOR, 2008). Esse receptor é classificado como um subtipo dos receptores β -adrenérgicos e pertence à superfamília dos receptores acoplados a proteína G, atuando por meio da estimulação da adenilil ciclase (KUROSE, 2004). Essa proteína integral de membrana possui sete hélices transmembranares e foi identificada na década de 1990, entretanto, os estudos estruturais foram iniciados apenas em 2007. Sabe-se que a proteína G apresenta três subunidades, (G_α , G_β e G_γ), e o receptor está em contato direto com G_α . Essa subunidade apresenta dois domínios distintos, onde um se relaciona com a família do receptor e o outro consiste em um pequeno domínio globular formado por α hélices. A interação entre esses domínios é estabelecida por sítios de interações de guanidinas (BANG; CHOI, 2015).

Apesar disso, não está totalmente elucidado se a proteína G em sua forma inativa ligada a molécula de GDP (Guanosina Difosfato) está pré-acoplada ao β 2-AR antes da ligação com o agonista. Por outro lado, sabe-se que a ligação do agonista torna o acoplamento do receptor na proteína G termodinamicamente mais estável (BANG; CHOI, 2015). Dessa forma, quando ocorre a ativação do complexo (Figura 3) a proteína G sofre alterações conformacionais substituindo a molécula de GDP pelo GTP (Guanosina Trifosfato), e promovendo a ativação da subunidade G_α que se dissocia e move-se em direção a adenilil-ciclase e canais de cálcio para propagar a sinalização (SHORE; MOORE, 2003).

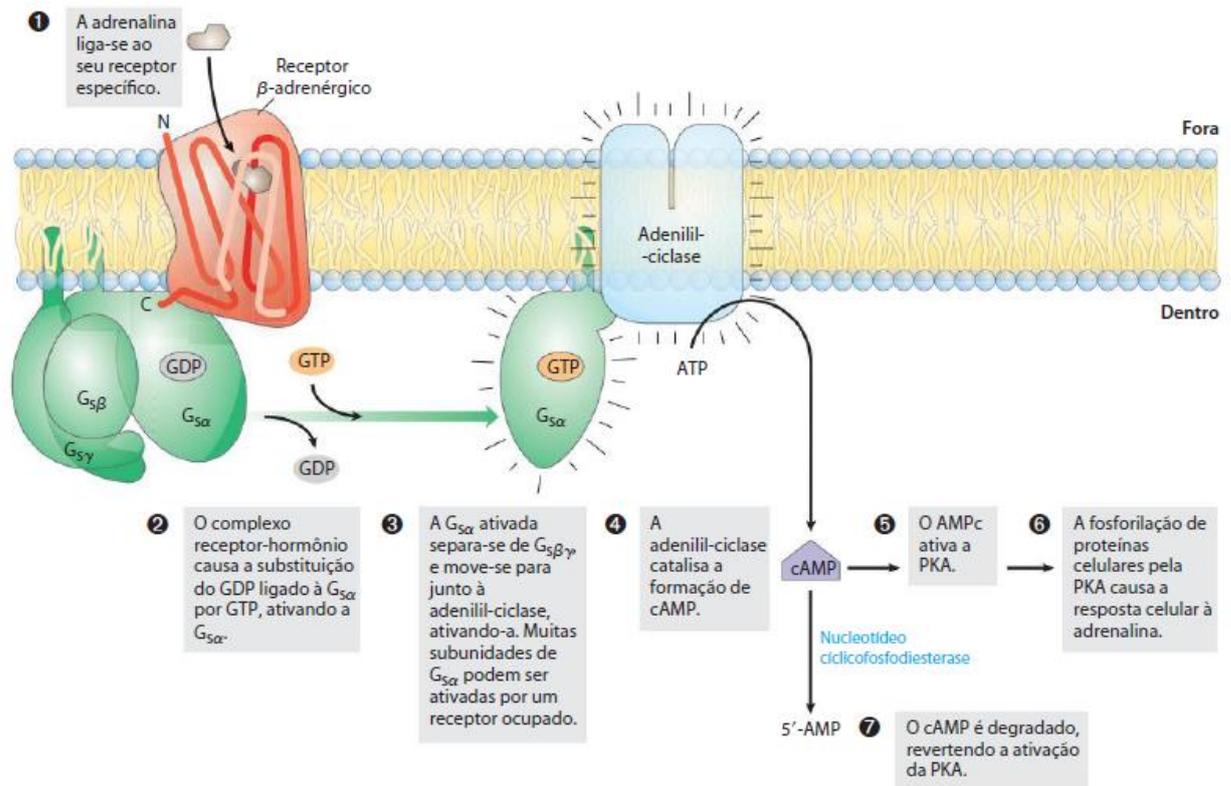


Figura 5 – Transdução de sinal pelo receptor β -adrenérgico. Ligação da adrenalina ao receptor com ativação da adenilil-ciclase. Fonte: Nelson e Cox, 2014.

1.3.2 Sinalização β 2-adrenérgica em epitélio alveolar

Quando a adenilil-ciclase é ativada há a formação de AMP (Monofosfato de adenosina) cíclico que ativa PKA (Proteína-quinase A) promovendo o relaxamento da musculatura por meio dos efeitos provocados nos canais de K^+ , Na^+/K^+ ATPase, sequestro de cálcio e sensibilização da miosina e formação de inositol trifosfato (IP_3) (SHORE; MOORE, 2003). A ativação do receptor aumenta o transporte de sódio ativo nos alvéolos, por meio de *up regulation* do canal de sódio epitelial (ENaC) e proteína reguladora da condutância transmembrana da fibrose cística (CFTR), assim como as bombas Na^+/K^+ ATPase. A ativação do receptor também aumenta a liberação de β -catenina e surfactante, o que pode ser importante no curso de processos inflamatórios no microambiente pulmonar (MUTLU; FACTOR, 2008).

1.4 A importância dos receptores β 2-adrenérgicos na regulação imune

O corpo necessita de manter o equilíbrio homeostático. O sistema imune atua de modo que esse balanço seja restaurado mediante lesões como infecções,

doenças autoimunes, alergias e o surgimento de células mutagênicas, por exemplo. É fundamental que a sua atuação seja coordenada de forma sistêmica para resolução do processo patogênico. Um dos mecanismos chave que coordenam as ações da resposta imune é o SNS. Desse modo, o parênquima dos órgãos linfoides é innervado principalmente por neurônios simpáticos que liberam noradrenalina nesses sítios poucas horas após o reconhecimento de antígenos (SANDERS, 2012). Além disso, foi demonstrado que os receptores adrenérgicos, abrangendo o β 2-AR são expressos em diferentes células do sistema imune como células B e T, células dendríticas e macrófagos e participam da imunorregulação (KOLMUS et al., 2015).

Segundo Wu e colaboradores (2018), a expressão de β 2-AR é predominante tanto em células T humanas quanto em murinas quando comparada com outros tipos de células imunes. Ainda, estudos sugerem que células T citotóxicas (T CD8⁺) expressam níveis significativos do receptor em comparação às células T auxiliares (T CD4⁺). Dessa forma, quando há ativação de β 2-AR o percentual de interferon- γ (IFN- γ) de células T citotóxicas é significativamente menor do que o IFN- γ de células T auxiliares. Ainda, o número de β 2-AR está elevado em T CD8⁺ de memória quando comparado as células *naïve*, sendo mais sensíveis à estimulação de catecolaminas e diminuindo a produção de citocinas. Dessa forma, um dos efeitos primários de tratamentos imunorreguladores, que buscam ativar β 2-AR consiste na inibição da produção de citocinas e capacidade efetora de células T CD8⁺, bem como na atividade de células NK (*natural killer*) que também expressam CD8. E, tratando-se de células T, foi sugerido que a estimulação de β 2-AR provoca a diminuição a produção de interleucina-2 (IL-2), IFN- γ , mas não impacta na produção de IL-4 em células murinas. Por outro lado, em células T humanas a ativação do receptor induz a produção de IL-2 e facilita a diferenciação em células Th2, promovendo o balanço Th1/TH2 durante processos inflamatórios (SANDERS, 2012).

Além disso, análises de cortes histológicos do baço de camundongos com deficiência de norepinefrina indicaram menor proliferação nos centros germinativos quando comparados a camundongos com níveis normais de norepinefrina. É importante salientar que esses centros são fundamentais para produção de IgG1 (Imunoglobulina G subclasse 1), de modo que, tais isotipos são importantes no combate a antígenos bacterianos como o *Streptococcus pneumoniae*. Corroborando com esses achados, na análise fenotípica desses animais foi observada a diminuição na expressão de CD86, molécula envolvida na formação do centro

germinativo. Ainda, normalmente células B não ativadas expressam pequenos níveis de CD86, que tendem a aumentar após a exposição ao antígeno e ligações cruzadas no seu receptor. Entretanto, a expressão é potencializada na presença de agonista de β 2-AR e permite maior interação dessas células com as células Th2, por meio da interação CD86-CD28, resultando em células Th2 ativadas e aumentando a secreção de IL-4 (SANDERS, 2012).

As células dendríticas expressam tanto receptores α -adrenérgicos quanto β -adrenérgicos. Entretanto, o β 2-AR é o receptor que apresenta efeitos primários na produção de citocinas e apresentação de antígenos nesse tipo celular. Existem trabalhos demonstrando que células dendríticas indiferenciadas tratadas com um isoproterenol (agonista) reduzem a expressão de CD86 e moléculas do complexo de histocompatibilidade de classe II (MHC-II), aumentam o englobamento de antígenos e a produção de interleucina-10 (IL-10), e ainda, impedem a ativação de células T e a secreção de citocinas pró-inflamatórias. Também, há evidências de que a ativação de β 2-AR por norepinefrina induz a migração das células dendríticas para órgãos do sistema imune, mas reduz a capacidade de apresentação de antígenos para ativação das células T (WU et al., 2018).

E se tratando de monócitos/macrófagos humanos a ativação do β 2-AR normalmente resulta em efeitos anti-inflamatórios, inibindo a produção de espécies reativas de oxigênio, redução da fagocitose e inibição da indução da resposta do macrófago induzida por LPS. Assim, os macrófagos são polarizados para M2 e promovem a expressão de citocinas do tipo 2, como IL-6 e TGF- β , de modo que, ao mesmo tempo reduz a expressão de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α (MARINO; COSENTINO, 2011).

2 JUSTIFICATIVA

Ainda que fundamentais na elucidação do papel fisiológico de β 2-AR, bem como suas aplicações enquanto alvo farmacológico, os estudos encontrados na literatura não exploraram o papel desse receptor no contexto de infecção pelo vírus influenza, principalmente quando o tecido pulmonar é tomado como principal sítio de infecção. Desse modo, é importante destacar que nesse órgão cerca de 90% dos receptores adrenérgicos estão localizados nos alvéolos e, embora estejam distribuídos uniformemente, há um predomínio de aproximadamente 70% de β 2-AR que, são expressos tanto em células alveolares do tipo I quanto do tipo II. Nesse cenário o β 2-AR pode ter um papel primordial na interação estabelecida entre o SNS e o sistema imune. Alguns trabalhos sustentam essa hipótese, demonstrando a expressão do β 2-AR em diferentes células do sistema imune como linfócitos B e T, células dendríticas e macrófagos e que sua ativação pode modular suas ações. Além disso, a sinalização adrenérgica por meio do β 2-AR no processo patológico viral deve ser inicialmente compreendida para sustentar novos estudos, o que pode ser feito com modelos murino, visando o entendimento da modulação imunológica mediada pelo receptor durante a infecção em pacientes de risco, como asmáticos e alérgicos que fazem uso de agonistas adrenérgicos.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar a relevância e a integração da sinalização adrenérgica e o sistema imune por meio do receptor $\beta 2$ adrenérgico durante infecção pelo vírus influenza A adaptado a camundongo.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar a influência do $\beta 2$ -AR em parâmetros respiratórios de camundongos infectados;
- Determinar o perfil de células imunes no lavado broncoalveolar de camundongos infectados, *knockout* ou não para $\beta 2$ -AR;
- Avaliar o papel do $\beta 2$ -AR na susceptibilidade e sobrevivência de camundongos infectados pelo vírus influenza.

4 METODOLOGIA

4.1 Preparação do estoque viral

4.1.1 Cultivo celular

Células MDCK (*Madin-Darby canine kidney cells*) foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) completo com alta concentração de glicose (DMEM *High Glucose*, 4500 mg/L, SIGMA) contendo 3,7g/L de bicarbonato de sódio (SIGMA), 50mg/L de HEPES (SIGMA) e 10 mL/L da solução de antibióticos estreptomicina e penicilina (SIGMA), pH 7,2. O meio foi suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (GIBCO) e a cultura celular mantida em estufa à 37°C e 5% de CO₂.

4.1.2 Amplificação viral

Para obter o estoque semente e o estoque trabalho do vírus A/PR8/34, inicialmente realizamos duas clonagens sucessivas por diluição limite em células MDCK. Para esse fim, o vírus foi diluído em série em meio DMEM com baixa concentração de glicose (DMEM *Low Glucose*, 1000 mg/L, SIGMA) e 10 mL/L da solução de antibióticos estreptomicina e penicilina (SIGMA), pH 7,2. Duzentos microlitros de cada diluição foram utilizados na infecção de monocamadas sub-confluentes de células MDCK (8×10^6 células/placa de 24 cavidades). Após 1 hora de adsorção, a 37°C e 5% CO₂, foram adicionados 800 µL de Meio de Amplificação (DMEM *Low Glucose* suplementado com 0,3 % de BSA (SIGMA), 4 µg/ml de tripsina TPCK (SIGMA), pH 7,2) em cada poço. As placas foram incubadas durante 72 horas a 37°C em uma estufa com 5% de CO₂. Os sobrenadantes dos poços de cultura celular correspondentes às maiores diluições nas quais observamos efeito citopático foram coletadas. Os sobrenadantes foram clarificados por centrifugação a baixa velocidade (150 x g, 5 minutos) em centrífuga refrigerada e congelados a -80°C.

Para preparação do estoque trabalho, placas de 96 cavidades contendo monocamadas sub-confluentes de MDCK (8×10^4 células/poço) foram infectadas com os sobrenadantes de segunda ampliação (diluídos 1.000 vezes). Um volume de 100 µL de suspensão viral diluída foi adicionada a cada poço da placa de cultura. A

adsorção foi realizada durante 1 hora a 37°C e 5% CO₂. Após esse intervalo, foram acrescentados 100µL de Meio de Amplificação (*DMEM Low Glucose* suplementado com 0,3 % de BSA (SIGMA), 4 µg/ml de tripsina TPCK (SIGMA), pH 7,2). Os sobrenadantes foram coletados após 72 horas, quando se observou o efeito citopático em pelo menos 75% da área da monocamada celular. Os sobrenadantes foram clarificados por centrifugação a baixa velocidade (150 x g, 5 minutos) em centrífuga refrigerada e congelados a -80°C. O Estoque Trabalho foi purificado por ultracentrifugação (100.000 x g, 4 °C, 2 h) em colchão sacarose 20% em PBS estéril. O vírus foi re-solubilizado em PBS também estéril, aliquotado e titulado.

4.2 Manutenção dos animais

Camundongos C57BL/6 e β2 *Knockout* (KO), de 8 a 12 semanas de idade, machos e fêmeas foram adquiridos junto ao Biotério de Produção (BIOP) do Instituto René Rachou. Esses animais utilizados nos experimentos descritos a seguir foram monitorados duas vezes ao dia, durante toda a execução dos experimentos. Durante o trabalho foi feito um programa de enriquecimento ambiental, a fim de minimizar o *stress* e garantir o bem estar animal.

4.3 Inoculação viral em animais

Camundongos C57BL/6 machos e β2 KO de 7 ou 8 semanas foram anestesiados por via intra-peritoneal (IP) com Ketamina 100 mg/kg e Xilazina 10 mg/kg misturados na mesma seringa. Essa mistura foi preparada a partir de soluções comerciais de cloridrato de ketamina (10%) e cloridrato de xilazina (2%) disponíveis no Biotério de Experimentação do IRR, as quais foram diluídas em PBS. A solução anestésica foi injetada na cavidade peritoneal, no quadrante inferior direito do abdome com o animal contido pelo dorso. O tamanho das agulhas utilizadas foi de 25 x 0,5 mm. A profundidade anestésica foi avaliada por meio da presença ou ausência de sinais como reflexo da cauda, reflexo palpebral e corneal e das frequências cardíaca e respiratória. Nove camundongos C57BL/6 e oito β2 KO receberam por via intranasal uma dose subletal do vírus A/PR8/34, diluídos em 40 µL de PBS e os respectivos controles (cinco animais) receberam o mesmo volume de PBS.

4.4 Avaliação da mecânica respiratória

Seis dias após a inoculação viral os camundongos foram anestesiados com uma injeção subcutânea de Ketamina (8,5 mg/kg) e Xilazina (130 mg/kg) para manter a respiração espontânea durante a anestesia. O tamanho das agulhas utilizadas foi de 25 x 0,5 mm. A profundidade anestésica foi avaliada por meio da presença ou ausência de sinais como reflexo da cauda, reflexo palpebral e corneal e das frequências cardíaca e respiratória. Os camundongos anestesiados foram desinfetados com solução de etanol 70% para incisão na pele e separação da glândula submaxilar e a camada muscular que o recobria. Foi realizado um corte entre dois anéis de cartilagem da traqueia em seu terço superior próximo a laringe para adequada inserção da cânula (1,7 mm) e adequação na câmara, com superfície aquecida, para manter a temperatura corpórea, no pletismógrafo acoplado ao software que usa a pressão negativa para impulsionar a expiração forçada (*Forced Pulmonary Maneuver System®*, Buxco Research Systems, Wilmington, North Carolina USA) (NOGUEIRA et al., 2016). Durante o procedimento o animal foi alinhando ao ventilador, garantindo que a cânula traqueal estivesse no mesmo nível do ventilador para evitar oclusão da cânula ou torção traqueal. Esse experimento mensurou diretamente o fluxo de ar e pressão pulmonar para computar a resistência e complacência pulmonar dos grupos experimentais. Esse protocolo foi realizado no laboratório de Fisiologia Pulmonar sob supervisão do Dr. Remo de Castro Russo que possui amplo conhecimento na técnica.

4.5 Coleta de lavado bronco alveolar (BALF - *bronchoalveolar lavage fluid*)

O BALF foi coletado após exposição da traqueia para canulação por meio da introdução de uma cânula (1,7 mm) acoplada em uma seringa de 1,0 mL lavando-se os pulmões duas vezes com 1 mL de PBS gelado. O líquido recuperado foi mantido no gelo até centrifugação (180 x *g* por 10 minutos a 4 °C) (GARCIA et al., 2010). O *pellet* de células foi utilizado para contagem total e diferencial de leucócitos conforme descrito a seguir.

4.5.1 Contagem diferencial de leucócitos

Após a centrifugação as células foram ressuspensas em uma solução estéril de PBS contendo 3% de BSA. Em seguida 10 µL da suspensão foram diluídos em 90 µL de Azul de Tripán para contagem em Câmara de Neubauer. Em seguida, um

volume da suspensão correspondente a 5.000 eventos foi pipetado e posteriormente adicionou-se 100 μ L da solução de BSA 3% e todo o conteúdo foi dispensado no suporte contendo a lâmina e o papel de filtro. Em seguida esse conjunto foi centrifugado a 50 x g por 5 minutos e ao término da secagem por 16 horas (*overnight*) as lâminas foram coradas com eosina e hematoxilina para contagem celular. As células foram diferenciadas entre macrófagos, neutrófilos e linfócitos.

4.5.2 Mensuração de proteínas no BALF

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

4.6 Avaliação da carga viral nos pulmões

Inicialmente o camundongo sob anestesia foi posicionado em decúbito dorsal e utilizou-se etanol 70% para realizar a assepsia da região torácica. Com o auxílio de uma pinça e tesoura cirúrgica estéril foi realizada a incisão na região do mediastino. Após a retirada da porção anterior da caixa torácica, a perfusão do pulmão foi realizada pela injeção de 5,0 mL de PBS estéril pelo átrio direito do animal. Em seguida o lobo superior esquerdo do pulmão foi coletado para determinação da carga viral. O tecido pulmonar foi macerado (50 hertz por 2 minutos) em PBS respeitando a proporção de 10 μ L/mg de tecido e centrifugado por 10 min a 6.500 g a 4 °C. O sobrenadante foi diluído sucessivamente em meio DMEM *Low Glucose*. Em seguida, as monocamadas de células MDCK em placas de cultura (seis poços) foram infectadas com 400 μ L das diluições e incubadas em estufa com CO₂ durante uma hora para adsorção. Após esse tempo, foram adicionados 4 mL de meio de cultura DMEM *Low Glucose* suplementado com 0,3% de BSA, 2 μ g/mL de tripsina e 1% de agarose. As placas foram incubadas a 37°C e 5% de CO₂ por 72 horas. Após a incubação as placas foram fixadas com uma solução de formaldeído e

coradas com cristal violeta para visualização e contagem das placas de lise formadas na monocamada.

4.7 Sobrevivência e peso

Oito camundongos C57BL/6 e $\beta 2$ KO receberam por via intranasal o inóculo de 250 PFU do vírus A/PR8/34, diluídos em 40 μ L de PBS e os respectivos controles (cinco animais) receberam o mesmo volume de PBS conforme os procedimentos de contenção e anestesia descritos anteriormente. A mortalidade e o peso dos animais foram acompanhados por 21 dias. Os animais que perderam mais de 25% do peso corporal, foram inoculados por via IP com uma dose letal dos anestésicos Ketamina e Xilazina.

O estabelecimento desse “*endpoint*” se justifica pelo fato de que os camundongos são capazes de sobreviver à infecção pelo vírus influenza, mesmo quando a perda de peso é significativa (NOBS et al., 2016). É importante salientar que outros sinais clínicos foram observados em camundongos com vírus influenza. Eles incluem: pelo eriçado, hipotermia, andar encurvado, anorexia e, nos casos mais graves, letargia e dificuldade respiratória.

4.8 Análise estatística

Os resultados foram representados como média erro padrão da média (EMP). As diferenças foram avaliadas por comparação por meio da análise de variância (ANOVA) utilizando-se o teste de *Kruskal-Wallis* seguido de pós-teste de *Dunn*. Os resultados foram apresentados com * $p < 0,05$, ** para $p < 0,01$ e *** para $p < 0,001$ quando comparados aos grupos não infectados ou quando comparados entre os grupos assinalados (—). O teste de *LogRank* foi utilizado para comprar a sobrevivência dos camundongos. Os gráficos foram construídos no software GraphPad PRISM 5.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da mecânica pulmonar

Com o objetivo de elucidar o papel do receptor $\beta 2$ durante a infecção pelo vírus influenza, alguns parâmetros respiratórios foram mensurados no sexto dia após a infecção, por meio de manobras que exercem pressão negativa, contribuindo para a expiração forçada do animal. Dessa forma, após mensurar a resistência e complacência dinâmica outros parâmetros puderam ser obtidos de forma direta ou indireta, de modo que eles podem ser correlacionados com estado patológico dos grupos em estudo. Os resultados obtidos da análise de resistência pulmonar indicaram que os animais $\beta 2$ KO infectados apresentaram maior resistência (1,275 cm H₂O x sec/mL), quando comparados aos animais C57BL/6 também infectados (0,973 cm H₂O x sec/mL) (Figura 3A). Por outro lado, não foi observada diferença na resistência pulmonar entre os animais $\beta 2$ KO e C57BL/6 não infectados (grupos controle), que apresentaram 0,717 e 0,706 cm H₂O x sec/mL, respectivamente. Em relação à variação da resistência pulmonar (Figura 3B), foi observado diferença estatisticamente significativa entre os camundongos $\beta 2$ KO infectados, que possuem variação de 0,373 cm H₂O x sec/mL, em relação aos animais C57BL/6 infectados (0,140 cm H₂O x sec/mL). Resultado similar foi observado entre os animais $\beta 2$ KO infectados, quando comparados aos animais $\beta 2$ KO e C57BL/6 não infectados, que apresentaram 0,076 e 0,129 cm H₂O x sec/mL.

A complacência também é um dos parâmetros comumente utilizado para a avaliação da mecânica pulmonar, de modo que, permite avaliar a elasticidade do órgão. Foi possível observar que os grupos infectados apresentaram menor complacência ($\beta 2$ KO: 0,0158 cm H₂O x sec/mL; C57BL/6: 0,022 cm H₂O x sec/mL) em relação aos grupos não infectados ($\beta 2$ KO: 0,0384 cm H₂O x sec/mL; C57BL/6: 0,041 cm H₂O x sec/mL) (Figura 3C). Além disso, também foi possível observar que a redução da complacência no grupo $\beta 2$ KO infectado foi mais pronunciada no grupo C57BL/6 ($p < 0,5$). Os dados obtidos na avaliação da mecânica pulmonar dos animais demonstraram que o grupo de animais $\beta 2$ KO infectados apresentaram menor capacidade vital forçada (CVF) (0,771 mL) quando comparado ao grupo de animais C57BL/6 também infectados (0,899 mL) (Figura

3D). Além disso, os valores encontrados para os grupos infectados se mostraram menores que os valores encontrados para os animais não infectados, $\beta 2$ KO e C57BL/6, que apresentaram 1,1308 e 1,127 mL, respectivamente.

Ao aferir o volume pulmonar por minuto, também ficou constatado que os pulmões dos camundongos $\beta 2$ KO infectados apresentaram menor volume (24,170 mL/min) quando comparado aos camundongos C57BL/6 infectados (30,324 mL/min) (Figura 3E). Resultado similar foi observado quando se comparou os animais infectados aos seus respectivos grupos controle, $\beta 2$ KO (35,844 mL/min) e C57BL/6 (37,401 mL/min). Do mesmo modo, os dados do volume expiratório forçado (Figura 3F) apresentaram tendência semelhante, onde quando infectados, o grupo $\beta 2$ KO demonstra volume expiratório de 0,685 mL e o grupo C57BL/6 0,827 mL. Igualmente, os grupos controles apresentam maior volume expiratório, 1,033 e 1,044 mL, para $\beta 2$ KO e C57BL/6, respectivamente. Por fim, quando foi analisada a razão entre o volume expiratório forçado e a capacidade vital forçada (Índice *Tiffeneau-Pinelli*) (Figura 3G) foi visto que os animais $\beta 2$ KO infectados possuem razão de 0,825, reduzida quando comparada a razão de 0,893 dos animais C57BL/6 também infectados e, também em comparação aos animais não infectados, 0,955 e 0,975, para $\beta 2$ KO e C57BL/6.

Desta forma, nosso conjunto de dados sugerem que durante a infecção pelo vírus influenza os camundongos $\beta 2$ KO apresentam maior comprometimento das funções respiratórias.

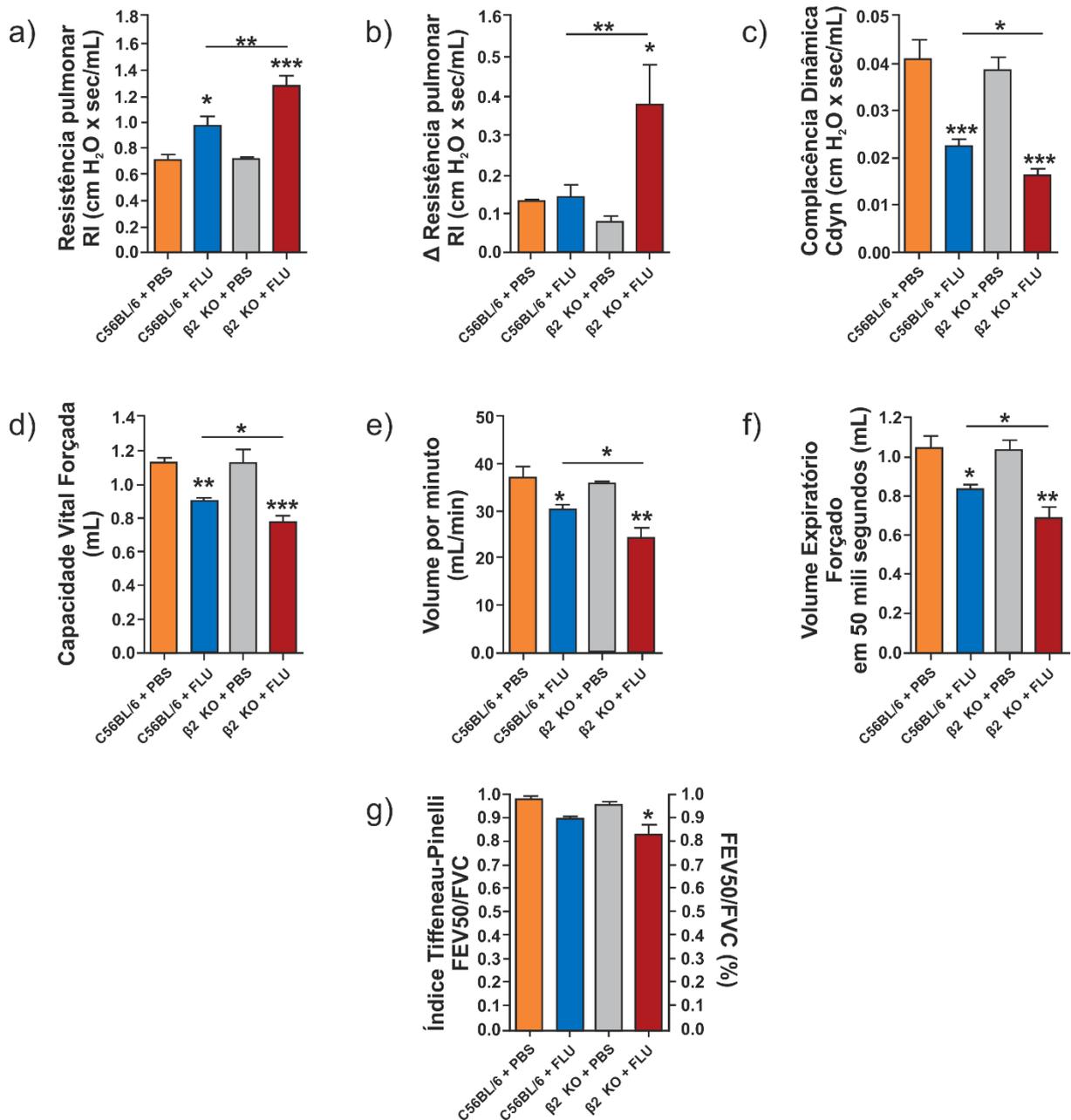


Figura 6 - Avaliação da mecânica pulmonar de camundongos infectados com vírus influenza. Grupos de oito animais $\beta 2$ KO e C57BL/6 infectados com 250 PFU do vírus A/PR8/34 (FLU) e seus respectivos grupos controle (PBS) tiveram a função mecânica pulmonar avaliadas no 6º dpi. Os parâmetros avaliados foram a) resistência pulmonar, b) Δ resistência pulmonar, d) capacidade vital forçada, e) volume pulmonar, f) volume expiratório forçado e g) Índice *Tiffeneau-Pinelli*. O teste de *Kruskal-Wallis* foi aplicado seguido de pós-teste de *Dunn*. Os resultados apresentam a média \pm EPM e foram representados com * $p < 0,05$, ** para $p < 0,01$ e *** para $p < 0,001$ quando comparados aos grupos não infectados ou quando comparados entre os grupos assinalados ().

5.2 Contagem diferencial de leucócitos no BALF

As células recuperadas no lavado broncoalveolar foram diferenciadas entre macrófagos, neutrófilos e linfócitos após coloração HE e observação em microscópio óptico. Conforme esperado, a contagem total de leucócitos (Figura 4A) estava aumentada nos grupos infectados, quando comparados com seus respectivos grupos controle ($p < 0,01$). Foi possível observar nível de celularidade similar entre os grupos infectados, onde o grupo de animais $\beta 2$ KO apresentaram $11,41 \text{ células} \times 10^5/\text{mL}$ e o grupo de animais C57BL/6 apresentaram $12,53 \text{ células} \times 10^5/\text{mL}$. Do mesmo modo, os grupos controles, também apresentaram contagem de celular semelhante.

A contagem do número de macrófagos presentes no BALF demonstrou um aumento dessa subpopulação celular durante a infecção por influenza, tanto para os animais $\beta 2$ KO quanto para os C57BL/6 (Figura 4B).

Embora não tenha sido observada diferença na contagem total de leucócitos, foi possível observar diferenças estatisticamente significativas em relação às subpopulações de leucócitos. Animais $\beta 2$ KO apresentaram redução da população de neutrófilos (Figura 4C), quando comparado aos camundongos C57BL/6 também infectados $3,72 \times 10^5/\text{mL}$ e $6,07 \times 10^5/\text{mL}$, respectivamente. Por outro lado, conforme pode ser observado na Figura 4D, os animais $\beta 2$ KO infectados apresentaram um aumento de 3,5 vezes na contagem de linfócitos, em relação ao grupo C57BL/6 infectado ($0,14 \times 10^5/\text{mL}$ vs. $0,04 \times 10^5/\text{mL}$).

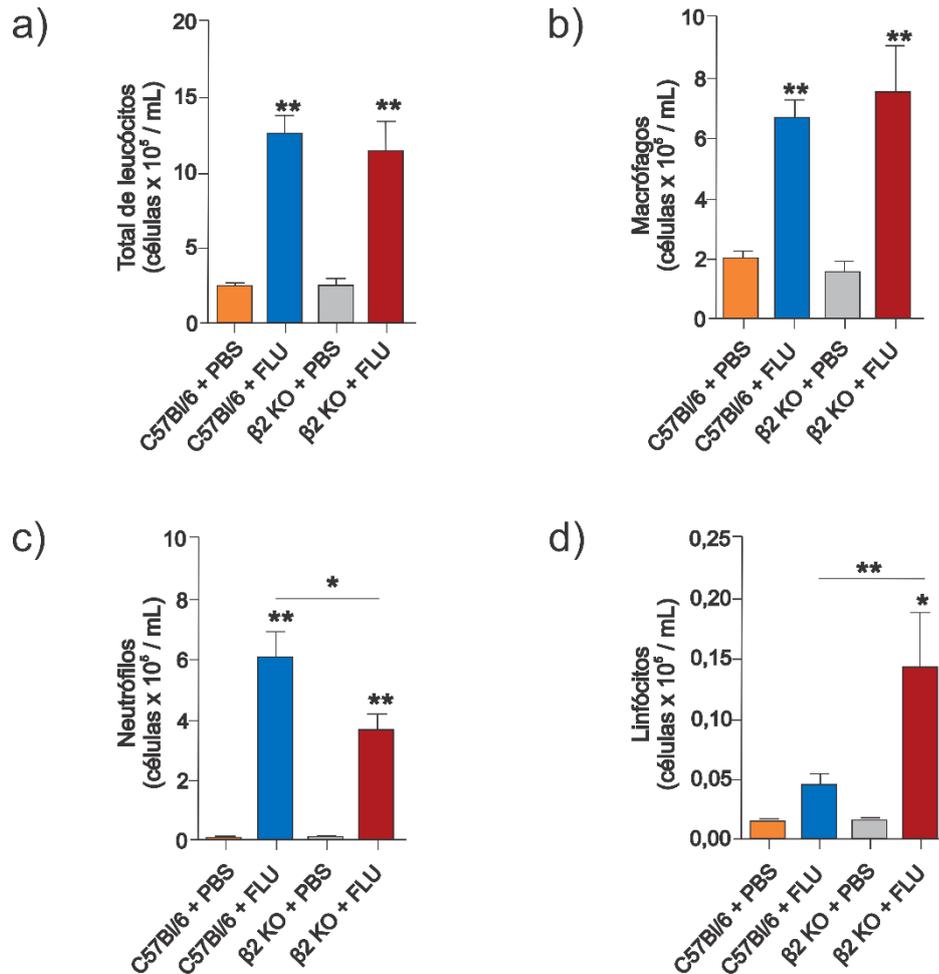


Figura 7 - Contagem diferencial de leucócitos no BALF de camundongos infectados com vírus influenza. Grupos de oito animais β2 KO e C57BL/6 infectados com 250 PFU do vírus A/PR8/34 (FLU) e seus respectivos grupos controle (PBS) tiveram o BALF coletado no 6 dpi. A contagem total de leucócitos (a) foi diferenciada em macrófagos (b), neutrófilos (c) e linfócitos (d). O teste de *Kruskal-Wallis* foi aplicado seguido de pós-teste de *Dunn*. Os resultados apresentam a média ± EPM e foram representados com * $p < 0,05$ e ** para $p < 0,01$ quando comparados aos grupos não infectados ou quando comparados entre os grupos assinalados (—).

5.3 Mensuração de proteínas no BALF

Proteínas foram mensuradas pelo método de Bradford em amostras clarificadas do BALF coletado no sexto dia após a infecção, tanto para os grupos infectados com A/PR/8/34 quanto para os seus respectivos controles não infectados (PBS). A mensuração das proteínas demonstrou que o exsudato recuperado do grupo β2 KO infectado tem maior quantidade de proteínas com concentração média de 1,37 mg/mL, quando comparado ao grupo C57BL/6 também infectado, com concentração média de 0,90 mg/mL (Figura 5).

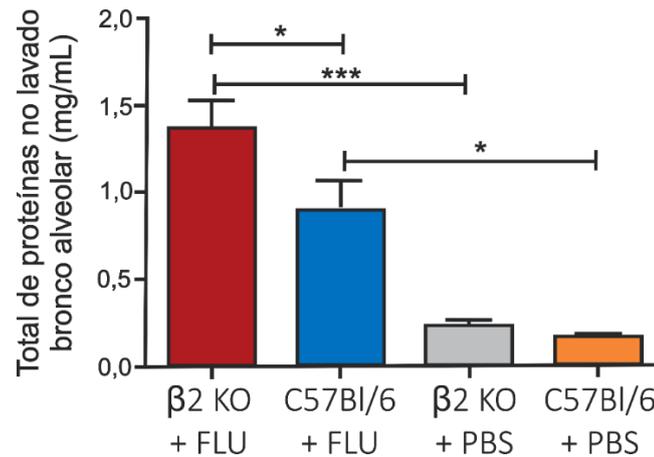


Figura 8 - Total de proteínas mensuradas no BALF de camundongos infectados com vírus influenza. Grupos de oito animais β2 KO e C57BL/6 infectados com 250 PFU do vírus A/PR8/34 (FLU) e seus respectivos grupos controle (PBS) tiveram o BALF coletado no 6º dpi. As proteínas foram mensuradas pelo método de Bradford em amostras clarificadas. O teste de *Kruskal-Wallis* foi aplicado seguido de pós-teste de *Dunn*. Os resultados apresentam a média ± EPM e foram representados com * $p < 0,05$, ** para $p < 0,01$ e *** para $p < 0,001$ quando comparados aos grupos não infectados ou quando comparados entre os grupos-assinalados ().

Por outro lado, conforme esperado, não foi observada diferença significativa entre os grupos controles, inoculados apenas com PBS, que apresentaram níveis basais de proteínas (0,23 e 0,17 mg/mL, para os animais β2 KO e C57BL/6, respectivamente).

5.4 Carga viral pulmonar, curva de sobrevivência e peso

Os animais infectados foram anestesiados conforme descrito na seção de metodologia, e em seguida foi realizada a perfusão e coleta dos pulmões dos camundongos. Os pulmões foram então macerados em PBS e diluições seriadas do sobrenadante foram tituladas em monocamada de células MDCK, sob agarose (1%). O resultado da titulação evidenciou que não houve diferença entre a carga viral dos grupos β2 KO e C57BL/6 infectados no 6º dpi (Figura 6A). Do mesmo modo, foi observado que os animais infectados não apresentaram diferença significativa em relação à perda de peso. A perda de peso iniciou-se no segundo dia após a infecção e se acentuou a partir do terceiro dia após a infecção (Figura 6B).

Em paralelo, acompanhamos a sobrevivência e perda de peso de animais β2 KO e C57BL/6 (Figuras 6C e 6D) infectados com a dose de 250 PFU do vírus A/PR8/34, durante 21 dias. Em relação à sobrevivência dos animais, foi possível observar que os animais β2 KO são mais susceptíveis a infecção pelo vírus

influenza, visto que, todos os animais do grupo C57BL/6 sobreviveram a infecção e 37,5% dos animais $\beta 2$ KO morreram.

Apesar da diferença na taxa de sobrevivência dos grupos infectados pelo vírus influenza, os camundongos não apresentaram diferença no peso corpóreo. Ambos os grupos infectados apresentaram perda de peso em relação aos seus respectivos grupos controle. Essa perda de peso iniciou-se no terceiro dia após a infecção com perda crescente até o décimo dia após a infecção. É possível notar que a partir do décimo primeiro dia os grupos infectados começaram a recuperar o peso perdido (Figura 4D). Deste modo, os dados apresentados sugerem que os animais $\beta 2$ KO sucumbem mais rápido quando infectados.

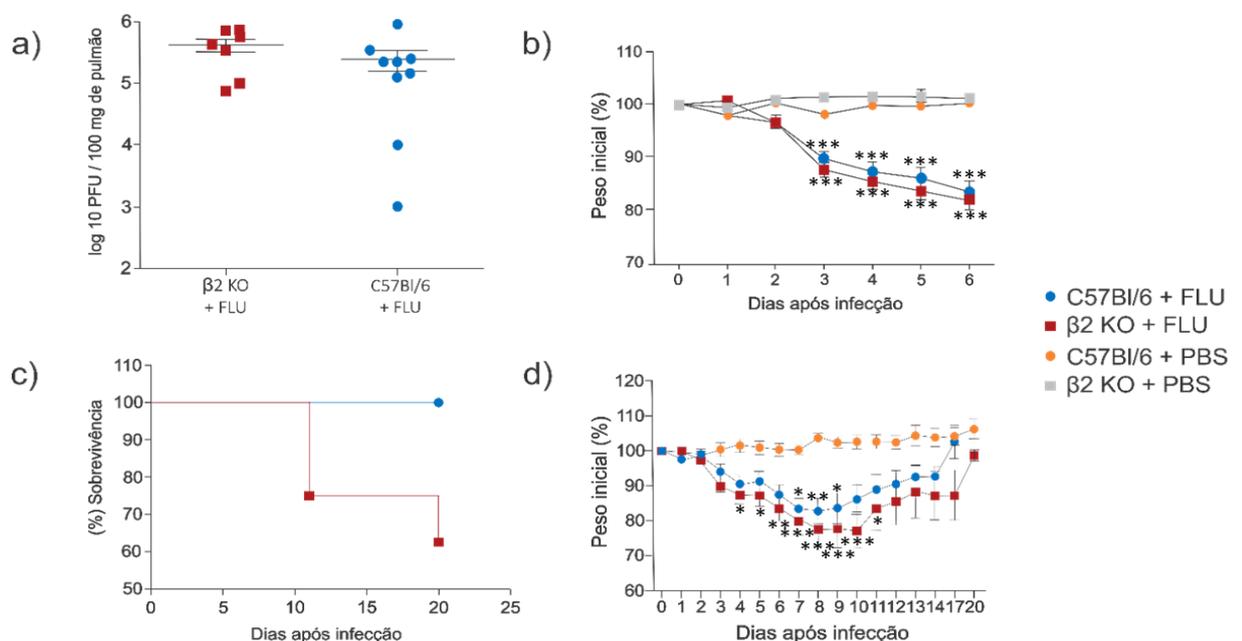


Figura 9 - Carga viral e curva de sobrevivência de camundongos infectados com vírus influenza. a) Grupos de oito animais $\beta 2$ KO e C57BL/6 infectados com 250 PFU do vírus A/PR8/34 (FLU) e seus respectivos grupos controle (PBS) tiveram o pulmão coletado no 6^o dpi, após processamento a carga viral foi quantificada em titulação por placa de lise em monocamadas de células MDCK sob agarose. b) O peso dos mesmos animais citados anteriormente foi acompanhado até o momento da eutanásia (6 dpi), c) e d) Grupos de oito animais $\beta 2$ KO e C57BL/6 infectados com 250 PFU do vírus A/PR8/34 (FLU) e seus respectivos grupos controle (PBS) tiveram a sobrevivência e perda de peso acompanhados por 21 dias O teste de *Kruskal-Wallis* foi aplicado seguido de pós-teste de *Dunn*. Os resultados apresentam a média \pm EPM e foram representados com * $p < 0,05$, ** para $p < 0,01$ e *** para $p < 0,001$ quando comparados aos grupos não infectados.

6 DISCUSSÃO

Estima-se que anualmente o vírus influenza provoque de 3 a 5 milhões de infecções clínicas graves e seja responsável por 250.000 a 500.000 óbitos no mundo (SANDT et al., 2012). A infecção pelo vírus acarreta uma doença cuja gravidade pode variar desde infecções assintomáticas, passando por infecções do trato respiratório inferior, cuja evolução é frequentemente fatal. Nesse sentido, é importante salientar que a gravidade das infecções pelo vírus influenza está tanto relacionada a fatores de virulência virais, dentre os quais aqueles relacionados às proteínas HA, PB2 e NS quanto àqueles ligados ao hospedeiro, mais especificamente à resposta excessiva ou desbalanceada do sistema imunológico (KUIKEN et al, 2012). Dentre os fatores ligados ao hospedeiro também se destaca o papel do Sistema Nervoso Simpático que de certo modo pode regular o sistema imune por meio dos receptores adrenérgicos.

Ainda, especificamente nos alvéolos há 90% dos receptores adrenérgicos do pulmão, com predomínio de 70% dos receptores β 2-AR (MUTLU e FACTOR, 2008). Segundo Irvin e Bates (2003), a capacidade pulmonar total de um camundongo chega a cerca de 1,0 mL e o seu parênquima ocupa aproximadamente 18% do órgão. Desse modo, avaliar as funções pulmonares, no contexto de infecção por um vírus respiratório, na presença e ausência do receptor β 2-AR mostra-se fundamental para elucidar o papel do receptor durante a ventilação.

Avaliamos as funções pulmonares em animais anestesiados e traqueostomizados que, embora invasivo, é um método clássico, acurado, sensível e específico para monitoramento de parâmetros respiratórios mecânicos (GLAAB et al, 2007). Nossos resultados demonstraram que os camundongos β 2 KO desenvolvem maior resistência pulmonar (1,275 cm H₂O x sec/mL) e que eles apresentam maior variação na presença da infecção por influenza. A resistência pulmonar é caracterizada pela resistência do trato respiratório à passagem do ar e é dada pela diferença de pressão de ar sobre o volume do fluxo de ar (GLAAB et al, 2007). Devos e colaboradores (2017), desenvolveram modelos de lesões pulmonares, como asma, fibrose e enfisema em camundongos BALB/c e encontraram valores de resistência inferiores a 0,4 cm H₂O x sec/mL.

Utilizando esses modelos, os autores também avaliaram a complacência e demonstram com os modelos propostos que as complacências encontradas para as respectivas lesões ficaram entre 0,03 e 0,09 cm H₂O/mL. Em nosso estudo, os

camundongos $\beta 2$ KO infectados apresentaram complacência de 0,0158 cm H₂O x sec/mL. Segundo Nelson e Cox (2014), a complacência pulmonar é definida pelo grau de extensão dos pulmões por cada unidade de aumento da pressão transpulmonar. Desse modo, a complacência é determinada por forças elásticas do tecido pulmonar propriamente dito e forças provocadas pela tensão superficial do líquido que reveste as paredes internas dos alvéolos e outros compartimentos pulmonares.

Assim, a quantificação de proteínas no lavado broncoalveolar vão de encontro ao exposto anteriormente, demonstrando que os animais infectados possuem maior concentração de proteínas no líquido recuperado que os grupos controles e, ainda os animais $\beta 2$ KO infectados (1,37 mg/mL) tem o exsudato significativamente mais concentrado que os animais C57BL/6 (0,90 mg/mL). Sabendo que a concentração de solutos no líquido pulmonar interfere na tensão superficial, desfazendo a interface entre líquido alveolar e o ar no interior do alvéolo, os valores da dosagem de proteínas suportam os resultados de complacência, por contribuir com a anulação das forças elásticas provocadas por essa tensão. Além disso, sabe-se que o receptor $\beta 2$ -AR participa de importantes vias de sinalização e ativação no tecido pulmonar que resultam na atuação de canais iônicos e produção de substâncias surfactantes (MUTLU e FACTOR, 2008). Consequentemente, os fatores citados anteriormente apresentam maior impacto na complacência, por representarem dois terços das forças exercidas na elasticidade pulmonar, uma vez que a elasticidade tecidual propriamente dita, relacionada ao estiramento e desdobramento das fibras de elastina e colágeno presentes no órgão que correspondem a apenas um terço das forças elásticas do pulmão (NELSON e COX, 2014).

Também avaliamos a capacidade vital forçada, uma manobra respiratória que se dá em inspirar o máximo possível, seguido da expiração o mais rapidamente e profundamente possível. Essa grandeza é resultante da soma entre o volume de reserva inspiratório, o volume corrente e o volume de reserva expiratório (COSTA e JAMAMI, 2001). Nossos resultados demonstraram que a CVF dos camundongos $\beta 2$ KO na presença do vírus influenza (0,771 mL) é significativamente menor do que o seu respectivo grupo controle e os animais C57BL/6 também infectados, sugerindo que esses animais tiveram redução tanto na capacidade total de expelir o ar, quanto na capacidade de encher os pulmões até sua expansão máxima. Para efeito

comparativo, Devos e colaboradores (2017) mostraram que a CVF em modelos induzidos de asma e enfisema está entre 1,0 e 2,0 mL.

Nessa perspectiva, como esperado, o volume pulmonar do grupo $\beta 2$ KO infectado é menor que o grupo controle e está reduzido em comparação com o grupo C57BL/6 infectado, o que pode ser justificado pelo aumento da resistência, redução da complacência e conseqüentemente da CVF. Ainda, mensuramos o Volume Expiratório Forçado nos primeiros 50 milissegundos, que representa o volume máximo que o animal consegue expirar nesse período. Esse valor corresponde ao fluxo aéreo da maior parte das vias aéreas, especialmente aquelas de calibre maior (COSTA; JAMAMI, 2001). Desse modo, podemos inferir que o fluxo aéreo das estruturas mais calibrosas tem maior comprometimento durante a infecção por influenza na ausência do receptor $\beta 2$ -AR quando comparado ao fluxo de ar de animais $\beta 2$ KO não infectados que, de maneira geral, não apresentam comprometimento das funções pulmonares e não se mostram significativamente diferentes dos camundongos C57BL/6 sem infecção. Para finalizar a avaliação mecânica pulmonar calculamos o Índice de *Tiffeneau-Pinelli*. O valor resultante do cálculo corresponde à fração do Volume Expiratório Forçado em relação à CVF. Dessa forma, observamos que entre os animais infectados, apenas o grupo $\beta 2$ KO apresentou o índice reduzido quando comparado ao grupo controle.

Após analisar a mecânica pulmonar, o BALF foi coletado no 6 dpi e processado para contagem diferencial de leucócitos. Está estabelecido na literatura que a infecção pelo vírus influenza resulta em danos epiteliais e aumento da susceptibilidade a infecções bacterianas. O reconhecimento do patógeno pelos receptores de reconhecimento padrão provoca a ativação de cascatas de sinalização antiviral que culminam na produção de citocinas e quimiocinas para ativar e recrutar células do sistema imune para o sítio de infecção (SANDT et al, 2012). A contagem total de leucócitos revelou que não há diferença na quantidade de leucócitos no líquido recuperado tanto dos animais $\beta 2$ KO quanto C57BL/6 na presença da infecção, não obstante o fato de que a presença de leucócitos tenha sido maior do que na ausência da infecção em seus respectivos controles.

Do mesmo modo, a contagem diferencial demonstrou tendência semelhante para a quantidade de macrófagos presentes no BALF, não havendo diferença na quantificação de macrófagos nos grupos infectados, mas, essa população se mostra

aumentada quando comparada à contagem nos grupos controles. Durante a homeostase os macrófagos estão quiescentes e produzem níveis relativamente baixos de citocinas e suprimem a ativação do sistema imune inato. Entretanto, quando induzido por células infectadas na fase aguda da infecção pelo vírus influenza eles são ativados e iniciam a resposta pró-inflamatória. Ainda, os macrófagos são fundamentais na contenção da infecção como fagócitos e regulação da resposta imune adaptativa. No entanto, a atividade exacerbada dessas células no sítio da infecção pode provocar lesões no tecido em função da produção excessiva de óxido nítrico (BATES, 2016; CHEN et al, 2018).

Por outro lado, nossos resultados demonstram redução da população de neutrófilos em camundongos infectados na ausência do β 2-AR, quando comparado aos animais C57BL/6 infectados. Assim como os macrófagos os neutrófilos desempenham papel importante na resposta imune inata, atuando no início da infecção, principalmente como fagócitos (NUSSING et al, 2018). Kim e colaboradores (2014), demonstraram em modelo murino que a administração de catecolaminas e, conseqüentemente a estimulação adrenérgica resulta na regulação e migração persistente de neutrófilos para áreas de inflamação. Desse modo, acreditamos que a redução da população de neutrófilos encontrada esteja fortemente relacionada com a ausência do receptor β 2.

Além disso, demonstramos que os linfócitos estão significativamente aumentados nos camundongos β 2 KO infectados em comparação ao grupo controle e ao grupo C57BL/6 infectado. Alguns trabalhos sugeriram que as catecolaminas estão envolvidas na ativação e proliferação de linfócitos pela modulação da condutância de canais de potássio. Além disso, as catecolaminas e a ativação do receptor β 2-AR estão envolvidas na regulação da proliferação de células T induzida por mitógenos, que normalmente está acompanhada do aumento do cAMP. É importante ressaltar que a resposta proliferativa de células T CD8 é inibida de forma mais extensa quando comparadas com as células T CD4 porque presumivelmente as células T CD8 expressam maior número de receptores β 2-AR (ILIA et al, 2000; CHEN et al, 2018). Além disso, a atividade de células NK também é comprometida, uma vez, que essas células também expressam a molécula CD8 (WU et al, 2018).

Por fim, o acompanhamento da sobrevivência e perda de peso dos grupos experimentais demonstrou que não há diferença significativa entre a perda e recuperação de peso dos animais β 2 KO e C57BL/6 infectados, e que do mesmo

modo, não é observada diferença na carga viral no 6 dpi entre esses grupos, embora, a mortalidade tenha sido maior nos animais $\beta 2$ KO, evidenciando que na ausência do receptor $\beta 2$ -AR ou da sua ativação durante a infecção a infecção pelo vírus influenza os animais sucumbem mais rápido, aparentemente pela exacerbação do processo inflamatório, aumento de linfócitos e redução de neutrófilos, acarretando em maior comprometimento das funções ventilatórias dos pulmões.

7 CONCLUSÃO

Os achados obtidos são sugestivos de que o β 2-AR não é crítico, ainda que seja relevante para mecanismos de ventilação pulmonar, mas possuem papel importante no recrutamento de células do sistema imune durante a resposta inflamatória no tecido pulmonar durante infecção pelo vírus influenza. Estudos mais aprofundados serão necessários para avaliar a interação e regulação do sistema imune pelo β 2-AR.

8 REFERÊNCIAS

- BANG, I.; CHOI, H. J. **Structural features of β 2 adrenergic receptor: Crystal structures and beyond***Molecules and Cells*. Korean Society for Molecular and Cellular Biology, v. 38, n. 2, p. 105–111, 2015.
- CHEN, X. et al. Host immune response to influenza A virus infection. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 320, 2018. Doi: [10.3389 / fimmu.2018.00320](https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00320)
- DEVOS, F. C. et al. Forced expiration measurements in mouse models of obstructive and restrictive lung diseases. **Respiratory Research**, v. 18, n. 1, p. 1–14, 2017.
- EISFELD, A. J.; NEUMANN, G.; KAWAOKA, Y. At the centre: Influenza A virus ribonucleoproteins. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 28–41, 2015.
- ELENKOV, I. J. et al. The sympathetic nerve - An integrative interface between two supersystems: The brain and the immune system. **Pharmacological Reviews**, v. 52, n. 4, p. 595–638, 2000.
- FREEMAN. HHS Public Access. **Physiology & behavior**, v. 176, n. 1, p. 139–148, 2018.
- FUJII, Y. et al. Selective incorporation of influenza virus RNA segments into virions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 4, p. 2002–2007, 2003.
- GARCIA, C. C. et al. Platelet-activating factor receptor plays a role in lung injury and death caused by influenza A in mice. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 11, 2010.
- HUTCHINSON, E. C. et al. Genome packaging in influenza A virus. **Journal of General Virology**, v. 91, n. 2, p. 313–328, 2010.
- KIM, M. H. et al. Catecholamine stress alters neutrophil trafficking and impairs wound healing by β 2 -adrenergic receptor-mediated Upregulation of Il-6. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 134, n. 3, p. 809–817, 2014.
- KUIKEN, T. et al. Pathogenesis of influenza virus infections: The good, the bad and the ugly. **Current Opinion in Virology**, v. 2, n. 3, p. 276–286, 2012.

- KUROSE, H. β 2adrenergic receptors: Structure, regulation and signaling by partial and full agonists. **Allergology International**, v. 53, n. 4, p. 321–330, 2004.
- MARINO, F.; COSENTINO, M. Adrenergic modulation of immune cells: An update. **Amino Acids**, v. 45, n. 1, p. 55–71, 2013.
- MEDINA, R. A.; GARCÍA-SASTRE, A. Influenza A viruses: New research developments. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 590–603, 2011.
- MUTLU, G. M.; FACTOR, P. Alveolar epithelial β 2-adrenergic receptors. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 38, n. 2, p. 127–134, 2008.
- NARASARAJU, T. et al. MCP-1 antibody treatment enhances damage and impedes repair of the alveolar epithelium in influenza pneumonitis. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 42, n. 6, p. 732–743, 2010.
- NOBS, S. P. et al. PI3K γ Is Critical for Dendritic Cell-Mediated CD8⁺ T Cell Priming and Viral Clearance during Influenza Virus Infection. **PLoS Pathogens**, v. 12, n. 3, p. 1–24, 2016.
- NOGUEIRA, D. S. et al. Multiple Exposures to *Ascaris suum* Induce Tissue Injury and Mixed Th2/Th17 Immune Response in Mice. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 1, p. 1–19, 2016.
- NÜSSING, S. et al. Innate and adaptive T cells in influenza disease. **Frontiers of Medicine**, v. 12, n. 1, p. 34–47, 2018.
- QUISPE-TINTAYA, W. HHS Public Access. **Physiology & behavior**, v. 176, n. 3, p. 139–148, 2017.
- RUSSO, R. C. et al. Phosphoinositide 3-kinase γ plays a critical role in bleomycin-induced pulmonary inflammation and fibrosis in mice. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 89, n. 2, p. 269–282, 2011.
- SANDERS, V. M. The beta2-adrenergic receptor on T and B lymphocytes: Do we understand it yet? **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 26, n. 2, p. 195–200, 2012.
- SCANZANO, A.; COSENTINO, M. Adrenergic regulation of innate immunity: A review. **Frontiers in Pharmacology**, v. 6, n. Aug, 2015.

SHORE, S. A.; MOORE, P. E. Regulation of β -adrenergic responses in airway smooth muscle. **Respiratory Physiology and Neurobiology**, v. 137, n. 2–3, p. 179–195, 2003.

TE VELTHUIS, A. J. W.; FODOR, E. Influenza virus RNA polymerase: Insights into the mechanisms of viral RNA synthesis. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, p. 479–493, 2016

VAN DER SANDT, C. E.; KREIJTZ, J. H. C. M.; RIMMELZWAAN, G. F. Evasion of influenza A viruses from innate and adaptive immune responses. **Viruses**, v. 4, n. 9, p. 1438–1476, 2012.

WU, L. et al. Bidirectional role of β 2-adrenergic receptor in autoimmune diseases. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, 1313, 2018. Doi: [10.3389/fphar.2018.01313](https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01313)

XU, B. The importance of beta-adrenergic receptors in immune regulation: A link between neuroendocrine and immune system. **Medical Hypotheses**, v. 56, n. 3, p. 273–276, 2001.