

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

ESCOLA DE VETERINARIA

Programa de Pós-graduação em Ciência Animal

**Proteômica de células ASK-2 (*Atlantic Salmon Kidney 2*)
infectadas pelo vírus da anemia infecciosa do salmão**

DENILSON EDUARDO SILVA CUNHA

Belo Horizonte

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

ESCOLA DE VETERINARIA

Programa de Pós-graduação em Ciência Animal

Proteômica de células ASK-2 (*Atlantic Salmon Kidney 2*) infectadas pelo vírus da anemia infecciosa do salmão

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência Animal (área de concentração: Medicina Veterinária Preventiva) da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal

Orientador: Prof. Dr. Henrique César Pereira Figueiredo

Co-orientador: Dr. Júlio César Câmara Rosa

Belo Horizonte

2019

C972p

Cunha, Denilson Eduardo Silva, 1982-
Proteômica de células ASK-2 (*Atlantic Salmon Kidney 2*) infectadas pelo vírus da
anemia infecciosa do salmão / Denilson Eduardo Silva Cunha. – 2019.
127 p. : il.

Orientador: Henrique César Pereira Figueiredo

Co-orientador: Júlio César Câmara Rosa

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária.
Inclui bibliografia

I. Salmão (Peixe) – Doenças – Teses. 2. Anemia infecciosa em peixes – Teses.
3. Vírus – Infecções – Teses. I. Figueiredo, Henrique César Pereira. II. Rosa,
Júlio César Câmara. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária.
IV. Título.

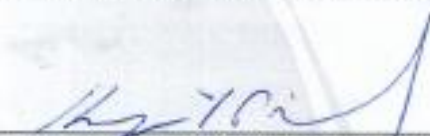
CDD – 639.3

FOLHA DE APROVAÇÃO


DENILSON EDUARDO SILVA CUNHA

Tese submetida à banca examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA ANIMAL, como requisito para obtenção do grau de DOUTOR em CIÊNCIA ANIMAL, área de concentração em MEDICINA VETERINÁRIA PREVENTIVA.


Aprovada em 19 de Junho de 2019, pela banca constituída pelos membros:




Prof. Henrique César Pereira Figueiredo
Presidente - Orientador




Prof. Carlos Augusto Gomes Leal
Escola de Veterinária - UFMG



Prof. Jenner Karlisson Pimenta dos Reis
Escola de Veterinária - UFMG



Profª. Érica Azevedo Costa
Escola de Veterinária - UFMG



Prof. Guilherme Campos Tavares
Universidade Nilton Lins

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar até aqui.

Aos meus pais, Fábio e Terezinha, pelo apoio em todos os momentos.

Aos meus irmãos, Daniel e Diana, pelo companheirismo.

Ao Davidson, por cuidar de mim.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Henrique César Pereira Figueiredo, por me aceitar como seu aluno e por contribuir para minha formação profissional.

Ao meu co-orientador, Dr. Júlio César Câmara Rosa, por seus ensinamentos e ajuda em todas as etapas do projeto, além da amizade.

Aos diretores do Centro de Microscopia da UFMG, Prof. Dr. Wagner Nunes, Prof. Dr. Gregory Kitten e Profa. Dr. Elizabeth Ribeiro da Silva, pela compreensão e liberação do trabalho para realização das atividades do doutorado.

Aos amigos do Laboratório de Doenças de Animais Aquáticos e do AQUACEN (Laboratório Oficial Central da Rede Nacional de Laboratórios do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento).

Aos amigos do Centro de Microscopia da UFMG.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da UFMG.

Ao CNPq e FAPEMIG pelo apoio financeiro.

A todos os professores e funcionários do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da EV-UFMG

Ao Felipe, pelas análises em bioinformática.

A Cristiana, pelas análises em espectrometria de massas.

A Graciela, pelas análises em PCR em tempo real.

A Jéssica, pela grande ajuda na formatação desta tese e artigo.

A todos que, de alguma forma, contribuíram na elaboração, execução e conclusão desta tese.

RESUMO

A anemia infecciosa do salmão (AIS) é uma doença do salmão do Atlântico cultivado causada pelo vírus da anemia infecciosa do salmão (ISAV), pertencente à família *Orthomyxoviridae*. Embora vários estudos moleculares tenham objetivado compreender a interação salmão-ISAV, nenhum deles concentrou sua atenção na dinâmica do proteoma da célula hospedeira na infecção pelo ISAV. O presente estudo avaliou a dinâmica do proteoma e as alterações ultraestruturais de células de rim de salmão do Atlântico (ASK-2) infectadas pelo ISAV em 12, 36, 60 e 84 horas pós-infecção por proteômica quantitativa baseada em espectrometria de massas e microscopia eletrônica de transmissão. Um total de 1.726 proteínas foram identificadas. Destas, 390 proteínas foram diferencialmente produzidas em relação ao grupo controle e 434 foram identificadas exclusivamente em culturas de células infectadas pelo ISAV. Os resultados revelaram que as alterações nos níveis de expressão das proteínas celulares aumentam durante a infecção viral, onde a maioria das proteínas foi regulada negativamente. A análise de bioinformática mostrou que proteínas diferencialmente produzidas estão envolvidas em vários processos biológicos, como regulação da expressão gênica e da resposta imune, denotando que as atividades intracelulares foram alteradas pela infecção viral. Diversas proteínas identificadas já foram estudadas como fatores celulares relevantes para a replicação viral, atuando desde a entrada do vírus na célula até o seu brotamento, especialmente para o vírus influenza, outro membro da família *Orthomyxoviridae*. Os achados por microscopia eletrônica confirmaram algumas alterações descritas em estudos anteriores e também descrevem novas alterações na célula. O proteoma da célula ASK-2 se mostrou distinto para cada tempo de coleta, altamente dinâmico e com tendência de redução progressiva das proteínas celulares (*host shutoff*). Os resultados permitiram inferir novos aspectos da biologia do ISAV.

Palavras-chaves: proteoma, HDMS, *isavirus*, *Salmo salar*

ABSTRACT

Infectious salmon anemia (ISA) is a disease of farmed Atlantic salmon caused by the aquatic orthomyxovirus infectious salmon anemia virus (ISAV). Although several molecular studies have aimed to understand salmon-ISAV interaction, none of them has focused their attention upon the viral and host cell proteomes dynamics. We studied the dynamics of the proteome and ultrastructural changes of Atlantic salmon kidney (ASK-2) cells infected with ISAV up to 12, 36, 60 and 84 hours post infection by mass spectrometry based quantitative proteomics and transmission electron microscopy. A total of 1.726 proteins were identified. From these, 390 proteins were differentially expressed in relation of control group and 434 were identified exclusively in ISAV-infected cell cultures. Our data revealed that changes in salmon protein expression levels increase during viral infection, where, most proteins were significantly down-regulated. Bioinformatics analysis showed that differentially expressed proteins are involved in several biological processes, such as gene expression and immune response, suggesting that intracellular activities were changed upon viral infection. Through literature review, many of the proteins identified here have already been studied as host factors relevant for viral replication, acting from the entrance of the virus in the cell until its budding, especially for influenza virus. Our findings by electron microscopy confirmed some changes described in previous studies and also brought new changes in the cell. For the first time we are able to describe changes of the cellular proteome of the ASK-2 cells overtime, revealing dynamic regulation processes and provides evidence that ISAV infection has impact on the cell status at protein level.

Keywords: proteome, HDMS, *isavirus*, *Salmo salar*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Micrografia eletrônica de transmissão de uma célula cultivada (linhagem celular SHK-1) infectada com vírus da anemia infecciosa do salmão (ISAV)	16
Figura 2. Representação esquemática do ciclo de replicação do ISAV.....	19
Figura 3. Sinais clínicos e patológicos da ISA no salmão do Atlântico, infecção experimental.....	20
Figura 4. Delineamento experimental.....	38
Figura 5. Imagens de microscopia de células ASK2 infectadas com ISAV (<i>Norwegian Glesvaer/2/90</i>).....	47
Figura 6. Principais alterações ultraestruturais observadas em células ASK-2 infectadas com o ISAV ao longo do tempo por microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	49
Figura 7. Análise de componentes principais para determinar a estrutura e variância dos dados de espectrometria de massa de grupos ISAV infectados (ASK_ISAV) e de grupos controle (ASK_CC) durante o curso da infecção (12, 36, 60 e 84 hpi) e suas réplicas biológicas (R1, R2 e R3).....	50
Figura 8. Total de proteínas identificadas nas culturas controles e nas culturas infectadas pelo ISAV durante o curso da infecção representado pelo diagrama de Venn.....	52

Figura 9. Proteínas totais identificadas exclusivamente em culturas de células ASK-2 em diferentes tempos pós-infecção e suas intersecções.....	53
Figura 10. Total de proteínas diferencialmente produzidas em culturas de células ASK-2 infectadas com ISAV em diferentes momentos após a infecção e suas intersecções.....	54
Figura 11. Gráficos <i>volcano plot</i> mostrando níveis de proteínas diferencialmente produzidas detectadas em células ASK-2 infectadas com ISAV durante o curso da infecção em comparação com o grupo controle.....	55
Figura 12. Proporção de proteínas diferencialmente produzidas identificadas em culturas ASK-2 após infecção pelo vírus da anemia infecciosa do salmão.....	56
Figura 13. Agrupamento por co-regulação de proteína em células ASK-2 infectadas por ISAV.....	58
Figura 14. Representação esquemática da infecção por ISAV em uma célula de salmão com uma visão global das proteínas celulares de interesse ao longo do tempo.....	85
Figura 15. Cinética da produção proteica viral.....	86
Figura 16. Validação de dados proteômicos com quantificação relativa de mRNA de M1 do ISAV por RT-qPCR.....	88

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Tabela 1. Associação dos segmentos genômicos e as proteínas do ISAV e suas funções.....	17
Tabela 2. <i>Primers</i> desenhados para alvos de salmão e do ISAV para validação dos dados proteômicos por PCR em tempo real.....	44
Tabela 3. Correlação de Pearson de grupos ISAV infectados (ASK_ISAV) e de grupos controle (ASK_CC) durante o curso da infecção (12, 36, 60 e 84 hpi) e suas réplicas biológicas (R1, R2 e R3).....	53
Tabela 4. Análise de proteínas de salmão identificadas em culturas de células infectadas pelo ISAV durante as 12, 36 e 60 horas pós-infecção.....	60
Tabela 5. Proteínas de salmão identificadas em culturas de células infectadas pelo ISAV durante as 12, 36 e 60 horas pós-infecção nas diferentes etapas do ciclo de replicação do ISAV.....	83
Tabela 6. Validação de dados proteômicos com quantificação relativa dos respectivos mRNAs de salmão por RT-qPCR.....	87

Sumário

AGRADECIMENTOS.....	4
RESUMO	6
ABSTRACT.....	7
LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE QUADROS E TABELAS	10
1. Introdução.....	14
1.1 Características do ISAV.....	15
1.2 Ciclo de replicação do ISAV	18
1.3 Características clínicas e patologia da doença	20
1.4 Espectro de hospedeiros do ISAV.....	21
1.5 Transmissão.....	21
1.6 Resposta imune.....	23
1.7 Diagnóstico, prevenção e controle	25
1.8 Proteômica e virologia	27
2. Justificativa.....	32
3. Objetivos	35
3.1 Geral	35
3.2 Específicos	35
4. Material e métodos.....	37
4.1 Cultura de células, vírus e preparação de amostras	37
4.2 Teste de Imunofluorescência (IFAT).....	38
4.3 Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	39
4.4 Preparação de amostras e análises <i>shotgun</i> do proteoma	40
4.5 Análises de bioinformática.....	42
4.6 Validação de dados de espectrometria de massas	43
5. Resultados.....	46
5.1 Cinética da replicação viral: efeito citopático (ECP).....	46
5.2 Cinética da replicação viral: mudanças ultraestruturais.....	48

5.3	Caracterização inicial dos dados proteômicos da célula hospedeira após infecção viral	50
5.4	O proteoma celular para cada tempo de coleta	52
5.5	Alterações nos níveis de produção de proteínas durante a infecção viral	54
5.6	Análise de ontologia genética	57
5.7	Fatores do hospedeiro relevantes para replicação viral	59
5.8	Cinética da produção das proteínas virais	86
5.9	Validação dos dados proteômicos por RT-qPCR	87
6.	Discussão	90
6.1	Análise da cinética viral: efeito citopático e alterações ultraestruturais.....	90
6.2	Alterações proteômicas gerais e o processo de <i>host shutoff</i>	92
6.3	Relação entre as proteínas de interesse e as etapas do ciclo viral	94
6.4	Relação entre as proteínas de interesse e a resposta imune	100
6.5	Relação entre as proteínas de interesse e a apoptose	102
7.	Conclusões.....	105
8.	Considerações finais.....	107
9.	Referências Bibliográficas	109
10.	Anexo - Resumo do manuscrito já elaborado, a ser submetido para avaliação no periódico <i>Frontiers in Microbiology</i>	126

INTRODUÇÃO

1. Introdução

A produção mundial de pescado atingiu cerca de 171 milhões de toneladas em 2016, com a aquicultura representando 47% do total. O valor total da produção pesqueira e aquícola em 2016 foi estimado em 362 bilhões de dólares, dos quais 232 bilhões foram provenientes da produção aquícola. O aumento na produção de pescado vem na tentativa de suprir a demanda cada vez maior de alimento pela população mundial. Em termos per capita, o consumo de peixe aumentou de 9,0 kg em 1961 para 20,2 kg em 2015 sendo que os peixes representaram cerca de 17% da proteína animal consumida pela população mundial em 2015 (FAO, 2018).

A piscicultura expandiu-se globalmente com um aumento não apenas na produção absoluta (toneladas/ano), mas também no número de espécies de peixes que são cultivadas em sistemas de água doce e marinhos, representando 67,5% da produção aquícola mundial em 2016. O salmão do Atlântico (*Salmo salar*) está entre as dez espécies de peixes mais amplamente cultivadas na aquicultura mundial, representando 4% da produção mundial em 2016 (FAO, 2018). Segundo a Associação Internacional de Criadores de Salmão, composta pelos representantes do setor privado dos seguintes países: Noruega, Chile, Canadá, Escócia, Estados Unidos, Ilhas Faroé, Islândia, Irlanda, Nova Zelândia e Tasmânia, a indústria global de cultivo de salmão foi estimada em 15,4 bilhões de dólares em 2016. Além disso, o cultivo de salmão é um dos mais sustentáveis (menor consumo de água e energia, alta conversão alimentar, menor produção de gases de efeito estufa) e fornece um dos alimentos mais nutritivos que auxilia na prevenção de doenças (*International Salmon Farmers Association*, 2016). Entre os principais consumidores de salmão no mundo, o Brasil importa o salmão do Chile onde o volume adquirido, em 2016, foi de 71,85 mil toneladas, o que rendeu à indústria chilena 466,76 milhões de dólares, sendo o segundo pescado no ranking das importações brasileiras (MAPA, 2017).

Entretanto, a expansão da aquicultura também foi responsável por alterações antropogênicas em larga escala como a introdução de espécies exóticas, o cultivo de animais em condições de stress e de superpopulação, alterações no perfil de populações

de animais aquáticos selvagens e o comércio global de animais vivos e seus derivados. Uma consequência de todas estas alterações foi o favorecimento da emergência e da transmissão de doenças, principalmente por vírus aquáticos, resultando em dano econômico e constituindo fator limitante significativo para a produção aquícola (Walker & Winton, 2010). Como exemplo, a anemia infecciosa do salmão (ISA) é uma doença grave do salmão do Atlântico de viveiro causada pelo *Infectious salmon anemia virus* (vírus da anemia infecciosa do salmão-ISAV) e é classificada como uma doença de notificação obrigatória pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE).

1.1 Características do ISAV

O ISAV é um patógeno descrito há poucas décadas sendo relatado pela primeira vez em fazendas de salmonídeos na Noruega em 1984, onde desde então se espalhou para os países produtores de salmão (Canadá, EUA, Escócia, Ilhas Shetland, Ilhas Faroé, Chile e Islândia) (Gagné & LeBlanc, 2018; Kibenge *et al.*, 2001; Lovely *et al.*, 1999).

As características genéticas e fenotípicas do ISAV o colocam na família *Orthomyxoviridae* sendo a espécie-tipo do gênero *Isavirus*. As partículas do ISAV são pleiomórficas (formas esféricas e filamentosas) e envelopadas (Figura 1). A forma esférica do vírus apresenta um diâmetro de 100–130nm e projeções superficiais de 10–12nm (Kibenge & Godoy, 2016). As partículas filamentosas, embora seu papel na infecção não tenha sido totalmente elucidado, são encontradas em pequenas quantidades, medindo até 700nm de comprimento e também cobertas com projeções de 10nm de comprimento. As formas filamentosas são preferencialmente encontradas quando cultivadas em células de cultura de tecido de origem epitelial, enquanto que por células não epiteliais infectadas produzem quase exclusivamente partículas de morfologia esférica (Ramírez & Marshall, 2018).

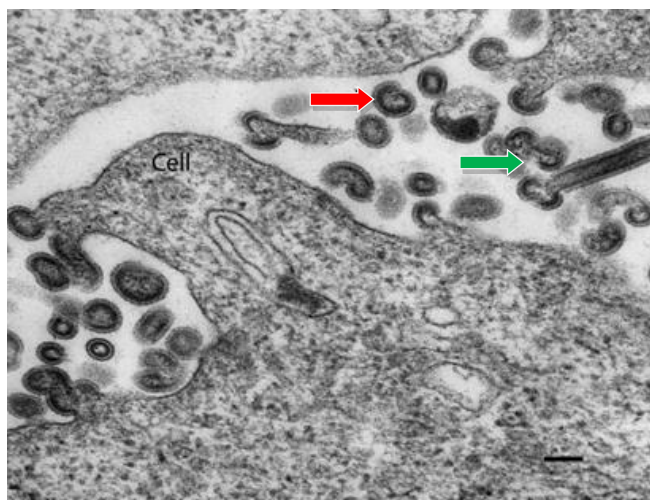


Figura 1. Micrografia eletrônica de transmissão de uma célula cultivada (linhagem celular SHK-1) infectada com vírus da anemia infecciosa do salmão (ISAV). A seta vermelha indica a forma esférica e a seta verde a forma filamentosa do vírus. A barra de escala representa 100 nm. Fonte: Crane *et al.*, 2011.

O genoma do ISAV consiste em oito segmentos de RNA de fita simples de sentido negativo que variam em seu comprimento de 1 a 2,4kb, totalizando aproximadamente 14,3kb(Clouthier *et al.*, 2015). Seu genoma codifica pelo menos 10 proteínas que incluem duas glicoproteínas de superfície: a hemaglutinina-esterase (HE), responsável pela ligação ao receptor, codificada pelo segmento 6 e a proteína de fusão (F), responsável por induzir a fusão do envelope do vírus com a membrana do endossomo da célula hospedeira, codificada pelo segmento 5. As demais proteínas: a proteína básica 2 (PB2) codificada pelo segmento 1, a proteína básica 1 (PB1) pelo segmento 2, a nucleoproteína (NP) pelo segmento 3, a polimerase ácida (PA) pelo segmento 4, a proteína não estrutural 1 (NS1) e a proteína exportadora nuclear (NEP) pelo segmento 7 e finalmente as proteínas estruturais de matriz 1 e 2 (M1 e M2) pelo segmento 8(Cottet *et al.*, 2011).As proteínas PB1, PB2 e PA formam o complexo da polimerase que realiza a transcrição e a replicação do genoma viral no núcleo da célula hospedeira. Cada segmento de RNA associa-se com uma polimerase e uma nucleoproteína e juntos formam os oito complexos ribonucleoproteicos do vírus. A proteína NEP realiza a exportação dos complexos ribonucleoproteicos do núcleo para o citoplasma da célula hospedeira durante a replicação viral(Cottet *et al.*, 2011). A tabela

1 mostra a associação dos segmentos genômicos com as proteínas do ISAV e suas funções.

Tabela 1. Associação dos segmentos genômicos com as proteínas do ISAV e suas funções

Segmento genômico	Proteína	Função
1	Proteína básica 2	Subunidade da polimerase. Reconhece a sequência 5'cap do mRNA.
2	Proteína básica 1	Subunidade da polimerase. Síntese de RNA e atividade de endonuclease.
3	Nucleoproteína	Proteína ligadora a RNA. Regula a importação nuclear.
4	Polimerase ácida	Subunidade da polimerase. Atividade de protease.
5	Proteína de fusão	Proteína de superfície. Induz a fusão do envelope do vírus com a membrana do endossomo.
6	Hemaglutinina-esterase	Proteína de superfície. Atividade de ligação e liberação do receptor celular.
7	Proteína não estrutural 1	Proteína antagonista do interferon.
7	Proteína exportadora nuclear	Exportação nuclear de RNA.
8	Proteína de matriz 1	Componente da matriz. Regula a exportação nuclear de RNA e participa do brotamento do vírus.
8	Proteína de matriz 2	Canal iônico. Participa do desnudamento e brotamento do vírus.

Fonte: Adaptado de Kibenge *et al.*, 2016.

Com base nas análises filogenéticas dos segmentos 2 e 8 do genoma do ISAV e locais de origem, os isolados virais foram divididos em dois grandes grupos: o genogrupo europeu e o genogrupo norte-americano. O genogrupo europeu engloba os isolados provenientes da Noruega e da Suécia, enquanto o genogrupo norte-americano consiste nos isolados oriundos do Canadá e dos Estados Unidos (Krossøy *et al.*, 2001). Esses genogrupos, no entanto, não são geograficamente isolados, já que isolados

pertencentes ao genogrupo europeu foram identificados na América do Norte (Gagné & LeBlanc, 2018). Outro exemplo vem de um estudo que realizou a análise genética dos isolados de ISAV no Chile, responsáveis pelos surtos de ISA no país desde 2007, onde estes foram incluídos no genogrupo europeu e bastante similares aos isolados provenientes da Noruega (Godoy *et al.*, 2014). Dentro desses dois grupos principais, os isolados também podem ser classificados de acordo com as variações dentro de uma pequena região altamente polimórfica (HPR, composta por 105 nucleotídeos e 35 aminoácidos) do gene da hemaglutinina-esterase (segmento 6 do genoma) que também define o potencial patogênico dos isolados (Crane *et al.*, 2011; Falk *et al.*, 1997). As estirpes virulentas do ISAV possuem deleções nesta região altamente polimórfica (HPR Δ) enquanto as estirpes não virulentas possuem a sequência completa desta região gênica (HPR0). De acordo com um recente estudo, foi proposta a existência de quase 40 variantes do ISAV (HPR0 ao HPR51) classificados de acordo com o número de deleções e a sequência de aminoácidos correspondentes da região HPR, sendo que a maioria dos isolados pertencem ao genogrupo europeu (HPR0-HPR19, HPR30-HPR51) e uma menor parte ao genogrupo norte-americano (HPR20-HPR25) (Cárdenas *et al.*, 2017).

1.2 Ciclo de replicação do ISAV

O ciclo de replicação do ISAV possui muitos pontos em comum com o ciclo de replicação do vírus influenza (Amelfot *et al.*, 2014). O ISAV liga-se através da sua proteína HE aos receptores da célula hospedeira que possuem resíduos de ácido siálico. Após a internalização do ISAV nos endossomos e fusão (dependente do pH ácido) do envelope viral com a membrana endossômica, ocorre a liberação do genoma viral no citoplasma da célula (desnudamento). Os eventos subsequentes são: translocação dos complexos de ribonucleoproteínas virais (vRNPs) para o núcleo, transcrição e replicação do genoma viral no núcleo, tradução dos transcritos virais no citoplasma, transporte das proteínas para o núcleo e das glicoproteínas de superfície para a via secretória (do retículo endoplasmático para aparelho de Golgi e depois para a membrana

plasmática), formação do complexo ribonucleoproteico no núcleo e posterior transporte para o local de brotamento na membrana celular (Cottet *et al.*, 2011) (Figura 2).

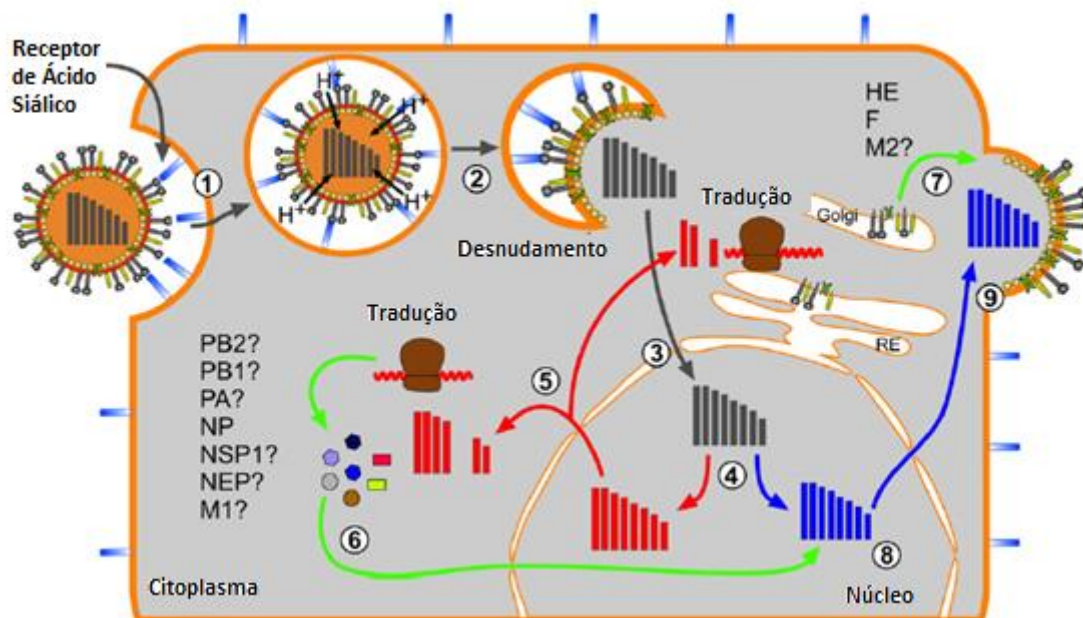


Figura 2. Representação esquemática do ciclo de replicação do ISAV. Os estágios do ciclo do ISAV são representados pelos números: 1 - Reconhecimento e entrada na célula hospedeira; 2– Desnudamento; 3 - Translocação dos vRNPs; 4 - Transcrição e replicação; 5– Tradução; 6 - Proteínas virais vão para o núcleo; 7 -Proteínas virais vão para a via secretória; 8 - Exportação dos novos vRNPs e 9 - Montagem e brotamento. Fonte: Cottet *et al.*, 2011.

A replicação *in vitro* do ISAV ocorre em linhagens celulares permissivas como as células de rim de salmão do Atlântico (ASK-2 e SHK-1, *salmon head kidney*) nas quais o vírus se replica com a produção de efeito citopático (CPE). Uma via geral conhecida por causar CPE e morte celular durante a infecção por vírus é a apoptose e o ISAV é capaz de induzir tal efeito em células permissivas. Somente as variantes HPRΔ são capazes de replicar *in vitro* (Kibenge & Godoy, 2016). O efeito citopático em células ASK-2 aparece em torno de 2 a 4 dias após a infecção, enquanto nas células SHK-1 o efeito se mostra mais tardio, em torno de 12 dias (Joseph *et al.*, 2004). A replicação *in vivo* tem como as principais células-alvo: 1) as células endoteliais, que revestem os capilares de todos os órgãos, mas o tropismo do vírus se dá principalmente no endotélio

localizado nas brânquias, rins e fígado; 2) os macrófagos e 3) as hemácias (Gregory, 2002).

1.3 Características clínicas e patologia da doença

A doença se apresenta como uma condição sistêmica caracterizada por anemia aguda, alteração na circulação e hemorragia em vários órgãos (fígado, rim, baço e intestino), com taxas de mortalidade de 30 a 90%. O tropismo do vírus pela superfície dos eritrócitos provoca a destruição dos mesmos gerando o quadro de anemia grave que por sua vez leva a hipóxia e alterações patológicas secundárias observadas no salmão do Atlântico com ISA (Aamelfot *et al.*, 2014). Peixes afetados apresentam letargia ou podem ficar imóveis no fundo da gaiola de cultivo. Na fase aguda, peixes infectados mostram ascite e palidez extrema de brânquias e órgãos internos. Peixes nesta fase também podem exibir exoftalmia, congestão do fígado e baço e petéquias na gordura visceral (Figura 3). Na fase crônica, a doença é caracterizada por edema e por petéquias no tecido adiposo subcutâneo, peritoneal e visceral, assim como, a anemia apresenta-se moderada. Além disso, fígado enegrecido pode aparecer na fase crônica (Roberts *et al.*, 2012).

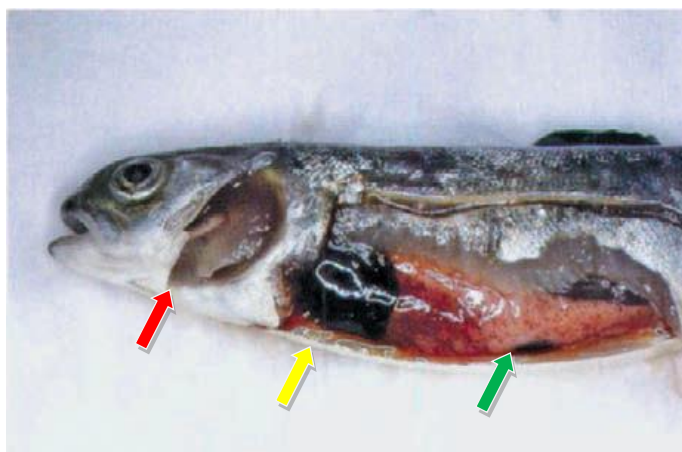


Figura 3. Sinais clínicos e patológicos da ISA em salmão do Atlântico, infectado experimentalmente. A figura mostra brânquias pálidas (seta vermelha), fígado enegrecido (seta amarela) e petéquias sobre o tecido adiposo visceral (seta verde). Fonte: Roberts *et al.*, 2012.

1.4 Espectro de hospedeiros do ISAV

Enquanto outras espécies são susceptíveis à infecção pelo ISAV, apenas o salmão do Atlântico de cultivo desenvolve o quadro da ISA após a infecção principalmente devido às condições de cultivo e sabe-se que as fases da vida desde os alevinos até os adultos são susceptíveis. Dentre as demais espécies que preenchem os critérios de inclusão na lista como susceptíveis à infecção pelo ISAV, de acordo com o Código Sanitário para os Animais Aquáticos, incluem a truta do mar (*Salmo trutta*) e truta arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), com relatos de infecções subclínicas (OIE, 2018). As espécies para as quais existem evidências incompletas para preencher os critérios de listagem como susceptíveis à infecção pelo ISAV incluem o arenque do Atlântico (*Clupea harengus*) e truta amago (*Oncorhynchus masou*), onde se demonstrou a infecção em condições experimentais (OIE, 2018). Portanto, estas espécies de peixes em que as infecções naturais e/ou experimentais foram demonstradas podem ser consideradas potenciais portadores/reservatórios para o ISAV (Crane *et al.*, 2011).

Tanto o salmão selvagem quanto o de cultivo são portadores do ISAV, principalmente quando estão infectados com a variante não virulenta (HPR0). Nylund *et al.* (2019) descrevem uma hipótese de que existe uma alta frequência de transição de variantes de virulência baixa para variantes de alta virulência nas populações de salmão cultivadas, o que levaria a novos surtos da doença. Além disso, reforça a ideia de que os salmonídeos selvagens que suprem as populações cultivadas com o vírus HPR0 (Nylund *et al.*, 2019).

1.5 Transmissão

Presume-se que a dispersão dos vírus ocorra de forma horizontal através das excreções liberadas na água pelo peixe infectado sendo as brânquias a porta de entrada do vírus em um novo hospedeiro. Além da rota de transmissão do ISAV através da água

do mar, a transmissão através de vetores denominados popularmente como piolhos do mar (*Lepeophtheirus salmonis*) também pode ocorrer (Aldrin *et al.*, 2011). As condições de cultivo como a alta densidade de estocagem dos animais se tornam um fator importante na transmissão do vírus (Hygiene & Rimstad, 2002).

Embora tenha sido sugerido que o ISAV pode ser transmitido verticalmente, há poucos estudos nesse aspecto da transmissão. Um estudo demonstrou altas cargas virais no fluido ovariano, bem como nos ovos de duas fêmeas adultas infectadas, mas sem sinais clínicos. Além disso, o vírus recuperado do fluido e dos ovos foi capaz de infectar uma linhagem celular susceptível (Marshall *et al.*, 2014). Outro estudo recente evidenciou a transmissão vertical do ISAV através do movimento de embriões e formas juvenis a partir dos seus locais de produção na Noruega, entretanto ainda existe uma discussão sobre a importância dessa forma de transmissão do ISAV (Nylund *et al.*, 2019). Embora a transmissão vertical não esteja totalmente elucidada, ovos e embriões constituem um risco de transmissão caso as medidas de biossegurança não sejam adequadas.

Os peixes infectados com ISAV podem não necessariamente apresentar sinais clínicos, mas o aparecimento da doença pode ser precipitado por condições ambientais adversas ou estresse dos animais, como mudança na temperatura da água ou a má qualidade da mesma. Os surtos de ISA tendem a ocorrer durante a primavera (aumento da temperatura da água) ou no início do inverno (queda da temperatura da água). Estudos epidemiológicos apontam como fatores de risco significativos para a transmissão do ISAV a proximidade geográfica de locais marinhos infectados ou de frigoríficos que liberam água contaminada no mar, assim como, o compartilhamento de pessoal, animais contaminados e equipamentos entre diferentes locais de produção (Aldrin *et al.*, 2011).

1.6 Resposta imune

Peixes ósseos, como o salmão do Atlântico, são um grupo de animais que representam um ponto de transição entre espécies que possuem apenas imunidade inata e espécies que dependem da imunidade adaptativa. Em relação à resposta as infecções por vírus, estudos sugerem que mamíferos e peixes ósseos são semelhantes nos mecanismos de resposta imune inata e adaptativa. Os peixes produzem IgM como resposta primária de anticorpos e a falta de mudança de isotipo para produzir anticorpos neutralizantes específicos faz com que a resposta imune inata seja essencial no combate as infecções virais (Workenhe *et al.*, 2010).

O ISAV infecta células do endotélio vascular e macrófagos do salmão do Atlântico. Esta infecção induz uma resposta imune caracterizada principalmente pela ativação do sistema de interferon(IFN) do tipo I, dos genes de resposta imune adaptativa e por ativar respostas de células T CD8-positivas, embora as respostas imunes estabelecidas não impeçam a replicação do vírus (Hetland *et al.*, 2010; Lauscher *et al.*, 2011).

Os IFNs do tipo I (IFN-I) são citocinas que desempenham um papel importante na imunidade inata e adaptativa contra vírus que atacam os vertebrados. A produção de IFN-I é induzida e secretada no reconhecimento pela célula hospedeira de ácidos nucléicos virais por diferentes tipos de receptores. Os IFN-I protegem outras células contra a infecção pela indução da produção de proteínas antivirais e o salmão do Atlântico possui um repertório diverso de citocinas desse tipo(Robertsen, 2018).

As proteínas anti-virais induzidas pelo interferon são divididas em subgrupos e atuam nas diferentes etapas da replicação dos vírus. Existem as proteínas que inibem a entrada dos vírus nos endossomos (proteínas IFITM), as que bloqueiam o transporte da nucleoproteína para o núcleo (proteínas Mx) e as que bloqueiam a tradução (proteínas IFIT). Sabe-se que o ISAV é capaz de induzir *in vitro* e *in vivo* a produção destas proteínas antivirais como as proteínas Mx e as do subgrupo IFIT (Kileng *et al.*, 2007).

Os peixes sobreviventes de uma infecção por ISAV parecem ser menos susceptíveis a uma reinfecção indicando a presença de uma resposta imune protetora.

Um estudo demonstrou que a resposta imune do salmão do Atlântico varia de acordo com a variante do vírus. O ISAV de baixa virulência (LVI) replica nas brânquias, dissemina-se posteriormente para os órgãos internos e induz uma resposta imune sistêmica no hospedeiro mais rapidamente que o vírus altamente virulento (HVI) após desafio de infecção por imersão. Além disso, o LVI induz expressão maior de genes relacionados à resposta imune, como o da proteína Mx, nas brânquias e no rim do que o HVI, o que pode ter oferecido alguma proteção contra a patogênese induzida pelo LVI. Por outro lado, a resposta do hospedeiro contra o HVI foi menos eficaz, permitindo que o vírus alcançasse uma carga maior e causando uma infecção progressiva (McBeath *et al.*, 2014).

Outro estudo que também avaliou a resposta transcricional de genes relacionados à resposta imune em brânquias, rim e tecido linfóide interbranquial de salmão do Atlântico desafiado por imersão com ISAV também concluiu que as brânquias exibiram a replicação mais precoce do vírus, reforçando que este órgão é a principal via de entrada para a infecção. Além disso, os salmões desafiados apresentaram uma robusta resposta sistêmica e inata a partir do oitavo dia após infecção medida através dos genes de interferon alfa e gama e da viperina nos três órgãos examinados (Austbø *et al.*, 2014).

Em um estudo que realizou o monitoramento individual da resposta imunológica em salmão do Atlântico após infecção experimental com ISAV demonstrou maior expressão não só da proteína antiviral Mx como também da interleucina 10 na fase tardia da infecção. A existência de IL10 induzida pela infecção viral sugere um elemento de regulação negativa como ocorre em mamíferos (Collet *et al.*, 2015).

1.7 Diagnóstico, prevenção e controle

Os métodos de diagnóstico para detecção do ISAV compreendem: a análise histológica de tecidos coletados de peixes doentes, o isolamento do vírus em culturas celulares permissivas (SHK-1, ASK-2 e CHSE-214); o ensaio imunológico de imunofluorescência (IFAT) e os testes moleculares de RT-PCR convencional e em tempo real. Como o isolamento viral consome tempo uma vez que o vírus tem uma replicação mais lenta, os testes moleculares vêm sendo utilizados para ganhar mais agilidade no diagnóstico e na tomada de decisões nos programas de controle da infecção, uma vez que são mais sensíveis e com maior capacidade de análise de amostras(Arseneau *et al.*, 2018).

A partir dos conhecimentos epidemiológicos sobre a ISA, os programas de controle e medidas regulatórias foram estabelecidos e padronizados pela Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), onde a ISA é uma doença de notificação obrigatória. Os países afetados pela doença possuem programas de vigilância baseados em restrições sobre o transporte de peixes de viveiro, o abate sanitário, a desinfecção obrigatória de gaiolas infectadas e a desinfecção de águas residuais de abatedouros e da água de consumo para as larviculturas. O manejo correto da produção, a adoção das medidas de biossegurança nas pisciculturas e a detecção precoce da infecção pelo uso de métodos diagnósticos rápidos e sensíveis são fundamentais para prevenir e controlar a disseminação do ISAV(OIE, 2018).

Um exemplo de sucesso de programa de vigilância para o ISAV é o da região noroeste do Pacífico dos Estados Unidos que permanece com o *status* de área livre do ISAV. Baseado nos relatos da presença do ISAV no Canadá e na experiência do programa de controle implantado no leste dos Estados Unidos por meio de um programa embasado na detecção precoce do vírus e remoção precoce de gaiolas afetadas, as autoridades sanitárias desenvolveram e implementaram um plano colaborativo de vigilância do ISAV para a região noroeste do Pacífico dos Estados Unidos. Este programa, durante um período de 3 anos e meio, amostrou 4.962 salmonídeos de vida livre e de cultivo por RT-PCR e todos os 4.962 testes foram negativos o que comprova a

regularidade e eficiência das medidas adotadas. Essas práticas contínuas de vigilância e biossegurança combinados com uma instrução sobre a ISA por parte da indústria, do setor público, dos profissionais da pesca e veterinária fornecem mais garantias para o controle do ISAV nesta região dos Estados Unidos(Gustafson *et al.*, 2018).

Os programas de vigilância estão sob constante aperfeiçoamento a partir das conclusões de novos estudos acerca do tema. Um estudo recente elencou os fatores de risco associados a surtos primários de ISA na Noruega no período de 2004 a 2017 que trouxe novas diretrizes aos programas de vigilância do país. O estudo concluiu que o risco médio anual de se ter um surto primário de ISA na Noruega é de 0,7% durante o período analisado. Além disso, o estudo apontou os seguintes fatores de risco associados aos surtos de ISA:1) a latitude, onde as fazendas de aquicultura de salmão do norte da Noruega são mais suscetíveis aos surtos primários de ISA; 2) a presença da doença IPN (necrose pancreática infecciosa), no qual a IPN aumentou o risco de um local experimentar um surto de ISA em mais de duas vezes; 3) o período de estocagem, onde períodos superiores a 2 meses foram associados a um aumento do risco de contrair um surto primário de ISA e 4) a biomassa, no qual uma alta densidade de peixes (biomassa por volume de gaiola) nos primeiros seis meses após a transferência para o local de cultivo também eleva o risco de surto de ISA(Lyngstad *et al.*, 2018).

Para o desenvolvimento de vacinas, a existência de diferentes estirpes do ISAV deve ser levada em consideração. A vacina por vírus inativado administrada por via intraperitoneal tem sido a mais utilizada sendo que a vacina está disponível no mercado e tem sido utilizada pelos países com a presença da doença(Aamelfot *et al.*, 2014). Segundo a OIE, a vacinação é realizada na América do Norte desde 1999 e nas Ilhas Faroé desde 2005. Na Noruega, a vacinação foi realizada pela primeira vez em 2009. O Chile começou a vacinar contra a infecção em 2010(OIE, 2018).

1.8 Proteômica e virologia

O estudo de proteômica permite identificar e quantificar um conjunto de proteínas produzidas por um determinado microrganismo em uma determinada condição e o padrão da síntese proteica pode ser avaliado através da técnica de espectrometria de massas. A espectrometria de massas pode ser definida como o estudo da matéria através da formação de íons em fase gasosa e sua caracterização pela relação massa-carga (m/z) e abundância dos íons formados (Dörr *et al.*, 2011).

As análises em proteômica consistem nas seguintes etapas: coleta das amostras, extração das proteínas, digestão das proteínas, separação dos peptídeos, análise por espectrometria de massas dos peptídeos, identificação e quantificação relativa dos peptídeos e proteínas por meio de análises de bioinformática dos espectros gerados (Paton *et al.*, 2007). Existem diferentes metodologias para os estudos proteômicos, porém, será dada ênfase neste tópico ao protocolo utilizado na tese.

As proteínas a serem analisadas devem ser primeiramente isoladas ou extraídas de lisados celulares ou tissulares. Esta etapa é de suma importância para o sucesso em análises proteômicas. A extração é realizada através da ruptura das células com tampões de lise específicos adicionados de agentes caotrópicos (como a ureia e tioureia), agentes redutores (como o ditioneitol) e detergentes (como o desoxicolato de sódio) para a correta solubilização e desnaturação das proteínas. Grande parte dos detergentes é incompatível com a espectrometria de massas, assim, essas substâncias devem ser removidas antes da análise (Feist & Hummon, 2015).

Após esta etapa, o próximo passo é converter a (s) proteína (s) isolada (s) em um conjunto de peptídeos. Isso é feito com o uso de enzimas que promovem a clivagem das proteínas em pontos específicos, sendo a tripsina, uma das enzimas mais utilizadas em proteômica. A tripsina catalisa a clivagem das ligações peptídicas e gera peptídeos curtos, com arginina ou lisina na porção C-terminal (Feist & Hummon, 2015).

Os peptídeos obtidos podem ser separados por meio das técnicas de cromatografia líquida uni- ou multidimensional. As técnicas de cromatografia líquida associada à espectrometria de massa (LC-MS) começaram a ser utilizadas e permitiram a análise de misturas complexas de proteínas sem a prévia separação em gel. Essa técnica tem como vantagem o baixo limite de detecção para peptídeos e proteínas e pode identificar centenas de proteínas em um único experimento (Karpievitch *et al.*, 2010).

Após a separação cromatográfica, os peptídeos podem ser analisados por espectrometria de massas. Um espectrômetro de massa contém uma fonte ionizadora, que promove a ionização dos peptídeos e os transfere para a fase gasosa; um ou mais analisadores de massa, que medem a relação m/z dos analitos ionizados e um detector, que registra o número de íons em cada valor m/z . Os espectrômetros existentes se constituem das diversas combinações entre fontes de ionização e analisadores de massa. A ionização por *eletrospray* (ESI) e a ionização/dessorção a laser assistida por matriz (MALDI) são as duas técnicas mais utilizadas para ionizar os peptídeos na espectrometria de massas. Na ESI as amostras são dissolvidas em um solvente e bombeadas através de uma agulha capilar submetida à alta voltagem. A solução é ejetada como um aerossol de gotas altamente carregadas, o solvente é evaporado, as formas ionizadas do analito são formadas e seguem para o analisador de massas (Matthiesen & Bunkenborg, 2013).

O analisador de massas é a parte do instrumento que realiza a separação dos íons gerados através da sua razão massa/carga que são isolados e submetidos à fragmentação por colisão com moléculas de um gás inerte, tal como argônio, nitrogênio ou hélio. Os analisadores de massa *Ion trap* do tipo TOF (*Time-of-Flight*) são amplamente utilizados. Esses analisadores podem ser utilizados de forma isolada ou em sequência (*tandem*). Nos analisadores do tipo TOF, os íons são acelerados em um campo elétrico com tensões de cerca de 20kV e percorrem um trajeto (voo) até o detector. O tempo de voo dos íons ajuda na determinação da resolução de massa, uma vez que os íons de

menor tamanho chegam ao detector em um tempo menor do que os íons maiores(Matthiesen & Bunkenborg, 2013).

O espectro obtido é chamado espectro de fragmentação ou MS/MS, onde os resultados inerentes a massa molecular dos peptídeos bem como a informação relativa à sequência de aminoácidos dos mesmos são usados pelos *softwares* de busca para localizar as proteínas nos bancos de dados. Atualmente existem vários bancos de dados de sequências proteicas disponíveis ao público, como por exemplo, o SWISS-PROT e o UNIPROT. A identificação de proteínas é realizada utilizando-se um algoritmo de busca de correspondência de sequência peptídica, cuja sensibilidade varia diretamente com o tamanho da base de dados(Li *et al.*, 2009).

Nas últimas décadas, o sequenciamento massivamente paralelo possibilitou o sequenciamento completo do genoma de muitas espécies, como o do salmão do Atlântico, o que tem fornecido uma quantidade enorme de informação sobre os genes e as proteínas codificadas por eles, enriquecendo os bancos de dados. O genoma do salmão do Atlântico possui 2,97 gigabases de tamanho e aproximadamente 47 mil genes organizados em 29 cromossomos e codificando cerca de 37 mil proteínas (Hu *et al.*, 2016). O projeto do genoma do salmão foi uma cooperação internacional envolvendo pesquisadores dos principais países produtores de salmão que revelou a complexidade do genoma da espécie, caracterizado por processos de duplicação total do genoma ancestral seguido de grandes reorganizações genômicas mediadas por transposons. As informações obtidas do projeto genoma do salmão beneficiam a pesquisa, a conservação e o desenvolvimento sustentável dessa espécie(Houston & Macqueen, 2019).

Os métodos proteômicos tornaram-se uma ferramenta importante na virologia, pois propiciaram inúmeras descobertas a respeito da replicação viral, da resposta imune do hospedeiro e de como os vírus evadem das defesas do hospedeiro. Todos estes processos biológicos se fundamentam nas interações das proteínas dos vírus com as proteínas celulares reguladas ao longo do curso das infecções (Lum & Cristea, 2016).Dentre as diferentes abordagens proteômicas, as técnicas quantitativas baseadas

na espectrometria de massas oferecem melhor sensibilidade e têm sido bastante utilizadas para tentar elucidar os mecanismos moleculares da infecção de vírus de vertebrados superiores como os mamíferos, especialmente os seres humanos (Zheng *et al.*, 2011). Diversas doenças humanas têm sido investigadas com o auxílio da proteômica baseada em espectrometria de massas, como dengue, zika e diferentes tipos de cânceres com o objetivo de desenvolver novas terapias antivirais (Chiu *et al.*, 2014; Ersing *et al.*, 2017; Xin *et al.*, 2017). Para os vertebrados inferiores, como os peixes, estudos como estes são escassos (Guo *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2015). É necessário aplicar este tipo de ferramenta metodológica com o objetivo de compreender o processo infeccioso de vírus que acometem os peixes visando melhorar a sanidade destes animais, especialmente para as espécies utilizadas na aquicultura.

JUSTIFICATIVA

2. Justificativa

A infecção pelo ISAV trouxe impactos econômicos graves tornando-se uma preocupação constante para a indústria global de aquicultura. A produção do salmão do Atlântico foi extensivamente afetada por este patógeno e os surtos da doença resultaram em graves perdas financeiras aos produtores. Devido ao alto impacto dos surtos de ISA, muitos estudos têm sido destinados a compreender o processo infeccioso do ISAV. Cook e colaboradores (2017), por exemplo, determinaram as estruturas cristalográficas da glicoproteína viral hemaglutinina-esterase responsável pela ligação dinâmica do vírus ao seu receptor celular e mostraram que ela tem um padrão distinto de reconhecimento do receptor de outros vírus semelhantes ao vírus influenza (Cook *et al.*, 2017). Valenzuela-Miranda e colaboradores, por outro lado, concentraram sua atenção no transcriptoma do ISAV ao longo de seu processo infeccioso. Seus resultados revelaram padrões temporais de acúmulo viral nos tecidos das brânquias, fígado e rim e também uma variação na dinâmica de transcrição para os diferentes segmentos de RNA do ISAV (Valenzuela-Miranda *et al.*, 2015). Já por sua vez, Cárdenas e colaboradores propuseram uma atualização sobre a classificação das estirpes do ISAV com base na variabilidade do segmento genômico 6 (Cárdenas *et al.*, 2017).

Embora vários estudos moleculares tenham objetivado compreender a interação vírus-hospedeiro, nenhum deles concentrou sua atenção na dinâmica do proteoma celular durante a infecção pelo ISAV. Elucidar as características dos vírus e suas interações com as células hospedeiras é cada vez mais importante. A abordagem proteômica baseada na espectrometria de massa tornou-se uma importante ferramenta para estudar estas complexas interações vírus-célula. Sabe-se que há um balanço entre a promoção da replicação do vírus e a defesa do hospedeiro o que desencadeia uma gama de alterações proteômicas na célula (Greco *et al.*, 2014). Entre os vírus da família *Orthomyxoviridae*, o gênero influenza tem sido bastante estudado em como esse vírus altera o proteoma da célula hospedeira e quais proteínas celulares contribuem para a replicação viral (Cypriak *et al.*, 2017; Kummer *et al.*, 2014; Mindaye *et al.*, 2017). O ciclo de multiplicação do ISAV é semelhante ao do vírus influenza, onde se assume que as

proteínas homólogas do ISAV desempenham um papel semelhante no ciclo(Cottet *et al.*, 2011).É necessário conhecer detalhadamente o ciclo do ISAV e também quais proteínas celulares interferem na eficiência da multiplicação viral. Um dos poucos estudos com este objetivo avaliou o papel da proteína de choque térmico 70 (HSP70) no ciclo do ISAV. Assim como a proteína de matriz 1 (M1) e a proteína de exportação nuclear (NEP) do influenza interagem com a proteína celular HSP70 para a exportação dos complexos ribonucleoproteicos para o citoplasma, verificou-se que essa mesma interação proteica, M1 e NEP do ISAV com HSP70 do salmão, também ocorre e para o mesmo propósito(Zhang *et al.*, 2017).

No presente estudo, analisaram-se as alterações proteômicas *in vitro* de células de rim de salmão do Atlântico (ASK-2) infectadas pelo ISAV por meio da técnica *shotgun* de alto rendimento usando espectrometria de massas livre de marcadores associada à cromatografia líquida na tentativa de se identificar quais proteínas celulares estão envolvidas no processo de infecção pelo ISAV.

OBJETIVOS

3. Objetivos

3.1 Geral

Avaliar o impacto da infecção pelo vírus da anemia infecciosa do salmão sobre o proteoma de células ASK-2 através da abordagem proteômica em larga escala livre de marcação.

3.2 Específicos

- Caracterizar a infecção pelo ISAV em células ASK-2 (efeito citopático e produção de vírus);
- Avaliar as modificações ultraestruturais na célula ASK-2 decorridas da infecção pelo ISAV;
- Analisar as alterações proteômicas de células ASK-2 infectadas pelo ISAV em diferentes etapas da replicação viral;
- Identificar quais proteínas das células ASK-2 estão com produção alterada devido à infecção pelo ISAV e suas funções;
- Estabelecer relações entre as proteínas das células ASK-2 de interesse (exclusivas e diferencialmente produzidas) com as diferentes etapas do ciclo de replicação do ISAV e da resposta imune;

MATERIAL E MÉTODOS

4. Material e métodos

4.1 Cultura de células, vírus e preparação de amostras

Células de rim de salmão do Atlântico (ASK-2, ATCC[®] CRL-2747TM) foram cultivadas em frascos de 25cm² ou em placas de 96 poços a 20°C em meio Leibovitz L-15 (Thermo Fisher, Reino Unido) suplementado com gentamicina (50mg/mL), L-glutamina (4mM) e soro fetal bovino (10 % v/v). Quando as culturas atingiram 80 a 90% de confluência nos frascos, elas foram usadas para infecção viral.

O ISAV utilizado neste estudo foi o da estirpe patogênica norueguesa de referência Glesvaer/2/90 (Dannevig *et al.*, 1995). Para a titulação, o sobrenadante de cultura ASK-2 infectada pelo ISAV na terceira passagem foi submetido a diluição seriada de base 10 (10^{-1} a 10^{-10}) onde 100µL de cada diluição foi inoculada em células ASK-2 cultivadas em placa de 96 poços. Foram utilizados 8 poços para cada diluição. A placa foi incubada a 15°C, observada diariamente em microscópio de luz para análise de ECP por 7 dias e, ao final, fixada com 80% (v/v) acetona. A presença ou ausência de ISAV em cada poço foi confirmada pelo teste de imunofluorescência (IFAT). Após, o título viral foi calculado pela dose infecciosa 50% em cultura de tecido (TCID₅₀/mL) utilizando o método de Spearman e Kärber (Spearman, 1908; Kärber, 1931), tendo como título $10^{6,25}$.

Para avaliar o impacto da infecção pelo ISAV no proteoma das células ASK-2 ao longo do tempo, as culturas celulares cultivadas em frascos de 25cm² foram infectadas com suspensão viral a uma multiplicidade de infecção (MOI) de 1 na temperatura de 15°C por 1 hora (adsorção). As culturas infectadas pelo ISAV e as culturas *mock* infectadas (controle) foram colhidas às 12, 36, 60 e 84 horas após a infecção (hpi) e os respectivos *pellets* foram utilizados nas técnicas descritas a seguir (triplicata biológica). O delineamento experimental deste estudo está representado na figura 4.

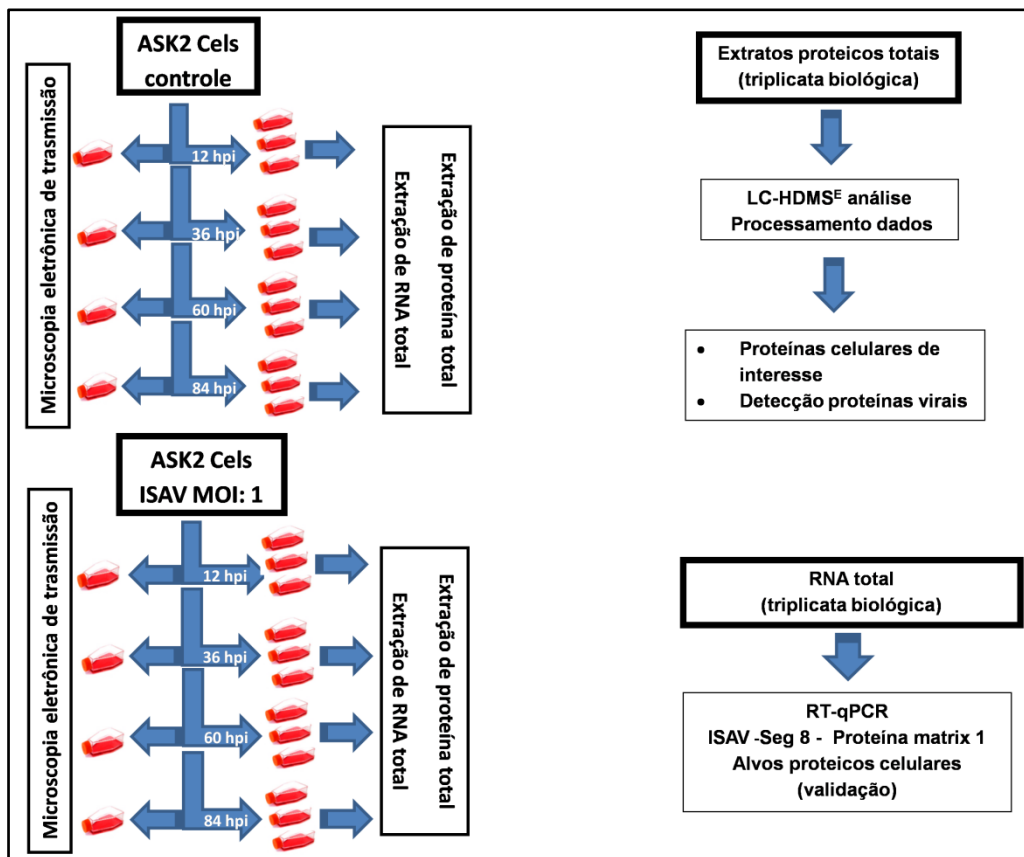


Figura 4. Delineamento experimental

4.2 Teste de Imunofluorescência (IFAT)

Para avaliar o progresso da infecção e a presença do vírus foi utilizado o IFAT (OIE, 2018). O IFAT foi realizado em placas de 6 poços, em duplicata e foi feito sob as mesmas condições de cultura de células e infecção com ISAV descritas anteriormente. Os poços foram fixados de acordo com cada tempo de coleta (12, 36, 60 e 84 hpi) onde o meio de cultura foi removido, adicionado 150-200µL de solução de acetona 80% (v/v) (fixador) por poço, incubado à temperatura ambiente por 20-30 minutos, removido o fixador e incubado para secagem por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados 50µL de anticorpo monoclonal anti-ISAV (AquaticDiagnosticsLtd., Escócia) diluído 1:100 em tampão fosfato-salino (PBS) por poço, incubado durante 1

hora à temperatura ambiente e lavado três vezes (150-200µL PBS com 0,05% Tween20). Após, foram adicionados 50µL por poço de IgG anti-*mouse* biotilado (Kirkegaard + Perry Laboratories, Inc., USA), diluído 1:100 em PBS e posteriormente a placa foi incubada durante 1 hora à temperatura ambiente. Após a lavagem, foram adicionados 50µL por poço de estreptavidina/isotiocianato de fluoresceína (FITC) (Thermo Fisher, Reino Unido), incubados por 1 hora à temperatura ambiente, protegidos da luz e lavados três vezes (PBS com 0,05% de Tween20). Por último, adicionou-se a contra-coloração Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich, Alemanha), incubou-se durante 2-3 minutos à temperatura ambiente e as placas foram lavadas. As placas foram examinadas em microscópio fluorescente invertido DM IL LED (Leica, Alemanha) com um filtro adequado para excitação de FITC.

4.3 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

Para avaliar as alterações ultraestruturais nas células ASK-2 durante a replicação viral, as células ASK-2 foram infectadas com o ISAV e analisadas por MET. Culturas celulares infectadas com ISAV e controles (12, 36, 60 e 84hpi) tiveram o meio de cultura descartado e foram fixadas com o fixador Karnovsky modificado, com paraformaldeído a 2% e glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2, durante 2 horas a temperatura ambiente. As amostras foram pós-fixadas com tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio por duas horas a temperatura ambiente. Em seguida as amostras foram contrastadas com acetato de uranila (UA, 2% em água deionizada) *overnight* a 4°C. As amostras foram desidratadas de forma gradual através de uma série ascendente de concentração de etanol (35% por 20 minutos, 50% por 20 minutos, 70% por 20 minutos, 85% por 20 minutos, 95% por 20 minutos e etanol absoluto por 30 minutos. Após a desidratação, as amostras foram imersas em resina EPON (Electron Microscopy Science, EUA) durante 24 horas, seguida da polimerização da resina em estufa a 60°C por 48 horas. Após a inclusão, foram feitos cortes em ultramicrótomos dos blocos com espessura de 200-300nm, sendo estes montados em lâmina de vidro, corados com azul de toluidina e visualizados ao microscópio de luz.

Escolhida a região de interesse, foram feitos cortes ultra-finos na espessura de 60nm, sendo posteriormente coletados em telas de cobre e contrastados com uma solução de citrato de chumbo a 10% por 5-10 minutos. As secções das células foram visualizadas com o microscópio eletrônico TecnaiG2-12 Spirit (FEI, EUA) em uma tensão de trabalho a 80kV. Experimentos e análises envolvendo microscopia eletrônica foram realizados no Centro de Microscopia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil.

4.4 Preparação de amostras e análise *shotgun* do proteoma

A fim de estudar e analisar o proteoma das células ASK-2 durante a infecção por ISAV, foi utilizada a abordagem de proteína livre de marcação. Extratos proteicos das culturas celulares (grupos *mock* infectados e infectados por ISAV) foram obtidos a partir de três réplicas biológicas independentes a 12, 36, 60 e 84 hpi. Proteínas totais de culturas de células ASK-2 foram extraídas por suspensão de células peletizadas em tampão de lise [42% (p/v) ureia, 15% toureia, 4% SDC (desoxicolato de sódio), 12,5 mM Tris-HCl pH 7,5, 1,5% DTT (ditiotretol)] com 1% v/v de uma mistura de inibidores de protease (GE Healthcare, EUA). As amostras foram então centrifugadas a 14000g a 4°C durante 40 minutos. Os extratos proteicos foram concentrados em colunas Vivaspin (GE HealthCare, EUA) e lavados quatro vezes em solução de bicarbonato de amônio(NH₄HCO₃) 50mM pH 8,5. As proteínas concentradas foram quantificadas utilizando o kit de ensaio de proteína Qubit (Molecular Probes, EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

Para digestão triptica, 120µg de cada extrato proteico foi misturado com 10µL de 50mM NH₄HCO₃ e 25µL de RapiGest SF a 0,2% (Waters, EUA) a 80°C por 15 minutos (desnaturação), seguido de tratamento com 2,5µL 100mM de DTT a 60°C por 30 minutos (redução) e depois carboxiamidometilada em 2,5µL 300mM de iodoacetamina à temperatura ambiente, protegida da luz, por 30 minutos (alquilação). Em seguida, 10µL (0,5µg/µL) de tripsina (Promega, USA) foram adicionados e incubados a 37°C

por 16 horas. Finalmente, 10 μ L de TFA 5% (ácido trifluoroacético) (Sigma Aldrich, EUA) foram adicionados a 37°C por 90 minutos e as amostras foram então centrifugadas com 14000g a 6°C por 30 minutos. Os sobrenadantes (peptídeos digeridos) foram depois tratados com 200 μ L de acetato de etila e 30 μ L de TFA para remoção de SDC por extração de solvente em duas fases. A fase aquosa foi dessalinizada em cartucho C18 (Macro spin Column, Waters, USA) com soluções de TFA e acetonitrila e seca sob vácuo por *Vacufuge Concentrator* (Eppendorf, Alemanha). As soluções finais dos peptídeos foram ressuspensas em 100 μ L 20mM de formato de amônio (Sigma Aldrich), transferidas para os frascos de recuperação total (Waters, EUA) e submetidas à análise por espectrometria de massas associada a cromatografia líquida de ultra performance (nanoUPLC-MS) utilizando o espectrômetro de massa Synapt G2Si (Waters, EUA).

Os peptídeos foram separados por cromatografia líquida bidimensional no sistema nanoACQUITY UPLC 2D (Waters, EUA) utilizando as colunas cromatográficas M-Class HSS T3(75 μ m \times 150mm–pH 3) eM-Class BEH C18(300 μ m \times 50mm–pH 10) em um gradiente de fase reversa de 7% a 40% (v/v) acetonitrila (0,1% v/v ácido fórmico) em um fluxo de 450nL.min⁻¹. Foram injetadas cinco frações de 500ng da solução de peptídeos de cada amostra. Em seguida, os peptídeos foram ionizados por eletropulverização(nanoESI) (Waters, EUA). A análise de massa dos íons foi realizada em um dispositivo T-Wave-IMS (*Quadrupole-IonMobility-Time-of-Flight*) (Waters, EUA), onde o tempo de voo dos íons no dispositivo é critério de análise na discriminação dos mesmos. Os espectros de massa de alta definição (HDMS^E) foram coletados em modo de aquisição independente de dados multiplexados em alternância de baixa e alta energia. Os dados foram representados através da relação massa/carga(*m/z*) variando entre 400 a 2.000 pelo *software* MassLynx v.4.1 (Waters, EUA)(Tavares *et al.*, 2018).

Os dados brutos de HDMS^E gerados para cada réplica foram submetidos ao *software* Progenesis QI para Proteômica (QIP) v.2.0 (Nonlinear Dynamics, Reino Unido) para identificação dos peptídeos e informações quantitativas dos mesmos com as seguintes configurações: máximo de 1 clivagem perdida pela tripsina, uma modificação

fixa: carbamidometilação de cisteína e uma modificação variável: oxidação da metionina(Brito *et al.*, 2018).

Os espectros de massa foram pesquisados contra o bancos de dados híbrido de proteínas do salmão do Atlântico(*Salmo salar*) e do ISAV hospedados no UNIPROT (Proteome ID:[UP000087266](#))para identificação das proteínas, onde foi considerada válida a identificação somente quando os seguintes critérios fossem atendidos: valor de acurasse automática Verde (representando 99% do espectro confiante),taxa de falso-positivos ou taxa de falsa descoberta (FDR) de 4% e proteínas com pelo menos dois peptídeos distintos (sendo um dos quais um peptídeo único) e presentes em pelo menos duas das três réplicas biológicas. O FDR foi estimado com base em correspondências para as sequências invertidas no banco de dados usando uma ferramenta do *software* ProteinLynx Global Server (PLGS) versão 3.0.2 (Waters, EUA)(Claassen, 2012; Cottrell, 2011; Turewicz *et al.*, 2017).

As proteínas foram quantificadas por quantificação relativa usando um algoritmo Hi-N incorporado no Progenesis. Uma proteína foi considerada diferencialmente produzida na cultura infectada em relação à cultura controle se houvesse uma mudança significativa ($p \leq 0,05$, ANOVA) na produção. A classificação de proteínas com alteração significativa na abundância ≥ 2 (regulada para cima) ou ≤ -2 (regulada para baixo) na infecção pelo ISAV foi estipulada. Quando a abundância é normalizada na escala logarítmica (\log_2), a classificação fica ≥ 1 (regulada para cima) e ≤ -1 (regulada para baixo).

4.5 Análises de bioinformática

Três réplicas biológicas para cada ponto de coleta pós-infecção para ambos, culturas infectadas com ISAV e culturas *mock* infectadas, foram analisadas. Cálculos de correlação de Pearson foram realizados para garantir a reprodutibilidade das réplicas biológicas e a análise de componentes principais (PCA) foi usada para exibir a estrutura

e a variância dos grupos de amostras usando o *software* R versão 3.4.1. Para obter uma visão geral da identificação e produção de proteínas entre as diferentes condições e tempos de coleta, foram feitos diagramas de Venn e gráficos *volcano* também utilizando o *software* R.

Anotação e classificação funcional das proteínas de salmão identificadas para cada tempo de coleta (12 a 84hpi) foram feitas utilizando análise de enriquecimento por ontologia gênica (GO) (Consortium, 2000; Kuleshov *et al.*, 2016). Termos de GO enriquecidos para a categoria processo biológico (BP) foi testado usando um teste hipergeométrico do pacote *GoStats* no *Bioconductor* com o conjunto completo de genes de salmão medidos como uma distribuição de fundo. Apenas categorias com valor de $p \leq 0,05$ foram mantidas para análises posteriores. Para a análise funcional de agrupamento (co-regulação) foi utilizado um algoritmo de agrupamento flexível chamado *fuzzy-c-means* do pacote *Mfuzz* no *Bioconductor* (Futschik & Carlisle, 2005).

4.6 Validação de dados de espectrometria de massas

Para validar os dados de espectrometria de massas, foram escolhidas proteínas diferencialmente produzidas com as maiores alterações na produção juntamente com a proteína de matriz 1 do ISAV (M1) para quantificar a expressão de seus respectivos RNA mensageiros. O RNA total das culturas celulares infectadas com o ISAV e das culturas *mock* infectadas foi isolado utilizando o reagente Trizol (Thermo Fisher, Reino Unido). A pureza e a quantidade de RNA obtida foram medidas utilizando o kit de ensaio de RNA Qubit (Thermo Scientific, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. As amostras foram armazenadas em água isenta de RNase (Eppendorf, Alemanha) a -70°C até o uso.

As expressões de mRNAs de salmão foram determinadas por RT-qPCR com quantificação relativa pelo método comparativo do número de ciclos de quantificação (Ct) e calculadas pela fórmula $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ normalizadas pelo gene de referência 18S rRNA (Jorgensen *et al.*, 2006), onde valores de $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}} > 1$ (regulado para cima) e < 1 (regulado para baixo). As expressões dos mRNAs de M1 foram determinadas por RT-

qPCR com quantificação relativa apenas pelo método comparativo do Ct. O kit de RT-qPCR de etapa única SuperScript™ III Platinum™ SYBR™ Green (Thermo Fisher, Reino Unido) foi usado de acordo com as instruções do fabricante. Os parâmetros da RT-qPCR foram 50°C por 3 minutos, 95°C por 10 minutos; depois 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto por 40 ciclos, realizada em triplicata no sistema QuantStudio™ 7 Flex System (Thermo Fisher, Reino Unido). Todos os iniciadores foram desenhados com a ferramenta Primer-BLAST (Jian *et al.*, 2012) e estão listados na tabela 2. Os iniciadores tinham com alvos fragmentos em torno de 150 pb, não formavam estruturas secundárias, possuíam conteúdo GC de no mínimo 50% e *melting point* entre 58 a 60°C.

Tabela 2. Primers desenhados para alvos de salmão e de ISAV para validação dos dados proteômicos por PCR em tempo real

Alvo	Iniciadores (5' > 3') F= <i>forward</i> /R= <i>reverse</i>	Tamanho fragmento (pb)
<i>Procollagenalactosyltransferase 1-like</i>	F= GCACGGGTACAACGTA R= ATGTTTCAGAGTTGCGGCAGA	151
<i>Annexin</i>	F= GTTTTAGCCAGAGACGGAAGC R= CAACTTTGATGGGGTTGCAG	171
<i>Histone H2A</i>	F= TCCTTGTACCACAGCCTGTTT R= CGACCTACGGGGAAGTGAAG	147
<i>Cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-7-like</i>	F=AGACACCATCAGCAGAAGCC R=CCTGGTGGGGAAGAGTCAAC	70
<i>Outerdensefiberprotein 2</i>	F= ATGCAGCTGGAGAAGGACAC R=AGGGCTGACACCTGTATTGC	86
<i>18S rRNA</i>	F=CCGAGCTAGGAATAATGGAATAGG R=GTTAGCATGCCAGAGTCTCGTTCGT	150
<i>Matrix protein 1 (ISAV)</i>	F=CTACACAGCAGGATGCAGATGT R=CAGGATGCCGGAAGTCGAT	104

RESULTADOS

5. Resultados

5.1 Cinética da replicação viral: efeito citopático (ECP)

As culturas infectadas e *mock* infectadas foram monitoradas ao longo do experimento com foco no aparecimento do efeito citopático, na formação de partículas virais e na caracterização de alterações ultraestruturais na célula utilizando diferentes técnicas de microscopia. Imagens de microscopia de luz de células ASK-2 infectadas com ISAV mostraram áreas de células arredondadas, posteriormente, as células começaram a se soltar da superfície de crescimento como sinais do efeito citopático 36 horas após infecção. O efeito citopático aumentou com o tempo, atingindo maior destruição da monocamada de células às 84 horas após a infecção (Figura 5A). O teste de imunofluorescência (IFAT) com o anticorpo monoclonal ISAV e com o anticorpo secundário marcado com FITC mostra a presença de partículas virais (pontos verdes) 36 horas pós-infecção. O número de partículas virais detectadas aumentou ao longo do tempo, enquanto a viabilidade das células diminuiu (pontos azuis) (Figura 5B).

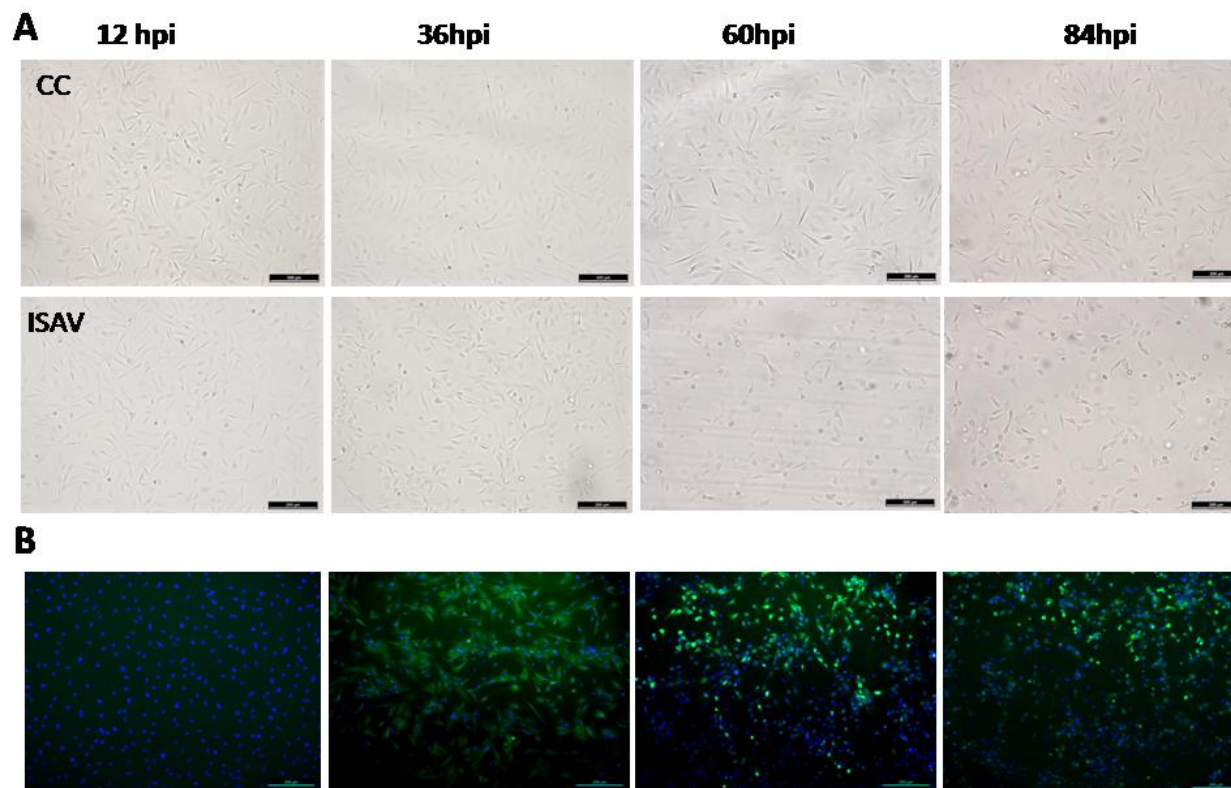


Figura 5. Imagens de microscopia de células ASK2 infectadas com ISAV (*NorwegianGlesvaer/2/90*). Painel A: microscopia de luz. CC = *mock* infectado (controle), ISAV = grupo infectado, barra de escala = 200 μ m. Painel B: monocamada de células ASK2 infectadas com ISAV coradas em ensaio de imunofluorescência com anticorpo monoclonal ISAV e anticorpo secundário-FITC. Verde representa coloração com anticorpo ISAV-FITC e azul representa coloração de células nucleares com Hoechst 33258), barra de escala = 200 μ m.

5.2 Cinética da replicação viral: mudanças ultraestruturais

Na microscopia eletrônica de transmissão, diferentes alterações ultraestruturais foram observadas e são apresentadas na figura 6. Às 12 hpi, algumas células apresentaram, em seu citoplasma, áreas de eletrondensidade diferentes da do restante da célula (Figura 6A), que podem ser um sinal de aglomeração de proteínas virais e formação de novas partículas virais. No entanto, não foi observada presença de partículas virais maduras. As células infectadas exibiram um número crescente de retículos endoplasmáticos dilatados (Figura 6A - painel pequeno) e os elementos do citoesqueleto distribuíram-se desigualmente, dispostos em feixes (Figura 6B). As partículas virais foram visualizadas após 36 horas de infecção, conforme observado pela IFAT (Figura 6B - painel pequeno). Nas células haviam várias vesículas (Figura 6C) contendo partículas virais envelopadas, bastante pleiomórficas, sendo de formas alongadas (filamentosas) a esféricas (Figura 6C - painel pequeno). Além disso, organelas como o retículo endoplasmático rugoso foram arranjadas de maneira incomum, como em espirais (Figura 6D). As 84 hpi, foi notado um grande número de corpúsculos autofágicos quando comparados com os da cultura *mock* infectado (Figura 6D - painel pequeno).

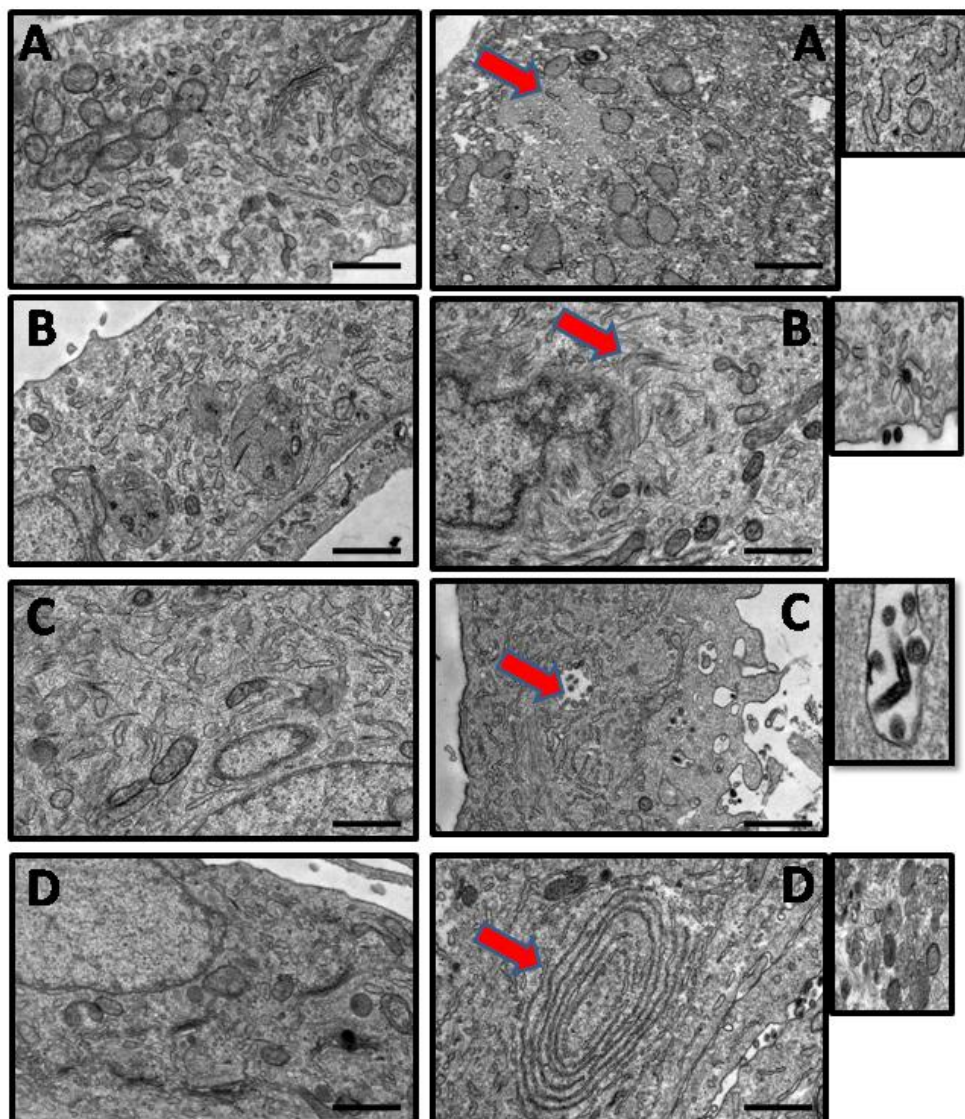


Figura 6. Principais alterações ultraestruturais observadas em células ASK-2 infectadas com o ISAV ao longo do tempo por microscopia eletrônica de transmissão (MET). Painel esquerdo: culturas celulares *mock* infectadas; Painel direito: células infectadas pelo ISAV (MOI: 1). (A) 12 hpi: visualização de áreas de eletrondensidade diferenciada no citoplasma (seta). Painel pequeno, número crescente de retículos endoplasmáticos dilatados. (B) 36 hpi: células mostrando concentração irregular dos filamentos do citoesqueleto no citoplasma (seta). Painel pequeno, presença de vesículas com algumas partículas virais maduras. (C) 60 hpi: células exibindo um tráfego intenso de vesículas intracelulares e partículas virais envoltas por membrana (seta). Painel pequeno, vesícula com partículas virais filamentosas esféricas e filamentosas. (D) 84 hpi: distribuição e organização incomuns de organelas como o retículo endoplasmático (seta). Painel pequeno, número crescente de corpúsculos autofágicos no citoplasma. Barra de escala = 500nm; hpi: horas pós infecção.

5.3 Caracterização inicial dos dados proteômicos da célula hospedeira após infecção viral

A fim de estudar e analisar sistematicamente o proteoma das células ASK-2 durante a infecção pelo ISAV, utilizamos uma abordagem global de proteínas. Os extratos de proteínas de culturas celulares *mock* infectadas e infectadas pelo ISAV foram obtidos a partir de três réplicas biológicas independentes em 12, 36, 60 e 84 hpi e foram utilizados para análise quantitativa de proteoma *shotgun* livre de marcação (exceto para o grupo controle 12hpi, onde foram duas réplicas). A medida da espectrometria de massas resultou na identificação de 1.726 proteínas. A análise da estrutura e variância dos dados utilizando PCA é mostrada na figura 7. As réplicas para ambas as condições e nos quatro tempos amostrados se mostraram mais homogêneas, exceto para o tempo de coleta de 60 horas que apresentou maior distância entre as réplicas biológicas do grupo controle (Figura 7).

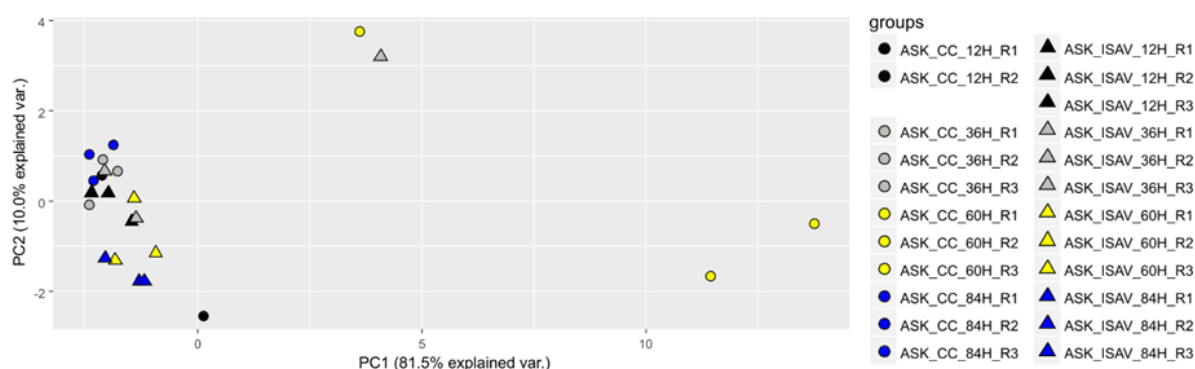


Figura 7. Análise de componentes principais para determinar a estrutura e variância dos dados de espectrometria de massas de grupos ISAV infectados (ASK_ISAV) e de grupos *mock* infectados (ASK_CC) durante o curso da infecção (12, 36, 60 e 84 hpi) e suas réplicas biológicas (R1, R2 e R3). O símbolo de cada grupo de amostra é indicado à direita.

A correlação de Pearson foi realizada para assegurar a reprodutibilidade das réplicas biológicas (total de proteínas detectadas). Dependendo do tempo, a correlação de Pearson variou de 0,710 a 0,988 para as amostras *mock* infectadas e de 0,831 a 0,990 para as amostras infectadas, o que demonstra uma ótima reprodutibilidade das réplicas. Todas as correlações obtidas estão apresentadas na tabela 3 a seguir.

Tabela 3. Correlação de Pearson de grupos ISAV infectados (ASK_ISAV) e de grupos *mock* infectados (ASK_CC) durante o curso da infecção (12, 36, 60 e 84 hpi) e suas réplicas biológicas (R1, R2 e R3).

Réplicas analisadas	Correlação de Pearson
ASK_CC_12H_R1 x ASK_CC_12H_R2	0,921
ASK_CC_36H_R1 x ASK_CC_36H_R2	0,963
ASK_CC_36H_R1 x ASK_CC_36H_R3	0,975
ASK_CC_36H_R2 x ASK_CC_36H_R3	0,987
ASK_CC_60H_R1 x ASK_CC_60H_R2	0,875
ASK_CC_60H_R1 x ASK_CC_60H_R3	0,710
ASK_CC_60H_R2 x ASK_CC_60H_R3	0,859
ASK_CC_84H_R1 x ASK_CC_84H_R2	0,986
ASK_CC_84H_R1 x ASK_CC_84H_R3	0,974
ASK_CC_84H_R2 x ASK_CC_84H_R3	0,988
ASK_ISAV_12H_R1 x ASK_ISAV_12H_R2	0,971
ASK_ISAV_12H_R1 x ASK_ISAV_12H_R3	0,951
ASK_ISAV_12H_R2 x ASK_ISAV_12H_R3	0,966
ASK_ISAV_36H_R1 x ASK_ISAV_36H_R2	0,831
ASK_ISAV_36H_R1 x ASK_ISAV_36H_R3	0,942
ASK_ISAV_36H_R2 x ASK_ISAV_36H_R3	0,875
ASK_ISAV_60H_R1 x ASK_ISAV_60H_R2	0,948
ASK_ISAV_60H_R1 x ASK_ISAV_60H_R3	0,929
ASK_ISAV_60H_R2 x ASK_ISAV_60H_R3	0,956
ASK_ISAV_84H_R1 x ASK_ISAV_84H_R2	0,973
ASK_ISAV_84H_R1 x ASK_ISAV_84H_R3	0,970
ASK_ISAV_84H_R2 x ASK_ISAV_84H_R3	0,990

5.4 O proteoma celular para cada tempo de coleta

O total de proteínas identificadas nas culturas *mock* infectadas e culturas infectadas pelo ISAV durante o curso da infecção estão representados pelos diagramas de Venn mostrados na figura 8. Às 12hpi, foram identificadas 1248 proteínas celulares no grupo *mock* infectado (círculo roxo) e 1591 proteínas celulares no grupo infectado (círculo laranja), dos quais 1239 eram comuns entre os dois grupos (Figura 8A). No final da infecção, foram identificadas no total 1358 proteínas celulares no controle e 677 proteínas celulares no grupo infectado pelo ISAV, das quais 662 eram comuns entre os dois grupos (Figura 8D). O número total de proteínas identificadas nas culturas *mock* infectadas permaneceu semelhante, no entanto, nas culturas infectadas houve uma redução no número de proteínas identificadas no final do experimento, provavelmente devido ao menor número de células vivas e efeito citopático mais extenso. Nos estágios iniciais da infecção (12 e 36 hpi), houve um número expressivo de proteínas identificadas exclusivamente nas culturas infectadas pelo ISAV. Enquanto nos estágios finais (60 e 84 hpi) os maiores números de proteínas exclusivas foram detectados nas culturas *mock* infectadas.

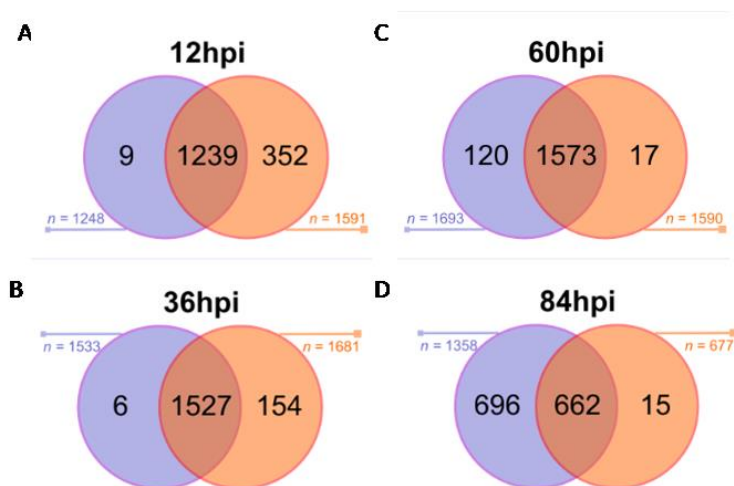


Figura 8. Total de proteínas identificadas nas culturas *mock* infectadas e nas culturas infectadas pelo ISAV durante o curso da infecção representado pelo diagrama de Venn.

Painel A: 12 hpi. B: 36 hpi C: 60 hpi D: 84 hpi.hpi = horas pós infecção. Círculo roxo: grupo *mock* infectado. Círculo laranja: grupo infectado.

O total de proteínas identificadas exclusivamente em culturas de células ASK-2 em diferentes tempos pós-infecção e suas intersecções são apresentadas na figura 9, onde o painel A possui proteínas únicas identificadas em culturas controles enquanto no painel B temos proteínas únicas identificadas em culturas infectadas pelo ISAV. Um total de 434 proteínas celulares foram identificadas exclusivamente em culturas infectadas, 80% das quais já foram detectadas no primeiro ponto de coleta (12 hpi). Em ambas as condições, o número de proteínas exclusivas em comum entre os tempos foi mantido baixo, o que demonstra que o proteoma celular é uma característica única de cada condição no tempo.

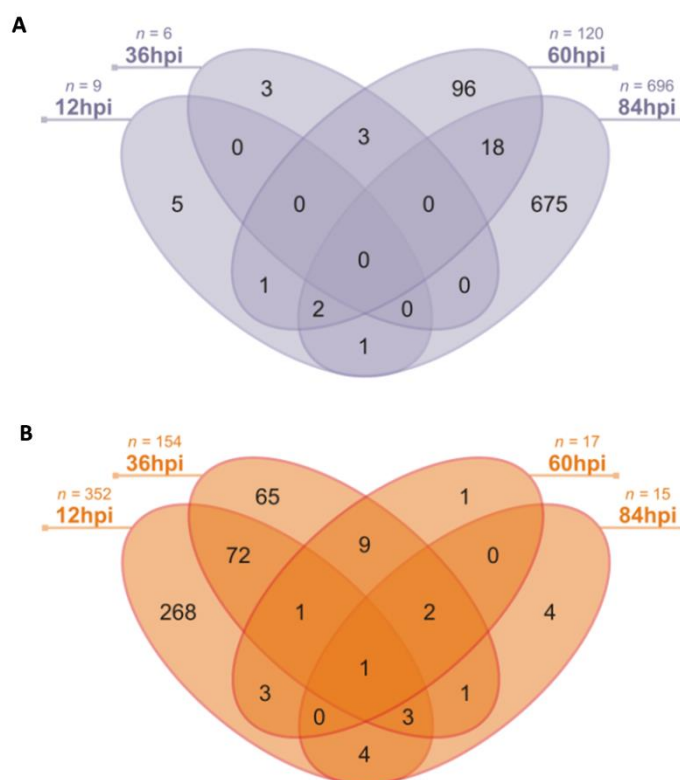


Figura 9. Proteínas totais identificadas exclusivamente em culturas de células ASK-2 em diferentes tempos pós-infecção e suas intersecções. Painel A: proteínas únicas identificadas em culturas *mock* infectadas. Painel B: proteínas únicas identificadas em culturas infectadas pelo ISAV

5.5 Alterações nos níveis de produção de proteínas durante a infecção viral

No total, identificamos 390 proteínas celulares significativamente (valor $p \leq 0,05$) reguladas na infecção pelo ISAV. O número total de proteínas diferencialmente produzidas em culturas de células ASK-2 infectadas com o ISAV em diferentes momentos após a infecção e suas interseções é mostrado na Figura 10. As proteínas reguladas positivamente foram identificadas em um total de 24 proteínas em 12 hpi, 45 em 36 hpi, 71 em 60 hpi e 3 em 84 hpi (Figura 10A). As proteínas reguladas para baixo foram identificadas no total de 6, 4, 101 e 165 proteínas em 12, 36, 60 e 84 hpi, respectivamente (Figura 10B). Aqui também podemos ver que o número de proteínas diferencialmente produzidas (reguladas para cima e para baixo) em comum entre os tempos permaneceu pequeno. Nenhuma proteína permaneceu regulada para cima ou para baixo durante os quatro tempos analisados

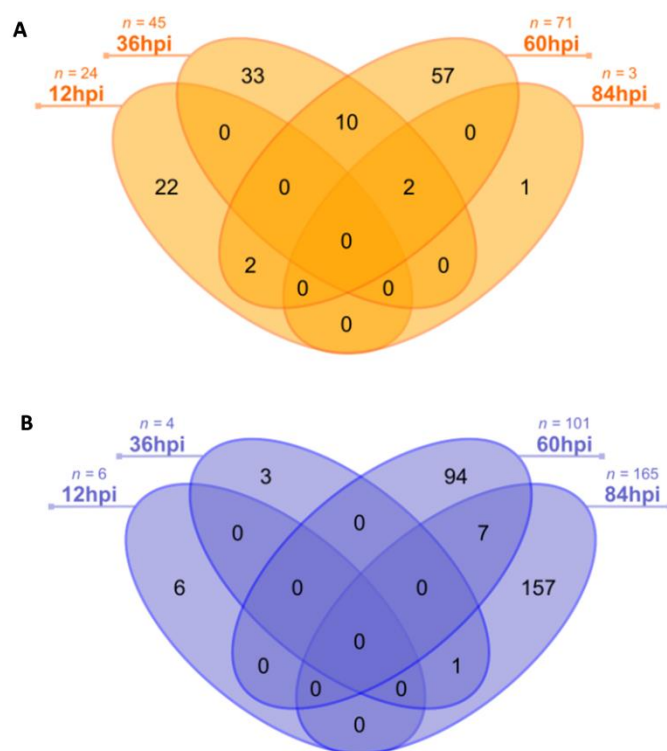


Figura 10. Total de proteínas diferencialmente produzidas em culturas de células ASK-2 infectadas com ISAV em diferentes momentos após a infecção e suas intersecções. Painel A: proteínas com maior abundância. Painel B: proteínas com menor abundância.

As alterações na abundância das proteínas (*foldchange*) nos pontos iniciais e finais após a infecção, em comparação com as respectivas proteínas nas culturas controles, são mostradas nos gráficos do tipo *volcano plot* na figura 11. O número de proteínas reguladas para baixo (pontos azuis) aumenta com a progressão da infecção.

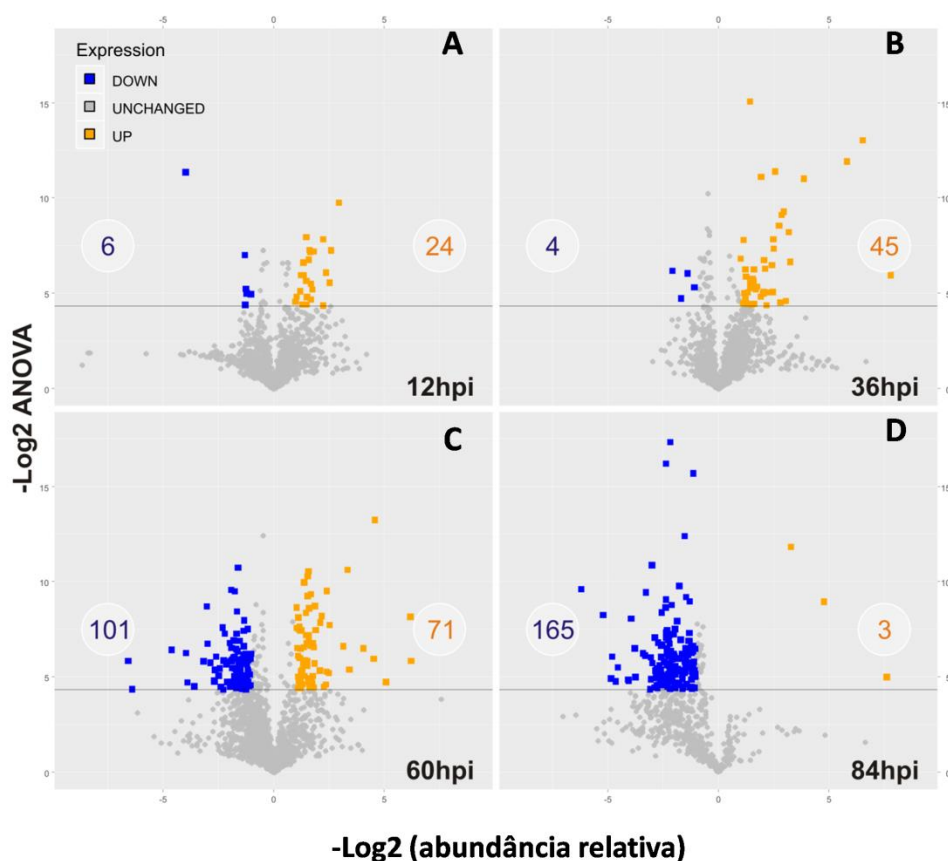


Figura 11. Gráficos *volcano plot* mostrando níveis de proteínas diferencialmente produzidas detectadas em células ASK-2 infectadas com ISAV durante o curso da infecção em comparação com o grupo controle. Eixo X, significa \log_2 (abundância relativa); Eixo Y, \log_2 (valor p). Painel A: 12 hpi. Painel B: 36 hpi. Painel C: 60 hpi. Painel D: 84 hpi. Pontos azuis: proteínas reguladas para baixo; Pontos cinzentos: proteínas que permaneceram aproximadamente na mesma abundância ou estatisticamente não significantes; Pontos laranjas: proteínas reguladas para cima.

No primeiro ponto testado (12 hpi), a maioria das proteínas celulares (80%) que apresentavam alteração na produção estavam presentes em abundâncias maiores. A proporção de proteínas que foram supra-reguladas aumentou para 91,84% às 36hpi. No tempo de 60 hpi, mais da metade das proteínas (58,72%) que apresentaram alteração na produção estavam presentes em abundâncias menores. A proporção de proteínas que foram reguladas para baixo aumentou até o ponto final (84 hpi) quando aproximadamente 98,2% das proteínas identificadas tinham uma abundância menor do que a da cultura de controle (Figura 12). Essas avaliações revelaram que a maioria das proteínas diferencialmente produzidas foi significativamente regulada para baixo em comparação com o grupo controle.

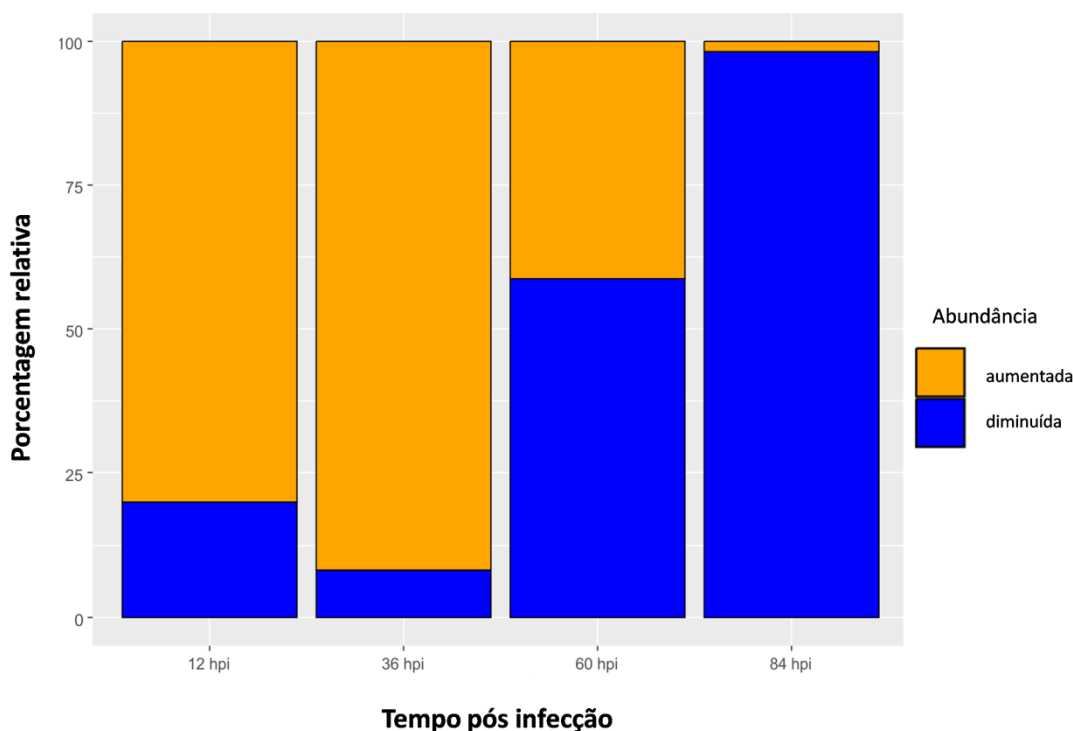


Figura 12. Proporção de proteínas diferencialmente produzidas identificadas em culturas ASK-2 após infecção pelo vírus da anemia infecciosa do salmão. O gráfico de barras mostra a proporção de proteínas com abundância aumentada (laranja) e diminuída (azul) em diferentes momentos após a infecção.

5.6 Análise de ontologia genética

Para compreender as proteínas identificadas e os processos celulares envolvidos com estas proteínas, foram utilizados testes de enriquecimento de ontologia genética (GO) para relacionar proteínas com processos biológicos. Nos estágios iniciais da infecção, 12 e 36 hpi, onde há um maior número de proteínas reguladas positivamente e de proteínas identificadas exclusivamente nas culturas infectadas, os significantes (valor de $p \leq 0,05$) termos de processo biológico supra-representados referem-se a: resposta celular ao estímulo, transporte endossomal/ montagem de revestimento de clatrina, regulação do sistema imune/resposta inflamatória, organização do citoesqueleto e comunicação celular. Os tempos finais de infecção, 60 e 84 hpi, são caracterizados por muitas proteínas celulares reguladas negativamente e por proteínas identificadas exclusivamente nas respectivas culturas *mock* infectadas. Para este período do experimento, os termos de processo biológico se referem a: regulação negativa do processo biossintético, regulação negativa da expressão gênica, transporte nucleocitoplasmático, regulação da organização do citoesqueleto de actina e tradução de proteínas.

Para analisar o conjunto de dados, realizou-se um agrupamento pelo algoritmo *fuzzy c-means* e descobriram-se conjuntos de proteínas co-reguladas, ou seja, proteínas que tiveram a variação na abundância ao longo do tempo de forma semelhante. Testes de enriquecimento de GO também foram usados para relacionar estas proteínas co-reguladas ao processo biológico. A caracterização da dinâmica das proteínas da célula hospedeira na infecção pelo ISAV no decorrer do tempo é mostrada na Figura 13. Entre as proteínas caracterizadas por um forte e constante aumento na abundância estão aquelas ligadas à “resposta a vírus” (termos GO enriquecidos no *cluster* 1). Os termos GO referentes essencialmente à síntese de proteínas nos *clusters* 3 (“tradução”) e 6 (“processamento de RNA”) são de proteínas com abundância aumentada na fase inicial da infecção e depois diminuem com a progressão da mesma. Um padrão semelhante de redução foi revelado para as proteínas relacionadas à “respiração aeróbica” (*cluster* 2). Além disso, temos um expressivo aumento entre 12 e 36 hpi na produção proteica

seguida de acentuada redução entre 36 e 60 hpi para proteínas relacionadas à “adesão celular” (*cluster* 4). Finalmente, os termos de GO referentes a “transporte mediado por vesículas” são mostrados no *cluster* 5. Até o tempo de 60 hpi a produção dessas proteínas foi aumentada, seguida por uma forte diminuição no estágio final da infecção.

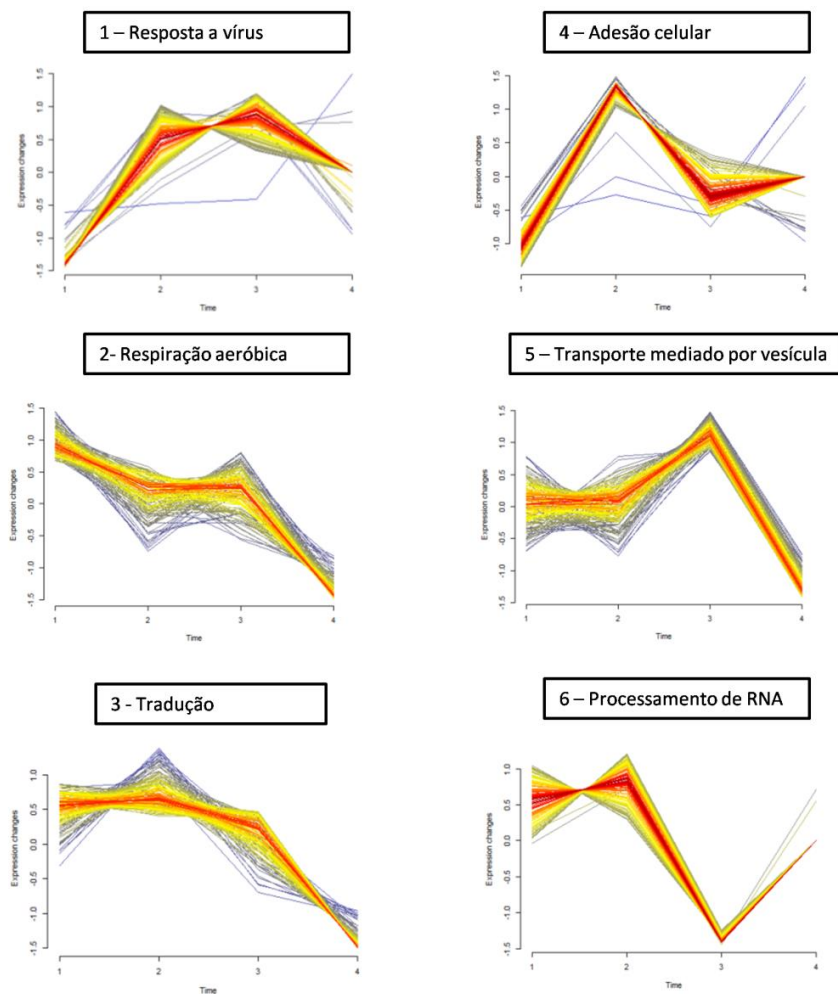


Figura 13. Agrupamento por co-regulação de proteína em células ASK-2 infectadas por ISAV. Todos os *clusters* foram criados pelo algoritmo de agrupamento *c-fuzzy* para encontrar grupos de proteínas co-reguladas. Testes de enriquecimento para ontologia genética em cada *cluster* foram realizados para encontrar termos supra-representados. Os termos GO mais significativos (processo biológico) estão incluídos nas caixas. Eixo X, tempos após a infecção (12, 36, 60 e 84 hpi); Eixo Y, abundância de proteínas normalizada.

5.7 Fatores do hospedeiro relevantes para replicação viral

Várias proteínas identificadas neste estudo já foram estudadas como fatores celulares relevantes para a replicação viral, especialmente para o vírus influenza em seus hospedeiros vertebrados superiores (aves e mamíferos). A revisão consolidada da literatura de proteínas de salmão identificadas exclusivas ou diferencialmente produzidas em culturas de células ASK-2 infectadas pelo ISAV durante as 12, 36 e 60 horas pós-infecção está listada na Tabela 4. Foi excluído o tempo de 84 horas porque o número total de proteínas identificadas reduziu bastante devido à morte celular acumulada observada na cultura celular infectada a partir deste ponto do experimento. Além disso, às 84 hpi, as células que se mantiveram vivas estavam em um processo massivo de redução da produção proteica. Além dessas proteínas celulares com papel conhecido sobre a replicação viral, foram identificadas várias proteínas celulares que ainda não tiveram seu papel investigado no ciclo do ISAV.

Foi realizada uma extrapolação das conclusões dos estudos obtidos a partir da revisão da literatura sobre o papel das proteínas celulares de interesse identificadas para melhor compreensão sobre quais estágios do ciclo do ISAV essas proteínas podem agir e elas estão listadas na Tabela 5.

A partir dos resultados obtidos foi criada uma representação esquemática do ciclo de replicação do ISAV em uma célula de salmão onde apontamos as proteínas celulares de interesse ao longo do tempo identificadas neste estudo (listadas na Tabela 5) em seu respectivo estágio de atuação no ciclo de replicação baseado na revisão da literatura (Figura 14).

Tabela 4. Análise de proteínas de salmão identificadas em culturas de células ASK-2 infectadas pelo ISAV durante as 12, 36 e 60 horas pós-infecção

Acesso Uniprot	Nome da proteína	Função (1)	Função como fator do hospedeiro (2)	Tempo (3)	Referência bibliográfica
Q9XRD5	Antígeno MHC de classe I alfa 2	Envolvido na apresentação de antígenos estranhos ao sistema imunológico	A expressão dos genes da via do MHC de classe I já foi identificada em resposta ao vírus da anemia infecciosa do salmão em células de salmão do Atlântico	Exclusivo – 12 horas	Jørgensen <i>et al.</i> , 2006
C0PUH3	Subunidade alfa-2 da proteína actina-F	Vincula-se de uma maneira independente de Ca (2 +) às extremidades de crescimento rápido dos filamentos de actina	Análise proteômica preliminar de células A549 infectadas com o vírus da influenza aviária H7N9 e o vírus da influenza A H1N1 mostraram regulação negativa da subunidade alfa-1 da proteína actina F (regulando o efeito citopático)	Exclusivo – 12 horas	Ding <i>et al.</i> , 2016
C0HBN0	Proteína relacionada a Ras Rab-7	Regulador chave no tráfico endolisossomal	GTPaseHRas foi identificado como um dos principais transdutores de sinal do hospedeiro para a entrada do vírus da hepatite C e a proteína Rap2B relacionada à Ras como cofator	Exclusivo – 12 horas Regulado para cima (1,16) – 60 horas	Zona <i>et al.</i> , 2013
C0HB84	Moesina	Envolvido em conexões de estruturas principais do citoesqueleto à membrana plasmática	Moesina foi regulada positivamente em uma infecção por vírus mutado de Influenza Aviária H9N2 PB2 E627K	Exclusivo – 12 horas Exclusivo – 36 horas	Qi <i>et al.</i> , 2015
C0HB53	Subunidade 2 do fator de iniciação de tradução eucariótica 2 (eIF-2)	Funciona nos primeiros passos da síntese de proteínas, formando um complexo ternário com o tRNA iniciador e GTP.	A ligação da proteína NS1 do vírus da influenza ao RNA de cadeia dupla inibe a ativação da proteína quinase que fosforila o fator de iniciação da tradução eIF-2	Exclusivo – 12 horas Regulado para cima (1,63) 36h	Lu <i>et al.</i> , 1995
B9EPN7					

Tabela 4. Análise de proteínas de salmão identificadas em culturas de células ASK-2 infectadas pelo ISAV durante as 12, 36 e 60 horas pós-infecção

C0HAU8	<i>Sorting nexina</i>	Envolvido na endocitose e no tráfego de vesículas intracelulares	O Ebola vírus é internalizado em células hospedeiras por macropinocitose com Nexina (SNX) 5, um marcador de endossomas específicos de macropinocitose em uma forma dependente de glicoproteína viral	Exclusivo – 12 horas	Nanboet <i>et al.</i> , 2010
				Exclusivo – 36 horas	
C0HAB6	Proteína de choque térmico 90-alpha 1(Hsp90)	Chaperona molecular que promove a maturação, manutenção estrutural e regulação adequada de proteínas alvo específicas envolvidas, por exemplo, no controle do ciclo celular e transdução de sinal	A proteína NS1 do vírus influenza A interage com a proteína de choque térmico Hsp90 em células epiteliais basais alveolares humanas: implicação para apoptose induzida por vírus	Exclusivo – 12 horas	Zhang <i>et al.</i> , 2011
C0H996	Anexina	Proteína de Ligação Cálcio/ Fosfolipídeo	Anexina humana A6 interage com a proteína do vírus da influenza A M2 e modula negativamente a infecção e prejudica o brotamento do vírus	Exclusivo – 12 e 36 horas	Ma <i>et al.</i> , 2012
				Nãodetectado – 60 horas	
C0H976	Inosina-5'-monofosfato desidrogenase	Catalisa a conversão de inosina 5'-fosfato em xantosina 5'-fosfato, na síntese de novo de nucleotídeos de guanina e desempenha um papel importante na regulação do crescimento celular	Um novo derivado amina benzo-heterocíclico N30 inibe a replicação do vírus influenza pela depressão da atividade da Inosina-5'-Monofosfato Desidrogenase	Exclusivo – 12 horas	Hu <i>et al.</i> , 2017
B9EPT4	Peptidil-prolilcic-transisomerase	Catalisa a isomerização cis-trans de ligações peptídicas imídicas de prolina em oligopeptídeos e pode, portanto, auxiliar o enrolamento de proteínas	A peptidil-prolil cis / trans-isomerase celular Pin1 facilita a replicação do coronavírus felino (a eliminação de Pin1 resultou na diminuição da replicação viral in vitro)	Exclusivo – 12 horas	Tanaka <i>et al.</i> , 2016

Tabela 4. Análise de proteínas de salmão identificadas em culturas de células ASK-2 infectadas pelo ISAV durante as 12, 36 e 60 horas pós-infecção

B9EMQ9	Proteína A associada a VAMP (proteína de membrana associada a vesícula)	Vincula-se ao OSBPL3, que medeia o recrutamento de VAPA para os locais da membrana plasmática. O complexo ORP3-VAPA estimula a sinalização RRAS.	Proteína A associada ao VAMP e à proteína 3 de ligação ao oxisterol promovem a entrada de endossomas tardios no retículo nucleoplásmico	Exclusivo – 12 horas	Santos <i>et al.</i> , 2018
				Exclusivo – 36 horas	
				Regulado para baixo(-1,91) – 60 horas	
B9EMD4	Fator de alongamento 1 gama (eEF1G)	Biossíntese de Proteínas	eEF1G interage com a proteína não estrutural 2B do vírus da febre aftosa, picornavírus causador de doenças em bovinos e suínos	Exclusivo – 12 horas	Zhang <i>et al.</i> , 2017
B5XFU9	Proteínas semelhante à ubiquitina	Ligação às proteínas e desempenha um papel fundamental na resposta imune inata à infecção viral	Muitos vírus, incluindo o vírus influenza A, usurpam a ubiquitinação e modificações semelhantes à ubiquitina para estabelecer a infecção (Entrada de Vírus e Imunidade Inata)	Exclusivo – 12 horas	Rudnicka <i>et al.</i> , 2016
				Regulado para cima (1,87) – 60 horas	
B5XDF3	Fator de <i>splicing</i> , rico em arginina/serina 2	Necessário para o <i>splicing</i> de pré-mRNA	Fator de <i>splicing</i> , rico em arginina / serina 1 foi identificado em um conjunto de proteínas celulares diferencialmente expressas em resposta à infecção pelo vírus aviário H9N2 em células humanas	Exclusivo – 12 horas	Liu <i>et al.</i> , 2008
				Exclusivo – 36 horas	
B5X6W1	Subunidade pequena Calpaína 1	Catalisa a proteólise de substratos envolvidos na remodelação do citoesqueleto e transdução de sinal	Proteína X do vírus da Hepatite B regula para cima a expressão da subunidade pequena 1 da Calpaína via fator nuclear-kB / p65 em células de hepatoma	Exclusivo – 12 horas	Zhang <i>et al.</i> , 2010

Tabela 4. Análise de proteínas de salmão identificadas em culturas de células ASK-2 infectadas pelo ISAV durante as 12, 36 e 60 horas pós-infecção

B5X633	Proteína de ligação a ácidos graxos	Transporte intracelular de ácidos graxos de cadeia longa e seus ésteres de acil-CoA	Proteínas de ligação a ácidos graxos são novos biomarcadores renais para a capacidade preditiva de lesão renal aguda	Exclusivo – 12 horas	Cruz <i>et al.</i> , 2010
B5X274	Subunidade B da ATPase vacuolar	A ATPase Vacuolar é responsável por acidificar uma variedade de compartimentos intracelulares em células eucarióticas	As ATPases vacuolares celulares desempenham um papel importante na acidificação endossômica, um passo crítico na infecção da célula hospedeira do vírus influenza A	Exclusivo – 12 horas	Muller <i>et al.</i> , 2011
B5X1D2	Serina / treonina-proteínafosfatase	Desfosforilação de proteínas	Constatou-se que a proteína serina / treonina fosfatase humana 6 interage diretamente e positivamente regula a atividade da RNA polimerase viral dependente de RNA do vírus influenza A	Exclusivo – 12 horas	York <i>et al.</i> , 2014
B5X0W0				Exclusivo – 36 horas	
				Regulado para baixo(-2,67) – 60 horas	
B5X1B5	Alfa-enolase	Glicólise	A nucleoproteína do vírus da influenza A interage com proteínas envolvidas na glicólise, como a alfa-enolase 1 (ensaio <i>in vitro</i>)	Exclusivo – 12 horas	Kumar <i>et al.</i> , 2017
B5X0T7	Ribonucleoproteína nuclear heterogênea A0	Envolvido na regulação pós-transcricional de mRNAs	A ribonucleoproteína nuclear heterogênea A2 / B1 interage com a nucleoproteína do vírus Influenza A em células de mamíferos e pode atuar como um regulador positivo na síntese de RNA viral	Exclusivo – 12 e 36 horas	Chang <i>et al.</i> , 2017
A0A1S3LJ82	Ribonucleoproteína nuclear heterogênea A1			Regulado para cima (1,48) – 12 horas e Regulado para cima (2,18) – 60 horas	

Tabela 4. Análise de proteínas de salmão identificadas em culturas de células ASK-2 infectadas pelo ISAV durante as 12, 36 e 60 horas pós-infecção

A0A1S3T1X9	Ribonucleoproteína nuclear heterogênea R-like	Desempenha um papel importante no processamento do mRNA precursor no núcleo		Regulado para baixo (-1,68) – 60 horas	
A0A1S3SYI8	Ribonucleoproteína nuclear heterogênea L-like			Nãodetectado – 60 horas	
B5DH06	Canal aniônico dependente de voltagem 2	Transporte transmembrane aniônico	Papel crítico para o canal aniônico dependente de voltagem 2 na doença bursal infecciosa (apoptose induzida por vírus em células hospedeiras) via interação com a proteína viral 5	Exclusivo – 12 horas	Li <i>et al.</i> , 2012
				Exclusivo – 36 horas	
				Nãodetectado – 60 horas	
C0HA79	Palmitoiltransferase	Pode desempenhar um papel no transporte de Mg (2+)	A palmitoiltransferase ZDHHC20 aumenta a palmitoilação da proteína transmembrana 3 induzida por interferon (IFITM3) e sua atividade antiviral. IFITM3 é uma proteína localizada no endossoma e no lisossoma celular que restringe a infecção pelo vírus da gripe	Exclusivo – 12 horas	McMichael <i>et al.</i> , 2017
				Nãodetectado – 60 horas	
A0A1S3SM21	GTPase 1 muito grande induzida por interferon	Ligação de GTP; ligação do íon de zinco	As GTPases humanas parecem detectar infecção viral detectando estruturas semelhantes a nucleocapsídeos. Esses componentes virais são capturados e classificados em locais onde ficam indisponíveis para a geração de novas partículas de vírus	Exclusivo – 12 horas	Haller <i>et al.</i> , 2007

Tabela 4. Análise de proteínas de salmão identificadas em culturas de células ASK-2 infectadas pelo ISAV durante as 12, 36 e 60 horas pós-infecção

A0A1S3T573	Proteína relacionada a Ras Rab-11B-like	Principais reguladores do tráfico de membrana intracelular	O RAB11A é um fator essencial para o transporte do genoma do vírus Influenza para a membrana plasmática.	Exclusivo – 12 horas	Eisfeldt <i>et al.</i> , 2011
				Exclusivo – 36 horas	
A0A1S3SGH1	Filamina-A-like	Ancora várias proteínas transmembrana no citoesqueleto de actina e serve como suporte para uma ampla gama de proteínas de sinalização citoplasmática	Proteína filamina A interage com a proteína gag do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 e contribui para a montagem produtiva de partículas	Exclusivo – 12 horas	Cooper <i>et al.</i> , 2011
A0A1S3MIN2				Regulado para cima (1,24) – 12 horas	
A0A1S3SYG7	Alfa-actinina-4	Proteína de ligação cruzada de F-actina que se acredita que ancora a actina a uma variedade de estruturas intracelulares	A nucleoproteína viral do influenza A interage com a proteína α -actinina-4 do citoesqueleto para a replicação viral. O silenciamento da expressão da actinina-4 resultou em uma diminuição significativa na produção da proteína viral e nos níveis de RNA viral	Exclusivo – 12 horas e Regulado para cima (1,42) – 60 horas	Sharma <i>et al.</i> , 2014
A0A1S3NRI4					
A0A1S3S7M1	Alfa-actinina-2-like			Exclusivo – 36 horas e Regulado para cima (4,06) – 60 horas	
A0A1S3QM27					
A0A1S3S7L8	Subunidade Ribonucleosideo-Difosfato Redutase M2	Fornece os precursores necessários para a síntese de DNA	Inibição da replicação do vírus da hepatite B, visando a proteína ribonucleotideo redutase M2	Exclusivo – 12 horas	Liu <i>et al.</i> , 2016
A0A1S3S0I0	Proteína ring finger 24-like	Tráfego intracelular	A nucleoproteína do vírus influenza A induz a sinalização p53 e apoptose via atenuação da proteína do hospedeiro <i>ringfinger43</i>	Exclusivo – 12 horas	Nailwalet <i>et al.</i> , 2015

Tabela 4. Análise de proteínas de salmão identificadas em culturas de células ASK-2 infectadas pelo ISAV durante as 12, 36 e 60 horas pós-infecção

A0A1S3RRQ4	Catenina delta-1-like	Associa-se com e regula as propriedades de adesão celular de caderinas e levam à ativação de genes alvo da via de sinalização Wnt	Regulação da replicação do vírus da gripe por sinalização Wnt/ β -catenina. <i>Knockdown</i> de β -catenina reduz a produção da proteína viral e do vírus	Exclusivo – 12 horas	More <i>et al.</i> 2018
A0A1S3STA1				Regulado para baixo (-1,39) – 60 horas	
A0A1S3RHE4	RuvB-like helicase	Regulação transcricional, replicação de DNA e reparo de DNA	RuvB-Like Proteína 2 (RBL2) é um supressor de polimerases do vírus da influenza A. RBL2 humana parece interferir com a oligomerização da nucleoproteína viral, um passo crítico na montagem de complexos de replicação viral	Exclusivo – 12 horas	Kakugawa <i>et al.</i> , 2009
A0A1S3RGC0	E3 ubiquitina-proteína ligase TRIM39-like	Atividade da ligase e pode facilitar a apoptose	E3 Ubiquitina Ligase NEDD4 promove infecção pelo vírus Influenza pela diminuição dos níveis da proteína transmembrana 3 (IFITM3) induzida por interferon (IFN) pela sua ubiquitinação	Exclusivo – 12 horas	Chesarino <i>et al.</i> , 2015
A0A1S3SUI1	E3 ubiquitina-proteína ligase BRE1A-like	Organização de cromatina; monoubiquitinação de histonas		Regulado para cima (1,37) – 12 horas	
A0A1S3T3A8	E3 ubiquitina-proteína ligase HERC2			Exclusivo – 36 horas e Não detectado – 60 horas	

Tabela 4. Análise de proteínas de salmão identificadas em culturas de células ASK-2 infectadas pelo ISAV durante as 12, 36 e 60 horas pós-infecção

A0A1S3RA77	Proteína <i>NLRC3-like</i>	Regulador negativo da resposta imune inata	A proteína IQGAP1 interage com o NLRC3 e inibe a produção de IFN tipo I. NLRC3 é um domínio de ligação a nucleotídeos recentemente caracterizado, proteína repetida rica em leucina (NLR) que regula negativamente a via do IFN tipo I	Exclusivo – 12 horas	Tocker <i>et al.</i> , 2017
A0A1S3S0M4				Regulado para baixo (-1,77) – 60 horas	
A0A1S3R293	Proteína <i>Hedgehog</i>	Proteólise; sinalização célula-célula e desenvolvimento de organismos multicelulares	Influenza NS1 modula diretamente Hedgehog sinalização durante a infecção. NS1 interage diretamente com o mediador transcricional, Ci/Gli1 e pode influenciar a letalidade do hospedeiro	Exclusivo – 12 horas	Smelkinson <i>et al.</i> , 2017
A0A1S3QV10	Proteína Choque térmico de 70 kDa 4L-like	Possui atividade de chaperona	Tem sido relatado que o cognato de choque térmico 70 (Hsc70) interage com M1 e NEP do vírus influenza para a exportação da ribonucleoproteína viral. As interações do vírus da anemia infecciosa do salmão (M1 e NEP), assim como o hospedeiro (Hsc70), podem ajudar a entender a exportação da ribonucleoproteína viral	Exclusivo – 12 horas	Zhang <i>et al.</i> , 2017
A0A1S3SPI5				Regulado para baixo (-1,31) – 60 horas	
A0A1S3LNZ2				Ligação de ATP	
A0A1S3QUK1	Mucina-5AC-like	Glicoproteína formadora de gel que protege a mucosa da infecção e dos danos químicos	Influenza A induz a mucina secretora principal de vias aéreas MUC5AC em uma via de protease-EGFR-extracelular regulada por quinase-Sp1-dependente	Exclusivo – 12 horas	Barbier <i>et al.</i> , 2012
A0A1S3RUM0				Não detectado – 60 horas	

Tabela 4. Análise de proteínas de salmão identificadas em culturas de células ASK-2 infectadas pelo ISAV durante as 12, 36 e 60 horas pós-infecção

A0A1S3QGS6	Proteína contendo repetição rica em leucina <i>32-like</i>	Regulação positiva da expressão gênica	Três famílias de receptores de reconhecimento de padrões, receptores Toll-like (TLRs), proteínas do gene 1 indutíveis pelo ácido retinóico como as helicases (RLRs) e domínio de ligação de nucleotídeos e proteínas contendo repetições ricas em leucina (NLRs) estão envolvidas no reconhecimento de vírus da gripe e eles cooperativamente operam para responder ao vírus em cultura celular	Exclusivo – 12 horas	Wu <i>et al.</i> , 2011
				Exclusivo – 36 horas	
				Regulado para baixo (-1,39) – 60 horas	
A0A1S3QGL6	Proteína 2 de ligação a elementos a montante- <i>like</i>	Pode desempenhar um papel no tráfego de mRNA	A proteína 2 de ligação ao elemento a montante interage com o local de entrada no ribossomo do enterovírus 71 e regula negativamente a tradução viral	Exclusivo – 12 horas	Lin <i>et al.</i> , 2009
A0A1S3PRZ4	Proteína associada ao citoesqueleto <i>5-like</i>	Regula a dinâmica dos microtúbulos e a organização de microtúbulos	Análises proteômicas globais e quantitativas de cães infectados pelo vírus da influenza H3N2 mostram que a produção de proteínas associadas ao citoesqueleto e à apoptose foi suprimida ao passo que proteínas induzidas por interferon e outras proteínas de imunidade inata foram induzidas após a infecção	Exclusivo – 12 horas	Suet <i>et al.</i> , 2015
				Nãodetectado – 36 horas e 60 horas	

Tabela 4. Análise de proteínas de salmão identificadas em culturas de células ASK-2 infectadas pelo ISAV durante as 12, 36 e 60 horas pós-infecção

A0A1S3PMT4	Cinesina-like	Movimento baseado em microtúbulos e essencial para a citocinese	Uma proteína semelhante à cinesina nuclear interage com e estimula a atividade do sinal de exportação nuclear rico em leucina da proteína Rev do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 e pode desempenhar um papel no transporte de mRNA durante a infecção pelo HIV	Exclusivo – 12 horas e Não detectado – 60 horas	Venkatesh <i>et al.</i> , 2003
A0A1S3NEA7	Cinesina-like KIF20B			Regulado para cima (1,00) – 12 horas e Regulado para baixo (-1,75) – 60 horas	
A0A1S3P1H6	Cinesina-like KIF21B			Exclusivo – 36 e 60 horas	
A0A1S3LVN8	Cinesina-like KIF1A			Regulado para cima (2,42) – 60 horas	
A0A1S3PA42	Receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas alfa	Tirosina-proteína quinase que atua como um receptor da superfície celular e promove ou inibe a proliferação celular e a migração celular	O receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas- α é o receptor celular para o trímero de gHgLgO do citomegalovírus humano	Exclusivo – 12 horas	Kabanova <i>et al.</i> , 2016
				Regulado para cima (1,93) – 36 horas	
A0A1S3N4P5	Reticulon	Pode estar envolvido no tráfego de membrana no início da via secretória	A proteína hospedeira Reticulon 3.1A é utilizada pelos flavivírus para facilitar o remodelamento da membrana, incorporando fatores virais e do hospedeiro facilitando a replicação viral	Exclusivo – 12 horas	Aktepe <i>et al.</i> , 2017
				Regulado para cima (1,43) – 36 horas	

Tabela 4. Análise de proteínas de salmão identificadas em culturas de células ASK-2 infectadas pelo ISAV durante as 12, 36 e 60 horas pós-infecção

A0A1S3MLI2	Proteína quinase ativada por mitógeno	Cascata de MAPK; fosforilação de proteínas	A infecção por ISAV promove a apoptose de células SHK-1 através de uma via de sinalização ROS / p38MAPK / Bad	Exclusivo – 12 horas	Olavarria <i>et al.</i> , 2015
A0A1S3MI08	Fosfoinositidofosfolipase C	Processo catabólico lipídico e transdução de sinal intracelular	A sinalização de fosfoinositidofosfolipase C 1 (PLC-Y1) é ativada pelo vírus Influenza H1N1 e medeia a entrada viral em células epiteliais humanas. O H1N1 também ativa a sinalização de PLC γ -1 em macrófagos humanos e está envolvido nas respostas inflamatórias induzidas pelo vírus	Exclusivo – 12 horas	Zhu <i>et al.</i> , 2016
A0A1S3MFE1	Fator de transcrição E2F1- <i>like</i>	Ativador de transcrição de genes cujos produtos estão envolvidos na regulação do ciclo celular ou na replicação do DNA	A nucleoproteína de influenza A impacta negativamente a proteína antiapoptótica API5 para aumentar a apoptose dependente de E2F1 e a replicação do vírus	Exclusivo – 12 horas	Mayank <i>et al.</i> , 2015
A0A1S3MCY0	Serina / treonina-proteína quinase do RAF proto-oncogene- <i>like</i>	Atua como uma ligação regulatória (cascata MAPK/ ERK), incluindo proliferação, diferenciação, apoptose e sobrevivência	Durante a replicação, o vírus Influenza ativa a cascata Raf / MEK / ERK e o fator de transcrição NF-kappaB. Ambos resultam em efeitos pro-virais e antivirais, promovendo o transporte do genoma viral para a montagem de vírus	Exclusivo – 12 horas Regulado para cima (1,22) – 36 horas	Pinto <i>et al.</i> , 2011
A0A1S3M8X5	Apolipoproteína B-100 (ApoB)	Transporte lipídico	A ApoB é necessária para a geração de vírus da Hepatite C (HCV) totalmente infecciosos e a inibição da ApoB com mipomersen bloqueia o HCV	Exclusivo – 12 horas e Não detectado – 60 horas	Schaefer <i>et al.</i> , 2016
A0A1S3SQ44	Apolipoproteína B-100- <i>like</i>			Regulado para cima (3,88) 36h	

Tabela 4. Análise de proteínas de salmão identificadas em culturas de células ASK-2 infectadas pelo ISAV durante as 12, 36 e 60 horas pós-infecção

A0A1S3M6J1	Aminopeptidase	Proteólise; regulação da pressão arterial, processamento e apresentação de antígeno peptídico via MHC classe I	Células A549 infectadas com o vírus influenza H1N1, em que o H1N1 ativa p53, levando a regulação positiva da aminopeptidase 1 e um aumento correspondente na expressão do complexo I de histocompatibilidade principal	Exclusivo – 12 horas	Wang <i>et al.</i> , 2013
A0A1S3PX07				Regulado para baixo (-2,59) – 60 horas	
A0A1S3LZK5	Obscurina	Regulação da transdução do sinal da proteína Rho	O adaptador do citoesqueleto, obscurina-1, interage com o papilomavírus humano (HPV) 16 da proteína capsídica L2 e é necessário para a endocitose pelo HPV16.	Exclusivo – 12 horas	Wustenhagen <i>et al.</i> , 2016
				Exclusivo – 36 horas	
				Nãodetectado – 60 horas	
A0A1S3LZ10	Complemento C3-like	C3 desempenha um papel central na ativação do sistema complemento (vias clássica e alternativa)	As vias clássica e alternativa do complemento são essenciais para a proteção contra a infecção pelo vírus influenza A (H1N1). Foi demonstrado que a infecção por vírus em camundongos C3 -/- resulta em aumento da carga viral e 100% de mortalidade	Exclusivo – 12 horas	Rattan <i>et al.</i> , 2017
A0A1S3LYG0	Canal de cátion de potencial receptor transiente subfamília A membro 1-like (TRPA1)	Transportetransmembranar de íons	A infecção por vírus respiratórios, como o vírus sincicial respiratório (VSR) e o vírus do sarampo (MV), regulam positivamente o receptor TRPA1 nas células das vias aéreas	Exclusivo – 12 horas	Omar <i>et al.</i> , 2017
				Regulado para cima (6,54) 36 h	
				Regulado para cima (6,23) – 60 horas	

Tabela 4. Análise de proteínas de salmão identificadas em culturas de células ASK-2 infectadas pelo ISAV durante as 12, 36 e 60 horas pós-infecção

A0A1S3LML0	p2X purinoceptor	Receptor para ATP que atua como um canal iônico controlado por ligante	A ativação do receptor P2X7 purinérgico está envolvida na resposta imune exacerbada (indução e manutenção da inflamação excessiva) observada durante a infecção pelo vírus influenza	Exclusivo – 12 horas Não detectado – 60 horas	Leyva-Grado <i>et al.</i> , 2017
A0A1S3L6F1	Subunidade reguladora 5 da fosfoinositida 3-quinase - like	Fosforilação; regulação da atividade da fosfatidilinositol 3-quinase	Fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) é ativada pelo vírus da influenza (vRNA) via o padrão de patógeno receptor Rig-I para promover a produção eficiente de interferon tipo I	Exclusivo – 12 horas	Hrinciuș <i>et al.</i> , 2011
A0A1S3LHH0	Fosfatidilinositol 4-fosfato 5-quinase tipo 1 beta like	Fosforilação; processo metabólico de fosfatidilinositol		Regulado para cima (2,24) – 12 horas	
A0A1S3L632	Proteína interagindo com a família rab11- 1-like	Envolvido no processo de reciclagem endossomal e no controle do tráfego de membrana ao longo da fagocitose	A via Rab11 (proteína interagindo com a família Rab11-3 e Rab11) é necessária para a formação de filamento e brotamento de vírus influenza A	Exclusivo – 12 horas	Bruce <i>et al.</i> , 2010
A0A1S3NNR1	Fator de troca de nucleotídeos rho guanina 2- like	Ativa Rho-GTPases. Envolvido na permeabilidade da barreira epitelial, motilidade celular, apresentação de antígeno, regulação do ciclo celular e resposta imune inata	A ativação do fator de troca de nucleotídeos guanina associado a microtúbulos GEF-H1 é essencial para a detecção de ácidos nucleicos virais intracelulares por receptores tipo RIG-I	Exclusivo – 12 e 36 horas	Chiang <i>et al.</i> , 2014
A0A1S3RHC2	Fator de troca de nucleotídeo rho guanina 15- like	Regulação da transdução do sinal da proteína Rho		Regulado para cima (1,91) – 60 horas	

Tabela 4. Análise de proteínas de salmão identificadas em culturas de células ASK-2 infectadas pelo ISAV durante as 12, 36 e 60 horas pós-infecção

A0A1S3MHQ1	fator de transcrição dependente de AMP cíclico ATF-7- <i>like</i>	Liga o elemento de resposta a cAMP (CRE), uma sequência presente em muitos promotores celulares e virais	Proteína NS2 do vírus da hepatite C com uma nova função de regulação da expressão gênica celular (para baixo) e proliferação através da ativação da via dependente de cAMP	Exclusivo – 12 horas	Kim <i>et al.</i> , 2007
				Regulado para cima (5,83) – 36 horas	
				Regulado para cima (5,09) 60h	
A0A1S3L1Z2	Peroxirredoxina-5, mitocondrial - <i>like</i>	Desempenha um papel na proteção celular contra o estresse oxidativo pela desintoxicação de peróxidos e como sensor de eventos de sinalização mediados por peróxido de hidrogênio	A proteína Peroxirredoxina 1 (Prdx-1) interage com as ribonucleoproteínas do vírus influenza. Nocaute da expressão do Prdx-1 inibe a replicação do influenza A. A inibição da replicação não está correlacionada com defeitos no início da infecção ou na expressão de mRNA, mas está correlacionada com a inibição da acumulação de proteínas virais e vRNAs	Exclusivo – 12 horas	Dai <i>et al.</i> , 2018
A0A1S3L1M0	proteína ativadora de GTPase 31	Funciona como uma proteína ativadora de GTPase. Necessário para propagação e migração de células	Vírus da gripe aviária de baixa patogenicidade estão sendo tolerados em frangos, mas causando ruptura celular em mamíferos. Em células de aves, regulação positiva de fatores que induzem a infectividade viral (proteína ativadora de RhoGTPase 21) enquanto reduz a apoptose e aumenta a proliferação celular	Exclusivo – 12 horas	Taye <i>et al.</i> , 2017
A0A1S3QU43	proteína ativadora de GTPase 29- <i>like</i>			Exclusivo – 36 e 60 horas	
A0A1S3KZ21	Nucleofosmina(NPM)	Envolvido em diversos processos celulares: biogênese do ribossomo, duplicação do centrôssomo e a proliferação celular	Co-imunoprecipitação em células infectadas confirmaram a associação da NPM com a ribonucleoproteína de IAV. Imunofluorescência revelou que NPM é recrutada para locais de transcrição e replicação em células infectadas	Exclusivo – 12 horas	Mayer <i>et al.</i> , 2006

Tabela 4. Análise de proteínas de salmão identificadas em culturas de células ASK-2 infectadas pelo ISAV durante as 12, 36 e 60 horas pós-infecção

A0A1S3KX89	Proteína de ligação a p53 supressora de tumor 1 like (53BP1)	Reparar proteína envolvida em resposta a danos no DNA	Interação Funcional entre a Proteína de Replicação do Vírus Epstein-BarrZta e a Proteína de Resposta ao Dano do DNA do Hospedeiro 53BP1. <i>Knockdown</i> da expressão de 53BP1 reduziu a replicação viral	Exclusivo – 12 horas	Bailey <i>et al.</i> , 2009
				Regulado para baixo(-1,58) – 60 horas	
A0A1S3KUF2	Antígeno CD276-like	Pode participar na regulação da resposta imune mediada por células T	O CD276 desempenha um papel importante na inibição da função das células T. Durante estimulação do vírus da septicemia hemorrágica, a transcrição de CD276 foi induzida em horas precoces no fígado e expressa tardiamente nos rins, no baço, no intestino e nos tecidos das guelras	Exclusivo – 12 horas	Hwang <i>et al.</i> , 2018
				Regulado para cima (2,23) – 36 horas	
B5X8H4	Pequeno modificador relacionado à ubiquitina	Regulação da síntese de proteínas através da sumoilação	Regulação do tráfego nucleocitoplasmático de proteínas virais e celulares pela ubiquitina e pequenos modificadores relacionados à ubiquitina. Alguns vírus, como o da gripe, para transportar suas proteínas dentro e fora do núcleo, exploram a ubiquitinação e a sumoilação	Regulado para cima (1,48) – 12 horas	Wang <i>et al.</i> , 2012
B5RI64	Fator de barreira à autointegração (BAF)	Ligação ao DNA e manutenção do genoma	A capacidade do BAF de interceptar e compactar o DNA viral no citoplasma. BAF impacta ciclos de vida de retrovírus, poxvírus e herpesvírus	Regulado para cima (1,48) – 12 horas	Wiebe <i>et al.</i> , 2016
B5X3W0	Proteína de ligação a GTP SAR1a	Envolvido no transporte do retículo endoplasmático para o aparelho de Golgi	Sar1 promove o brotamento de vesículas a partir do Retículo Endoplasmático (ER). O anticorpo específico para Sar1 inibiu potencialmente a exportação da glicoproteína do vírus da estomatite vesicular (VSV-G) do ER <i>in vitro</i>	Exclusivo – 36 horas	Kugeet <i>et al.</i> , 1994

Tabela 4. Análise de proteínas de salmão identificadas em culturas de células ASK-2 infectadas pelo ISAV durante as 12, 36 e 60 horas pós-infecção

A0A1S3SWM6	Protocaderina -11 X-like	Potencial proteína de adesão celular dependente de cálcio	A protocaderina-1 (PCDH1) é essencial para a entrada nas células por hantavírus do Novo Mundo em células endoteliais pulmonares. As glicoproteínas de superfície do hantavírus reconhecem diretamente o domínio de repetição extracelular mais externo de PCDH1	Exclusivo – 36 horas e Regulado para baixo (-1,95) – 60 horas	Jangraet <i>et al.</i> , 2018
A0A1S3RIL4	Protocaderina beta-16-like	Exclusivo – 36 horas			
A0A1S3PK14	Protocaderina Fat 4-like	Regulado para cima (1,51) 60h			
A0A1S3RL81	Proteína up-regulada hipóxia 1	Tem papel fundamental nos mecanismos celulares citoprotetores desencadeados pela privação de oxigênio	Análise do proteoma de resposta do hospedeiro após infecção pelo vírus herpes simplex tipo 1 (HSV) mostra que as proteínas reguladas diferencialmente incluem o precursor da proteína regulada hipóxia 1, que não foi identificado previamente em nenhuma infecção viral	Exclusivo – 36 horas	Berardet <i>et al.</i> , 2015
A0A1S3QW97	CDC42 quinaseativada 1-like	Fosforilação de proteínas. Implicado na disseminação e migração celular, sobrevivência celular e crescimento celular	A infecção precoce pelo vírus herpes simplex tipo 1 é dependente da sinalização regulada de Rac1 /Cdc42 em células MDCKII epiteliais. Mutantes Rac1/Cdc42 inibiram a infectividade	Exclusivo – 36 horas	Hoppe <i>et al.</i> , 2006
				Nãodetectado – 60 horas	
A0A1S3P5P8	Proteína da família PRA1	Regulador geral de proteína Rab necessário para a formação de vesículas a partir do complexo de Golgi. Podecontrolara ancoragem e fusão da vesícula	Domínios citoplasmáticos da glicoproteína de envelope de diversos lentivírus (vírus da imunodeficiência humana, bovina e felina) interagem com o acceptor Rab Prenilado 1 (PRA1)	Exclusivo – 36 horas	Evans <i>et al.</i> , 2002
				Nãodetectado – 60 horas	

Tabela 4. Análise de proteínas de salmão identificadas em culturas de células ASK-2 infectadas pelo ISAV durante as 12, 36 e 60 horas pós-infecção

A0A1S3MW09	Proteína contendo domínio em espiral enrolada 94- like	Nenhuma informação funcional para esta proteína	Inibição da montagem do HIV-1 pelo domínio espiral enrolado contendo proteína 8 (CCDC8) em células humanas. A super-expressão exógena de CCDC8 pode inibir fortemente a produção de HIV-1	Exclusivo – 36 horas	Wei <i>et al.</i> , 2015
A0A1S3KQS8	Proteína contendo domínio em espiral enrolada 73			Exclusivo – 36 horas e Regulado para baixo(-1,98) – 60 horas	
A0A1S3MEN9	Proteína contendo domínio em espiral enrolada 30			Regulado para baixo (-1,15) – 60 horas	
A0A1S3P742	Proteína contendo domínio em espiral enrolada 63	Desempenha um papel na espermiogênese		Regulado para cima (1,66) – 60 horas	
A0A1S3MQG9	Proteína ativadora de GTPase-rab 1-like (Rab1)	Pode desempenhar um papel na nucleação de microtúbulos pelo centróssoma	Rab1a/b e Rab43 são importantes para o Envolvimento Secundário do Vírus Herpes Simplex 1. Na ausência de Rab1a/b, as glicoproteínas virais são incapazes de trafegar do retículo endoplasmático para o compartimento de montagem e, assim, partículas não-envelopadas se acumulam no citoplasma	Exclusivo – 36 horas	Zenner <i>et al.</i> , 2011
A0A1S3KRF1				Regulado para baixo (-1,34)60h	
A0A1S3MLT4	Fator de fixação do andaime B2 - like	Regulação da transcrição, modelada por DNA; regulação do processamento de mRNA	O fator B de fixação do andaime (SAFB1) suprime a infecção por HIV-1 das células CD4+, impedindo a ligação da RNA polimerase II à repetição terminal longa do HIV-1 (transcrição). O SAFB1 se liga ao HIV-1-LTR e interage fisicamente com a RNA pol II, reprimindo a transcrição do HIV-1	Exclusivo – 36 horas	Ma <i>et al.</i> , 2018
				Nãodetectado – 60 horas	

Tabela 4. Análise de proteínas de salmão identificadas em culturas de células ASK-2 infectadas pelo ISAV durante as 12, 36 e 60 horas pós-infecção

A0A1S3M1T5	Proteína 1 de ligação a elementos a montante- <i>like</i>	Pode agir tanto como ativador e repressor de transcrição	A proteína 1 de ligação ao elemento a montante interage com o local de entrada no ribossomo do enterovírus 71 e regula positivamente a tradução viral	Exclusivo – 36 horas	Huang <i>et al.</i> , 2011
A0A1S3L7Q2	Queratina, tipo I citoesqueleto 13-like	Organização do citoesqueleto. Atividade molecular estrutural.	Análise Proteômica da Expressão Diferencial de Proteínas Celulares em Resposta à Infecção pelo H9N2 de Células A549. Actina e a queratina foram identificadas, sugerindo que o citoesqueleto desempenha um papel importante na infecção por IAV de células de mamíferos	Exclusivo – 36 horas	Yu <i>et al.</i> , 2016
A0A1S3P7C0	Queratina, tipo II citoesqueleto 8-like			Regulado para baixo(-1,67) 60h	
A0A1S3KNG8	Proteína contendo domínios NACHT, LRR e PYD 12 like	Pode mediar a ativação de CASP1 (complexo polimérico de inflamassomo) e promover a ativação de NF-kappa-B	Infecção pelo vírus do sarampo (MeV) induz a produção de citocinas e quimiocinas associadas ao fator nuclear kappa-light- <i>enhancer</i> de células B ativadas sinalizando e ativando o inflamassoma com a proteína contendo domínios NACHT, LRR e PYD (NLRP3)	Exclusivo – 36 horas Nãodetectado – 60 horas	Griffin, 2016
B5X4F1	Potenciador de Procolágeno C-Endopeptidase 1	Liga-se ao pró-peptídeo C-terminal do procolágeno tipo I e aumenta a atividade da procolágeno C-proteinase	A caracterização proteômica do líquido cefalorraquidiano de pacientes com demência associada ao HIV-1 (HAD) mostrou expressão diferencial do estimulador da endopeptidase 1 do procolágeno C como um potencial biomarcador da HAD	Regulado para cima (1,86) – 36 horas	Rozeke <i>et al.</i> , 2007
A0A1S3RKI5	Cadeiapesada de Clatrina	A clatrina é a principal proteína do revestimento poliédrico de vesículas. Transporte de proteínas intracelulares.	Entrada do IAV H5N1 em células hospedeiras é por endocitose dependente de clatrina. Hemaglutinina, glicoproteína de superfície viral, liga a resíduos de ácido siálico das glicoproteínas e glicolipídeos da célula hospedeira	Regulado para cima (1,25) – 36 horas	Wang <i>et al.</i> , 2009

Tabela 4. Análise de proteínas de salmão identificadas em culturas de células ASK-2 infectadas pelo ISAV durante as 12, 36 e 60 horas pós-infecção

A0A1S3Q478	Proteína induzida por interferon com repetições de tetratricopeptídeo 5- <i>like</i> (IFIT5)	Proteína de ligação ao RNA induzida por interferon envolvida na resposta imune inata. Tem um reconhecimento amplo e adaptável da estrutura do RNA importante para a especificidade do reconhecimento de RNA na defesa antiviral	IFIT5 aviário (ch) antagoniza a replicação de vírus de RNA. Esta proteína chIFIT5 interagiu com estruturas de RNA viral de sentido negativo que transportavam um grupo trifosfato no seu terminal 5'. Essa interação reduziu a replicação dos vírus de RNA através da detecção de ácidos nucleicos e levou à possível inibição da tradução	Regulado para cima (3,07) – 36 horas	Santhakumaret al., 2018
A0A1S3P748	Fosfatase de fosfatidato LPIN2- <i>like</i>	Desempenha importantes papéis no controle do metabolismo de ácidos graxos em diferentes níveis	A fosfatase de fosfatidato hospedeira Pah1 limita a replicação viral regulando a síntese de fosfolípidios. Replicação significativamente aumentada do vírus do mosaico do bromo (BMV) e crescimento celular muito melhor em células de levedura sem PAH1	Regulado para cima (1,25) – 36 horas	Zhang et al., 2018
A0A1S3L5P8	Proteína Polycomb suz12-B - <i>like</i>	Proteína do grupo Polycomb (PcG), que metila a histona H3, levando à repressão transcricional do gene alvo afetado	Complexo repressivo Polycomb 2 (PRC2) facilita a exportação nuclear do genoma viral do influenza através da interação com a M1. Depleção de PRC2 mostrou o acúmulo nuclear de vRNP e a redução da formação do complexo M1-vRNP	Regulado para cima (2,11) – 36 horas	Asaka et al., 2016
A0A1S3T509	Substrato do receptor do fator de crescimento epidérmico 15- <i>like</i>	Envolvida na regulação do crescimento celular e na internalização de receptores indutíveis por ligantes do tipo receptor de tirosina quinase (RTK)	O receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) promove a captação de vírus influenza A (IAV) em células hospedeiras. A modulação da expressão ou atividade do EGFR resultou na captação alterada de IAV, mostrando que este receptor transmite sinais relevantes de entrada na ligação do vírus	Regulado para cima (2,11) – 60 horas	Eierhoff et al., 2010

Tabela 4. Análise de proteínas de salmão identificadas em culturas de células ASK-2 infectadas pelo ISAV durante as 12, 36 e 60 horas pós-infecção

A0A1S3SRG1	Subunidadeenzimáticarifuncional alfa	Beta-oxidação de ácidos graxos; processo de oxidação-redução	O Vírus da Hepatite C (HCV) atenua a oxidação lipídica pela regulação negativa da expressão de Proteína Trifuncional Mitocondrial (MTP). Células Huh7.5 infectadas com o HCV, a oxidação lipídica foi significativamente atenuada. Consistentemente com isso, os níveis de mRNA e proteína MTP foram suprimidos pela infecção pelo HCV	Regulado para cima (1,58) – 60 horas	Amakoet <i>et al.</i> , 2015
A0A1S3SEC4	Dinactinasubunidade 1-like	Desempenha um papel fundamental no transporte retrógrado mediado por dineína de vesículas e organelas ao longo de microtúbulos	O vírus da influenza A usa a incrível maquinaria de processamento para entrada na célula hospedeira. Para a desmontagem do capsídeo, o IAV tira proveito do maquinário agressivo da célula hospedeira. Os capsídeos mimetizaram agregados de proteínas deformados, carregando cadeias de ubiquitina não estabilizadas que ativaram a histona deacetilase 6, essencial para a infecção eficiente. Outros componentes da maquinaria agressiva, incluindo dineína, dinactina e miosina II também foram necessários	Regulado para cima (1,23) – 60 horas	Banerjee <i>et al.</i> , 2014
A0A1S3QA02	Cadeia pesada da Dineína 5 - like	Movimento baseado em microtúbulos. Proteína geradora de força. Dineína tem atividade ATPase		Regulado para cima (1,39) – 60 horas	
A0A1S3PTI0	Dineína 1 (cadeia intermediária leve 2) - like	Atua como um dos vários componentes acessórios não-catalíticos do complexo de dineína 1. Movimentobaseadoemmicrotúbulos		Regulado para cima (1,80) – 60 horas	
A0A1S3R485	Nectina-4-like	Adesão celular; entrada viral na célula hospedeira. Atua como um receptor para o vírus do sarampo em humanos	Um homólogo da nectina-4 de ave funciona como receptor do vírus do sarampo em fibroblastos embrionários de frango	Regulado para cima (1,30) – 60 horas	Seki <i>et al.</i> , 2015

Tabela 4. Análise de proteínas de salmão identificadas em culturas de células ASK-2 infectadas pelo ISAV durante as 12, 36 e 60 horas pós-infecção

A0A1S3QFA1	Proteína de ligação FK506 - like	Regula a estabilidade da proteína p21 por ligação a Hsp90 e p21. p21 regula negativamente a quinase PAK1	Proteína 51 de Ligação a FK506 (FKBP51) Interage com Proteínas TRAF e Facilita a Expressão Mediada por Receptor RIG-I de IFN Tipo I induzida por dsRNA viral. A depleção de FKBP51 reduziu a expressão de IFN tipo I induzida por transfeção de dsRNA ou infecção pelo vírus da doença de Newcastle em fibroblastos murinos	Regulado para cima (1,29) – 60 horas	Akiyama <i>et al.</i> , 2014
A0A1S3NI41	Proteína 2 reguladora da exocitose de membrana sináptica - like	Transporte de proteínas intracelulares; exocitose	Flavivirus NS5 associa-se a proteínas da célula hospedeira, zonula de oclusão-1 (ZO-1) e proteína 2 reguladora da exocitose de membrana sináptica (RIMS2) através de um mecanismo interno de ligação a PDZ. Vírus da encefalite proteína NS5 tem alta afinidade para RIMS2	Regulado para cima (1,61) – 60 horas	Ellencronaet <i>al.</i> , 2009
A0A1S3LJW3	Polipeptídeo N-acetilgalactosaminiltransferase	Glicosilação de proteínas, transferência de um resíduo de N-acetil-D-galactosamina para um resíduo de serina ou treonina no receptor de proteína	É necessária a expressão induzida por vírus influenza A de uma GalNAc transferase, GALNT3, via MicroRNAs para replicação viral aumentada. Dois microRNAs (miR-17-3p e miR-221), cujo alvo mRNA de GALNT3, regulam-se negativamente em células epiteliais basais alveolares humanas durante a infecção por IAV. A expressão do mRNA de GALNT3 é regulada positivamente e conduz à produção de mucina nas células epiteliais dos brônquios. O GALNT3 promove a glicosilação da mucina em células infectadas por IAV. O <i>knockdown</i> de GALNT3 reduz significativamente a replicação do IAV	Regulado para cima (1,61) – 60 horas	Nakamura <i>et al.</i> , 2016

Tabela 4. Análise de proteínas de salmão identificadas em culturas de células ASK-2 infectadas pelo ISAV durante as 12, 36 e 60 horas pós-infecção

A0A1S3L6R8	Hexoquinase-1-like (HK1)	Fosforilação de carboidratos. Homeostase celular da glicose	Papel da Hexoquinase-1 na sobrevivência de macrófagos infectados pelo HIV-1. O HIV-1 induz um aumento na expressão de HK-1, sua atividade enzimática fica inibida e níveis aumentados de ligação de mitocôndrias à HK-1. A dissociação da HK-1 da mitocôndria induziu a despolarização da membrana mitocondrial e a apoptose mediada por caspase-3/7.	Regulado para cima (1,52) – 60 horas	Sen <i>et al.</i> , 2015
B5X4S9	Proteína de canal intracelular de cloreto	Transporte de cloro; transporte transmembranar de íons	Inibição da entrada do vírus do herpes simplex tipo 1 pelos inibidores dos canais de cloreto, tamoxifeno e NPPB. Estes atuaram como inibidores potentes, impedindo a ligação viral, a penetração e a translocação nuclear	Regulado para baixo(-1,75) – 60 horas	Zheng <i>et al.</i> , 2014
B5X351	Histona macro nuclear - H2A	Ligações de DNA e propriedades reguladoras de transcrição	As histonas (H3-H4) têm forte atividade antiviral para o vírus influenza A. A histona H4 é mais potente na neutralização do IAV e a incubação com IAV com histona H4 resulta em uma diminuição na captação e replicação viral pelas células epiteliais	Regulado para baixo(-1,88) – 60 horas	Hoeksema <i>et al.</i> , 2015
B5DG71	Histona H3	Nãodetectado – 60 horas			
A0A1S3PWX4	Transaldolase (TAL)	Importante para o equilíbrio de metabólitos na via das pentoses-fosfato	O estresse oxidativo, a ativação de caspases e a sobrevivência celular são regulados pela transaldolase. Induzida por HIV: 1) produção de intermediários reativos de oxigênio mitocondrial e 2) ativação de caspase-3 foi acelerada em células com super-expressão de TAL. Em contraste, a supressão do TAL revogou essas atividades.	Regulado para baixo(-2,39) – 60 horas	Bankiet <i>et al.</i> , 1998

Tabela 4. Análise de proteínas de salmão identificadas em culturas de células ASK-2 infectadas pelo ISAV durante as 12, 36 e 60 horas pós-infecção

A0A1S3MX85	Fibronectina	Envolvido na adesão celular, motilidade celular e manutenção da forma celular	A entrada do vírus Influenza A com uma preferência de ligação do ácidosialico (ligação $\alpha 2,6$) requer Fibronectina do hospedeiro. RNA interferente específico para fibronectina pode inibir a replicação do H1N1 humano. Este efeito inibitório não pode ser observado em células infectadas com o vírus aviário H5N1	Regulado para baixo(-2,99) – 60 horas	Leung <i>et al.</i> , 2012
A0A1S3L8A1	Sulfotransferase	Catalisa a sulfatação	O sulfatideo é necessário para a replicação do vírus influenza A. O sulfatideo é sintetizado pela sulfotransferase. O tratamento de células infectadas com IAV com anticorpo antisulfatideo resultou numa redução na replicação de IAV e no acúmulo da nucleoproteína viral no núcleo. A associação de sulfatideo com hemaglutinina induz a translocação dos complexos de ribonucleoproteína do IAV recém-sintetizados do núcleo para o citoplasma	Regulado para baixo(-1,40) – 60 horas	Takahashi <i>et al.</i> , 2008

(1) Função das proteínas foi baseada nos bancos de dados *UniProt* (<https://www.uniprot.org/>) e *Nextprot* (<https://www.nextprot.org/>)

(2) Revisão da literatura foi realizada através do portal *PubMed* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>)

(3) Números entre parênteses representam o valor de abundância *foldchange* (FC). FC > 1 (Regulado para cima). FC < -1 (Regulado para baixo)

Tabela 5. Proteínas de salmão identificadas em culturas de células infectadas pelo ISAV durante as 12, 36 e 60 horas pós-infecção nas diferentes etapas do ciclo de replicação do ISAV

Acesso Uniprot	Nome da proteína	Regulação/ Exclusividade e Tempo	Vírus / Família	Referência Bibliográfica
Reconhecimento e entrada na célula hospedeira				
A0A1S3RKI5	<i>Clathrin heavy chain</i>	Up – 36h	Influenza A virus <i>Orthomyxoviridae</i>	Wang <i>et al.</i> , 2009
A0A1S3T509	<i>Epidermal growth factor receptor substrate 15-like</i>	Up – 60h	Influenza A virus <i>Orthomyxoviridae</i>	Eierhoff <i>et al.</i> , 2010
C0HBN0	<i>Ras-related protein Rab-7a</i>	Exclusiva – 12 h/ Up – 60h	Hepatite C virus <i>Flaviviridae</i>	Zona <i>et al.</i> , 2013
C0HAU8	<i>Sorting nexin</i>	Exclusiva – 12h/ Exclusiva – 36h	Ebolavirus <i>Filoviridae</i>	Nanboet <i>et al.</i> , 2010
A0A1S3PA42	<i>Platelet-derived growth factor receptor alpha</i>	Exclusiva – 12h/ Up – 36h	Citomegalovirus <i>Herpesviridae</i>	Kabanova <i>et al.</i> , 2016
A0A1S3SWM6	<i>Protocadherin-11 X-linked-like</i>	Exclusiva – 36h/ Down – 60h	Hantavirus <i>Hantaviridae</i>	Jangraet <i>et al.</i> , 2018
A0A1S3RIL4	<i>Protocadherin beta-16-like</i>	Exclusiva – 36h	Hantavirus <i>Hantaviridae</i>	Jangraet <i>et al.</i> , 2018
A0A1S3PK14	<i>Protocadherin Fat 4-like</i>	Up – 60h	Hantavirus <i>Hantaviridae</i>	Jangraet <i>et al.</i> , 2018
A0A1S3LZK5	<i>Obscurin</i>	Exclusiva – 12h/ Exclusiva – 36h	Papillomavirus 16 <i>Papillomaviridae</i>	Wustenhagen <i>et al.</i> , 2016
A0A1S3R485	<i>Nectin-4-like</i>	Up – 60h	Vírus do Sarampo <i>Paramyxoviridae</i>	Seki <i>et al.</i> , 2015
Desnudamento				
B5X274	<i>V-type proton ATPase subunit B</i>	Exclusiva – 12h	Influenza A virus <i>Orthomyxoviridae</i>	Muller <i>et al.</i> , 2011
A0A1S3SEC4	<i>Dynactin subunit 1-like</i>	Up – 60h	Influenza A virus <i>Orthomyxoviridae</i>	Banerjee <i>et al.</i> , 2014
A0A1S3QA02	<i>Dynein heavy chain 5, axonemal-like</i>	Up – 60h	Influenza A virus <i>Orthomyxoviridae</i>	Banerjee <i>et al.</i> , 2014
A0A1S3PTI0	<i>Dynein 1 light intermediate chain 2-like</i>	Up – 60h	Influenza A virus <i>Orthomyxoviridae</i>	Banerjee <i>et al.</i> , 2014
Transcrição e replicação				
B5XDF3	<i>Splicing factor, arginine/serine-rich 2</i>	Exclusiva – 12h/ Exclusiva – 36h	Influenza A virus <i>Orthomyxoviridae</i>	Liu <i>et al.</i> , 2008
B5X1D2	<i>Serine/threonine-protein phosphatase</i>	Exclusiva – 12h/ Exclusiva – 36h/ Down – 60h	Influenza A virus <i>Orthomyxoviridae</i>	York <i>et al.</i> , 2014
A0A1S3LJ82	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1</i>	Up – 12h/ Up – 60h	Influenza A virus <i>Orthomyxoviridae</i>	Chang <i>et al.</i> , 2017

Tradução				
A0A1S3QGL6	<i>Far upstream element-binding protein 2-like</i>	Exclusiva – 12h	Enterovirus 71 <i>Picornaviridae</i>	Lin <i>et al.</i> , 2009
A0A1S3M1T5	<i>Far upstream element-binding protein 1-like</i>	Exclusiva – 36h	Enterovirus 71 <i>Picornaviridae</i>	Huang <i>et al.</i> , 2011
A0A1S3NEA7	<i>Kinesin-like protein KIF20B</i>	Up – 12h/ Down – 60h	HIV <i>Retroviridae</i>	Venkatesh <i>et al.</i> , 2003
A0A1S3LVN8	<i>Kinesin-like protein KIF1A</i>	Up – 60h	HIV <i>Retroviridae</i>	Venkatesh <i>et al.</i> , 2003
Proteínas virais vão para o núcleo e para a via secretória				
B5X8H4	<i>Small ubiquitin-related modifier</i>	Up – 12h	Influenza A virus <i>Orthomyxoviridae</i>	Wang <i>et al.</i> , 2012
A0A1S3P5P8	<i>PRA1 family protein</i>	Exclusiva – 36h	Diversos Lentivirus <i>Retroviridae</i>	Evans <i>et al.</i> , 2002
A0A1S3MQG9	<i>rab GTPase-activating protein 1-like (Rab1)</i>	Exclusiva – 36h/ Down – 60h	Herpes Simplex Virus 1 <i>Herpesviridae</i>	Zenner <i>et al.</i> , 2011
Exportação dos complexos ribonucleoprotéicos(vRNPs)				
A0A1S3LNZ2	<i>Heat shock 70 kDa protein 4-like</i>	Up – 12h	ISAV <i>Orthomyxoviridae</i>	Zhang <i>et al.</i> , 2017
A0A1S3L1Z2	<i>Peroxiredoxin-5, mitochondrial-like</i>	Exclusiva – 12h	Influenza virus <i>Orthomyxoviridae</i>	Dai <i>et al.</i> , 2018
A0A1S3L5P8	<i>Polycomb protein suz12-B-like</i>	Up – 36h	Influenza virus <i>Orthomyxoviridae</i>	Asaka <i>et al.</i> , 2016
A0A1S3L8A1	<i>Sulfotransferase</i>	Down – 60h	Influenza A virus <i>Orthomyxoviridae</i>	Takahashi <i>et al.</i> , 2008
Montagem e brotamento				
A0A1S3T573	<i>Ras-related protein Rab-11B-like</i>	Exclusiva – 12h/ Exclusiva – 36h	Influenza virus <i>Orthomyxoviridae</i>	Eisfeldt <i>et al.</i> , 2011
A0A1S3MICY0	<i>RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase-like</i>	Exclusiva – 12h/ Up – 36h	Influenza virus <i>Orthomyxoviridae</i>	Pinto <i>et al.</i> , 2011
A0A1S3L632	<i>rab11 family-interacting protein 1-like</i>	Exclusiva – 12h	Influenza A virus <i>Orthomyxoviridae</i>	Bruce <i>et al.</i> , 2010
C0H996	<i>Annexin</i>	Exclusiva – 12h/ Exclusiva – 36h	Influenza A virus <i>Orthomyxoviridae</i>	Ma <i>et al.</i> , 2012
A0A1S3RHE4	<i>RuvB-like helicase</i>	Exclusiva – 12h	Influenza A virus <i>Orthomyxoviridae</i>	Kakugawa <i>et al.</i> , 2009
A0A1S3MIN2	<i>Filamin-A-like</i>	Up – 12h	HIV <i>Retroviridae</i>	Cooper <i>et al.</i> , 2011
A0A1S3N4P5	<i>Reticulon</i>	Exclusiva – 12h/ Up – 36h	Flaviviruses <i>Flaviviridae</i>	Aktepeet <i>et al.</i> , 2017

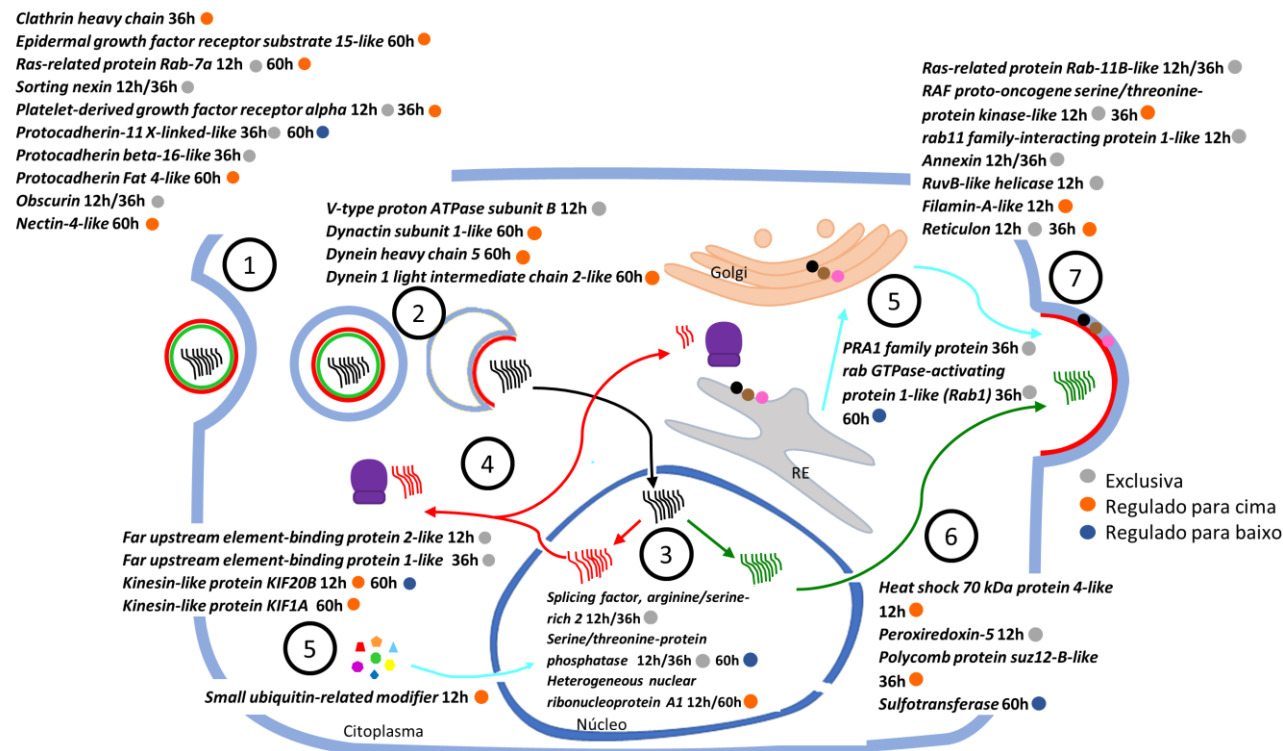


Figura 14. Representação esquemática da infecção por ISAV em uma célula de salmão com uma visão global das proteínas celulares de interesse ao longo do tempo. Os estágios do ciclo do ISAV são representados pelos números: 1 (Reconhecimento e entrada na célula hospedeira), 2 (Desnudamento), 3 (Transcrição e replicação), 4 (Tradução), 5 (Proteínas virais vão para o núcleo e para a via secretória), 6 (Exportação dos complexos ribonucleoprotéicos) e 7 (Montagem e brotamento). O estado da proteína é representado por círculos: círculo cinza (exclusiva da cultura infectada), círculo laranja (regulada para cima) e círculo azul (regulada para baixo).

5.8 Cinética da produção das proteínas virais

A dinâmica da produção das proteínas do vírus foi estabelecida através dos pontos amostrados conforme descrito anteriormente (12 a 84 hpi) e está apresentada na Figura 15. As abundâncias das proteínas virais identificadas apresentaram alterações significativas ao longo do tempo do experimento e foram mais marcantes nos estágios iniciais da infecção. As proteínas estruturais, hemaglutinina-esterase (HE) e a proteína de matriz 1 (M1), tiveram um aumento mais pronunciado ao longo do tempo do que as proteínas não estruturais do complexo polimerase: proteína básica polimerase 2 (PB2) e proteína polimerase ácida (PA). Mas a proteína viral que teve a maior produção foi a nucleoproteína, uma proteína de ligação ao RNA que interage com os segmentos genômicos.

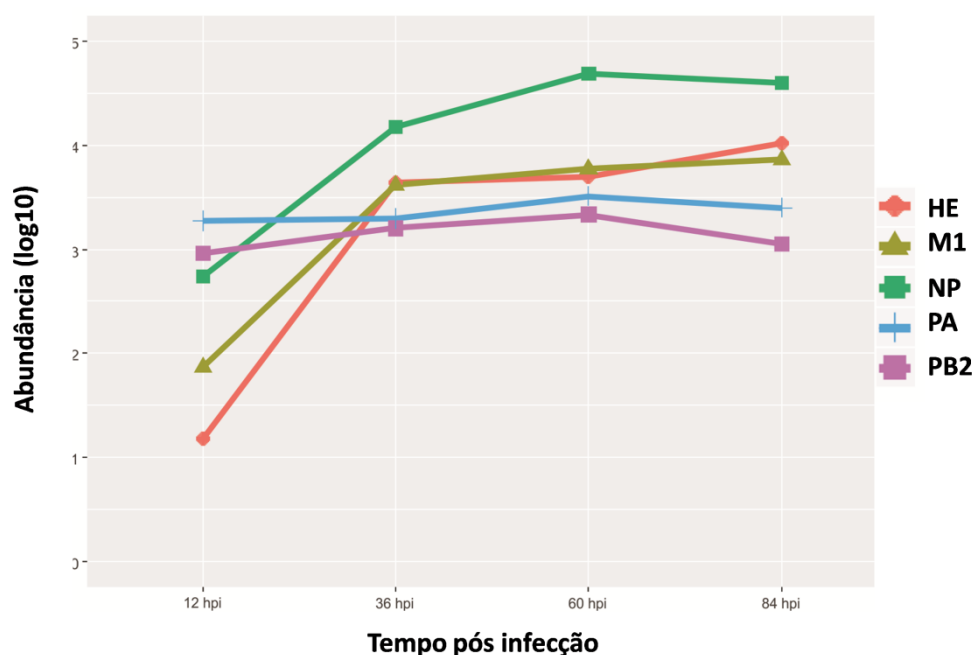


Figura 15. Cinética da produção proteica viral. Apresentação logarítmica da variação da abundância das proteínas virais. NP (nucleoproteína), HE (hemaglutinina-esterase), M1 (matriz proteica 1), PB2 (proteína básica polimerase 2) e PA (proteína ácida polimerase). Eixo X, significa tempo pós-infecção; Eixo Y, abundância normalizada.

5.9 Validação dos dados proteômicos por RT-qPCR

Para validar os dados de espectrometria de massas, algumas das proteínas celulares identificadas diferencialmente produzidas foram escolhidas para ter o seu respectivo RNA mensageiro quantificado. Os resultados da validação são mostrados na Tabela 6.

Tabela 6. Validação de dados proteômicos com quantificação relativa dos respectivos mRNAs de salmão por RT-qPCR

Alvo	Tempo	LC-HDMS ^a	RT-qPCR ^b
<i>Procollagenlactosyltransferase 1-like</i>	84h	-3,04	0,62
<i>Annexin</i>	84h	-1,63	0,94
<i>Histone H2A</i>	84h	-2,09	0,44
<i>Cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-7-like</i>	60h	5,08	1,05
<i>Cyclic AMP-dependent transcription factor ATF-7-like</i>	84h	4,77	2,21
<i>Outerdensefiberprotein 2</i>	36h	-1,68	0,79

a Proteínas com $\log_2 \geq 1$ = regulado para cima; ou ≤ -1 = regulado para baixo

b Valor de $2^{-\Delta\Delta Ct} > 1$ = regulado para cima; ou < 1 = regulado para baixo

Além dos alvos de proteína da célula, a proteína M1 do ISAV foi escolhida para validar os dados proteômicos referentes à expressão viral. Os resultados da validação para esta proteína são mostrados na figura 16. Os transcritos de M1 ao longo do tempo tiveram o padrão de expressão semelhante ao de sua respectiva proteína. Das 12hpi às 36hpi houve aumento expressivo do mRNA de M1 seguido de menor crescimento nos demais tempos.

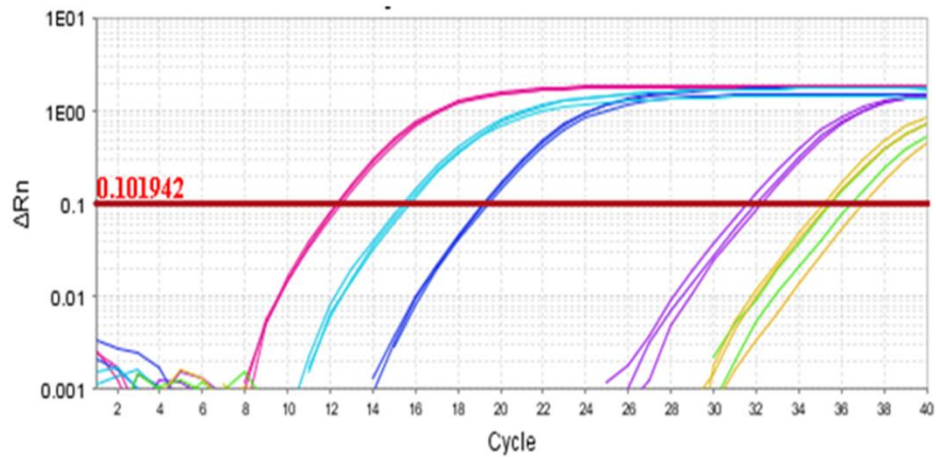


Figura 16. Validação de dados proteômicos com quantificação relativa de mRNA de M1 do ISAV por RT-qPCR. Valor médio de Ct para: controle negativo de PCR = 35,4 (curvas verdes), culturas controle 12, 36, 60 e 84 hpi = 35,8 (curvas amarelas), culturas infectadas 12hpi = 31,9 (curvas púrpuras), Culturas infectadas com 36 hpi = 19,2 (curvas azul-escuro), culturas infectadas com 60 hpi = 15,5 (curvas azul claro) e culturas infectadas com 84 hpi = 12,4 (curvas cor-de-rosa). hpi = horas após a infecção. Eixo X significa número de ciclos de quantificação da PCR; eixo Y, variação da intensidade de fluorescência relativa do *SYBR Green*.

DISCUSSÃO

6. Discussão

6.1 Análise da cinética viral: efeito citopático e alterações ultraestruturais

O ISAV é um patógeno que afeta a indústria global de salmônica. Fatores do hospedeiro que determinam o curso da infecção por ISAV e as alterações ultraestruturais em células de salmão decorrentes da infecção são pouco compreendidos e não há estudos proteômicos quantitativos de células de salmão em infecções por ISAV. O desenho experimental da infecção em células ASK-2 pelo ISAV através das várias técnicas de microscopia (microscopia de luz, eletrônica e de fluorescência) abrangeu todo o ciclo viral (Figuras 5 e 6). Os resultados dessas técnicas permitiram confirmar não apenas o surgimento do ECP em 36 hpi, mas também o aumento desse efeito ao longo da infecção. As células ASK-2 são usadas para o isolamento de ISAV e desenvolvem ECP discernível em um tempo mais curto (2-4 dias após a infecção) do que as outras linhagens de células (Devold *et al.*, 2000). Além disso, a formação e o aumento do número de partículas virais durante o experimento foram atestados. A MET e o IFAT demonstraram a formação de vírus maduros em 36 hpi, o que torna possível estipular que o ciclo de replicação do ISAV esteja entre 12 e 36 horas. Várias proteínas aqui identificadas estão relacionadas aos diferentes estágios de formação das novas partículas do ISAV e também ao processo de apoptose, responsável pelo ECP nas células ASK-2 (Kibenge & Godoy, 2016).

Estudos anteriores já abordaram as alterações ultraestruturais que o ISAV causa na célula hospedeira. A presença de retículo endoplasmático (ER) dilatado (Figura 6A), por exemplo, já havia sido demonstrada no estudo que avaliou a ativação da via de resposta a proteínas mal dobradas (*unfolded protein response* - UPR) durante a infecção por ISAV *in vitro* (células ASK) e *in vivo* (Kavaliauskis *et al.*, 2016). A UPR é um importante processo homeostático celular conhecido por ser ativado por várias infecções virais que promovem o acúmulo de proteínas virais mal dobradas sintetizadas no ER que culmina na dilatação do mesmo. A UPR pode induzir a produção de interferon, a atenuação da síntese de proteínas e a apoptose celular (Hetz, 2012; Langevin *et al.*,

2013). O ISAV induz as principais vias de sinalização da UPR (ATF6, PERK e IRE1) , mas sem induzir a atenuação translacional, uma vez que ocorre a fosforilação mediada por PERK do fator 2 de iniciação da tradução eucariótica (eIF2 α), enquanto que vários outros vírus mostraram inibir a via do eIF2 α para assegurar a tradução de proteínas virais durante a infecção (Kavaliauskis *et al.*, 2016). No conjunto de dados, as proteínas reguladoras das vias de sinalização da UPR não foram detectadas, mas o efeito final da via de sinalização foi, uma vez que o fator traducional eIF2 α foi detectado exclusivamente em 12 hpi e regulado para cima em 36 hpi, ambos nas culturas infectadas.

A formação de autofagossomos (Figura 6D) em células de salmão do Atlântico induzida por ISAV também já foi mostrada anteriormente onde demonstrou-se que o tratamento de células infectadas pelo ISAV com um inibidor de formação de autofagossomos reduziu a produção viral (Schjøtz *et al.*, 2010). A autofagia desempenha um papel importante na homeostase celular e também está implicada na defesa contra a infecção por vírus. O marcador de autofagia, a proteína de cadeia leve associada à microtúbulo quinase 3, não foi identificado em nosso estudo, no entanto, o fator 1 de ligação cruzada de microtúbulos (*microtubulecross-linkingfactor 1-like*), também implicado na regulação da autofagia, foi identificado na cultura infectada pelo ISAV em abundância semelhante à da cultura de controle. A autofagia induzida por vírus foi previamente demonstrada em vários estudos, incluindo o vírus influenza. O influenza A promove a autofagia através da regulação negativa da superóxido dismutase 1 (SOD1) em células epiteliais alveolares (Jung *et al.*, 2018), no entanto esta regulação negativa da SOD1 não foi encontrada na infecção pelo ISAV.

As outras características ultraestruturais observadas em culturas infectadas pelo ISAV por MET: os elementos citoesqueléticos distribuíram-se desigualmente (Figura 6B) e o retículo endoplasmático disposto de maneira incomum (Figura 6D) podem ser explicadas devido ao grande número de proteínas do citoesqueleto e de proteínas que modulam o citoesqueleto identificadas exclusivamente ou diferencialmente produzidas em culturas infectadas por ISAV. Além disso, a análise de GO que apontou, ao longo de todo o tempo de infecção, termos enriquecidos de processos biológicos relacionados

com a “organização do citoesqueleto”. Algumas delas estão resumidas na Tabela 5, mas os mecanismos moleculares e a importância biológica dessas observações pela MET para a infecção do ISAV ainda precisam ser elucidados.

6.2 Alterações proteômicas gerais e o processo de *host shutoff*

Para identificar quais proteínas celulares possuem a produção alterada após a infecção por ISAV, utilizou-se a proteômica quantitativa livre de marcadores que quantificou cerca de 1700 proteínas com forte correlação de Pearson (Figura 7 e Tabela 3). Os resultados mostraram que o proteoma de culturas infectadas pelo ISAV foi distinto para cada tempo de coleta, pois o número total de proteínas identificadas variou entre elas (Figura 8) e o número de proteínas exclusivas em comum entre elas foi baixo (Figura 9). Além disso, os resultados também demonstraram que o processo de regulação da produção proteica é um processo altamente dinâmico, uma vez que o número de proteínas diferencialmente produzidas em comum entre os tempos permaneceu baixo (Figura 10).

Em geral, há dois momentos bem marcados durante o experimento: nos estágios iniciais da infecção (12 e 36 hpi) há um número maior de proteínas reguladas positivamente e também um alto número de proteínas identificadas exclusivamente nas culturas infectadas e os tempos finais da infecção (60 e 84 hpi) são caracterizados por um grande número de proteínas celulares reguladas negativamente e por um elevado número de proteínas identificadas exclusivamente nas culturas controles (Figuras 8, 9, 10, 11 e 12). Além disso, os termos de GO nestes tempos finais referem-se à regulação negativa do processo biossintético e a regulação negativa da expressão gênica juntamente com as representações de produção diminuída de proteínas relacionadas à “tradução” (Figura 13, *cluster* 3) e “processamento de RNA” (Figura 13, *cluster* 6) reforçam a ideia de que a produção de proteínas celulares se torna restrita em favor da síntese proteica viral. Esta tendência de aumento das proteínas celulares reguladas negativamente em uma infecção viral já foi observada em outros estudos proteômicos envolvendo principalmente o vírus influenza. Um estudo que avaliou o impacto da

infecção pelo vírus influenza A (IAV) sobre os proteomas de células broncoepiteliais humanas de diferentes doadores mostrou que a proporção de proteínas que foram reguladas para baixo aumentou ao longo do tempo onde aproximadamente 70-95% das proteínas identificadas tiveram uma menor abundância do que a cultura controle(Mindaye *et al.*, 2017). Outro estudo que identificou a proteína de ligação a Vpr como um novo fator do hospedeiro que promove infecções por IAV em células humanas por abordagem proteômica quantitativa concluiu que a maioria das proteínas celulares foi significativamente regulada negativamente, o que reflete uma redução na produção de proteínas celulares(Sadewasser *et al.*, 2017).

Essa redução progressiva na produção de proteínas celulares, acompanhada pelo acúmulo de proteínas virais, tem sido chamada de “*host shutoff*” (Rivas *et al.*, 2016). Este “*host shutoff*” é mais bem estudado para os vírus das famílias *Orthomyxoviridae* (por exemplo, IAV) e *Herpesviridae* (por exemplo, vírus do herpes associado ao sarcoma de Kaposi e vírus herpes simplex). O IAV usa várias estratégias para bloquear a expressão gênica do hospedeiro: regula negativamente diferentes estágios da biogênese do mRNA do hospedeiro e estimula a degradação do mRNA maduro do hospedeiro. Sua proteína viral não estrutural 1 (NS1) previne a poliadenilação de transcritos celulares nascentes e inibe a exportação nuclear dessas mensagens para o citoplasma(Chen *et al.*, 1999; Nemeroff *et al.*, 1998).O complexo viral da RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) do IAV tem como alvo a grande subunidade da RNA polimerase II (Pol II) do hospedeiro objetivando a sua degradação via proteassoma e subsequente perda da sua atividade de transcrição (Rodriguez *et al.*, 2007; Vreede *et al.*, 2010). A descoberta da proteína PA-X do IAV, uma proteína que é produzida por um desvio de leitura ribossomal de +1 após o aminoácido 191 da subunidade polimerase ácida (PA) da RdRp, revelou que a PA-X induz a degradação do RNA do hospedeiro por sua atividade de endonuclease(Bavagnoli *et al.*, 2015; Jagger *et al.*, 2013). Grande parte do conhecimento sobre as proteínas geradas pelo genoma do ISAV vem da comparação com as proteínas homólogas do vírus influenza, mesmo apresentando baixa similaridade na sequência de aminoácidos(Toennessen *et al.*, 2010).Portanto, acredita-se que estas novas funções de “*host shutoff*” realizadas pelas

proteínas NS1 e RdRp do vírus influenza também possam ser realizadas por estas proteínas homólogas do ISAV, o que explicaria essa redução progressiva na produção de proteínas da célula.

A diminuição na produção de proteínas celulares relacionadas ao processo de respiração aeróbia ao longo do tempo obtido no *cluster 2* (Figura 13) já havia sido observada no processo infeccioso causado pelo vírus H1N1, onde células MDCK infectadas mostraram uma mudança na produção de energia por respiração aeróbica para a glicólise, mas quem controla esse mecanismo energético, se é o vírus ou a célula, e qual é o papel dessa mudança, ainda precisa ser elucidado para ambos os vírus(Kummer *et al.*, 2014).

6.3 Relação entre as proteínas de interesse e as etapas do ciclo viral

Estudos investigaram a interação direta de proteínas do hospedeiro com proteínas virais, em que estágio do ciclo de replicação do vírus essas proteínas do hospedeiro atuam e se desempenham algum papel na resposta imune. Vale lembrar que parte do que é conhecido sobre o ciclo de replicação do ISAV vem da comparação com o ciclo de replicação do vírus influenza(Cottet *et al.*, 2011). As proteínas celulares diferencialmente produzidas e exclusivas identificadas em culturas infectadas pelo ISAV foram relacionadas aos diferentes estágios da replicação do ISAV (Tabelas 4 e 5 e a Figura 14) e a maioria delas ocorreram nas primeiras horas de infecção (12 e 36hpi) e estavam sendo reduzidas ou mesmo não detectadas a partir das 60hpi.

Pelas análises há proteínas celulares identificadas relacionadas ao reconhecimento e entrada do vírus na célula hospedeira (Figura 14, estágio 1), além de termos de GO enriquecidos relacionados à “montagem da camada de clatrina” e “transporte endossômico”. *Clathrin heavy chain*(regulação positiva em 36hpi) e *Epidermal growth factor receptor substrate 15-like*(EGFR, regulação positiva em 60hpi) são exemplos disso. A clatrina é a principal proteína do revestimento poliédrico de vesículas e sabe-se que a entrada do vírus influenza A H5N1 em células hospedeiras é através de endocitose dependente de clatrina via hemaglutinina, uma glicoproteína de

superfície do vírus, que se liga aos resíduos de ácido siálico das glicoproteínas e glicolípídeos da célula hospedeira (Wang & Jiang, 2009). Esta regulação positiva da clatrina pode ser uma indicação de que o ISAV é endocitado pela via dependente da clatrina. O EGFR está envolvido na internalização dos receptores induzíveis por ligação do tipo receptor de tirosina quinase (RTK) e também na captação do vírus influenza A em células hospedeiras. A modulação da expressão ou atividade do EGFR resultou na captação alterada de IAV, mostrando que este receptor transmite sinais relevantes de entrada quando da ligação do vírus (Eierhoff *et al.*, 2010). Esta regulação positiva do EGFR e seu papel no ciclo do IAV fazem acreditar que o EGFR também pode auxiliar a entrada do ISAV na célula. Outra proteína, *sorting nexin* (exclusiva às 12 e 36hpi) está envolvida na endocitose e no tráfego de vesículas intracelulares de vírus filamentosos como o vírus ebola, um vírus de RNA de cadeia simples de sentido negativo, envelopado, que causa febre hemorrágica em primatas. Essas partículas filamentosas são maiores que as invaginações da membrana plasmática que caracterizam a endocitose mediada por clatrina. Assim, o vírus ebola é internalizado em células hospedeiras via macropinocitose com anexina 5 em uma maneira dependente da glicoproteína viral (Nanbo *et al.*, 2010). Partículas filamentosas também foram relatadas para o ISAV e são preferencialmente encontradas quando cultivadas em células de cultura de tecido de origem epitelial (Ramírez & Marshall, 2018). Aqui, também foram observados esses achados (Figura 5.2C), uma vez que se utilizou uma linhagem celular de origem epitelial (ASK-2). Sugere-se que anexina também seja usada para a macropinocitose do ISAV em sua forma filamentosa.

Outras proteínas identificadas neste estudo já foram descritas como importantes fatores do hospedeiro na entrada de vírus na célula: *Ras-related protein Rab-7a* (exclusiva em 12hpi e regulação positiva em 60hpi) é reguladora no tráfego endossômico e a proteína da família *Ras-related protein Rap2B* é um co-fator para a entrada do vírus da Hepatite C (Zona *et al.*, 2013). *Platelet-derived growth factor receptor alpha* (exclusivo em 12hpi e regulação positiva em 36hpi) é o receptor celular do citomegalovírus humano (Kabanova *et al.*, 2016). *Obscurin* (exclusiva em 12 e 36hpi) interage com a proteína L2 do capsídeo do papilomavírus humano 16 e esta interação é

necessária para endocitose do vírus(Wüstenhagen *et al.*, 2016).*Protocadherins*(exclusiva em 36hpi e regulação positiva em 60hpi) no qual a protocaderina-1 é essencial para a entrada na célula por hantavírus do novo mundo em células endoteliais pulmonares (Jangra *et al.*, 2018)e *Nectin-4-like*(regulação positiva em 60hpi) que atua como receptor para o vírus do sarampo em humanos e um homólogo desta proteína em aves funciona como receptor do vírus do sarampo em fibroblastos embrionários de frango(Seki *et al.*, 2016). Provavelmente o ISAV utiliza diferentes mecanismos de entrada na célula, além da via mais conhecida que é pela sua proteína HE ligada aos ácidos siálicos presentes nos receptores celulares(Workenhe *et al.*, 2007).

Após a ligação à superfície da célula-alvo e endocitose, o baixo pH do endossoma ativa a fusão do envelope viral com a membrana do próprio endossoma e isso favorece o desnudamento do vírus que libera o seu genoma no citoplasma da célula(Cottet *et al.*, 2011). No conjunto de dados,*V-type próton ATPase subunit B* (exclusiva em 12hpi),*Dynactin subunit 1-like* (regulação positiva em 60hpi), *Dynein heavy chain 5*(regulação positiva em 60hpi)e *Dynein 1 light intermediate chain 2-like*(regulação positiva em 60hpi)podem estar envolvidas neste estágio do ciclo ISAV (Figura 14, estágio 2). A ATPase vacuolar é responsável pela acidificação dos endossomos no ciclo do IAV(Müller *et al.*, 2011) e pode acidificar os endossomos no ciclo do ISAV.A dineína, a dinactina e outras proteínas compõem o maquinário de processamento celular denominado agressoma e o IAV o utiliza para a desmontagem do seu capsídeo, na qual os capsídeos mimetizam agregados de proteínas mal dobradas e se tornam alvos dessa maquinaria celular (Banerjee *et al.*, 2014).Os dados sugerem que essa estratégia de desnudamento via agressoma também ocorra no ciclo do ISAV.

Após o desnudamento, as ribonucleoproteínas virais são transportadas para o núcleo e os RNAs virais senso negativo são transcritos em mRNAs (transcrição) e são replicados em novos RNAs virais (replicação)(Cottet *et al.*, 2011).Os dados sugerem que as seguintes proteínas celulares participam desta etapa (Figura 14, estágio 3):*Splicingfactor*, *arginine/serine-rich 2* (exclusivo em 12 e 36hpi),*Serine/threonine-proteinphosphatase*(exclusiva em 12 e 36hpi e regulação negativa em 60hpi) e *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1* (regulação positiva em 12 e 60hpi). O

fator de *splicing* rico em arginina/serina 2 é necessário para o *splicing* do pré-mRNA e o fator de *splicing* rico em arginina/serina 1 já foi identificado em um conjunto de proteínas celulares diferencialmente produzidas em resposta à infecção pelo vírus aviário H9N2 em células humanas (Liu *et al.*, 2008). Constatou-se que a proteína serina/treonina fosfatase 6 humana interage diretamente e regula positivamente a atividade da RNA polimerase dependente de RNA do influenza A (York *et al.*, 2014). As ribonucleoproteínas nucleares heterogêneas desempenham um papel importante no processamento do mRNA precursor no núcleo e a ribonucleoproteína nuclear heterogênea A2/B1 interage com a nucleoproteína do vírus influenza A em células de mamíferos e pode atuar como um regulador positivo na síntese de RNA viral (Chang *et al.*, 2017). A partir desses dados e em comparação com os achados dos estudos de IAV, essas proteínas celulares podem atuar no processo de *splicing* e na ação da enzima RdRp do ISAV.

Após a transcrição, os mRNAs maduros vão para o citoplasma e são traduzidos (Cottet *et al.*, 2011) (Figura 14, estágio 4). Uma observação por MET mostrou áreas de diferentes densidades eletrônicas na célula que podem indicar o local de acúmulo de proteínas virais recentemente sintetizadas (Figura 6A). *Farupstreamelement-binding protein 1* (exclusiva em 36hpi) e 2 (exclusiva em 12hpi) e diferentes proteínas do tipo cinesina (KIF20B - regulado para cima em 12hpi e KIF1A - regulado para cima em 60hpi) já foram abordadas como fator do hospedeiro nesta fase do ciclo. *Farupstreamelement-binding protein 2*, que pode desempenhar um papel no tráfego de mRNA, interage com o local de entrada no ribossomo do enterovírus 71 e regula negativamente a tradução viral (Lin *et al.*, 2009). No entanto, *Farupstreamelement-binding protein 1*, que pode atuar como ativador e repressor da transcrição, liga-se ao mesmo local de entrada no ribossomo e aumenta a tradução viral do enterovírus 71 (Huang *et al.*, 2011). As proteínas semelhantes à cinesina estão envolvidas no movimento baseado em microtúbulos e são essenciais para a citocinese e uma proteína nuclear semelhante à cinesina interage com a proteína Rev do HIV tipo 1 estimulando sua atividade e essa interação pode desempenhar um papel no transporte de mRNA

durante a infecção pelo HIV(Venkatesh *et al.*, 2003). Cinesinas e *Farupstreamelement-bindingproteins* provavelmente influenciam na tradução de proteínas de ISAV.

Após a tradução, uma parte das proteínas virais vai para o núcleo e a outra parte é transportada para a via secretória (retículo endoplasmático, aparelho de Golgi e membrana plasmática)(Cottet *et al.*, 2011)(Figura 14, estágio 5). Além disso, a análise de *cluster* mostrou um conjunto de proteínas co-reguladas relacionadas ao “transporte mediado por vesículas” (Figura 13, *cluster* 5). *Smallubiquitin-relatedmodifier* (regulação positiva em 12hpi) fazem a sumoilação de proteínas, *PRA1 family protein* (exclusivo em 36hpi) produz vesículas do complexo de Golgi e *rabGTPase-activatingprotein 1-like* (Rab1, exclusiva em 36hpi e regulação negativa em 60hpi) que promove a nucleação de microtúbulos, todos estes já foram descritos como fatores do hospedeiro e também podem ser importantes para a replicação do ISAV. O vírus influenza explora a ubiquitinação e a sumoilação para regular o tráfego nucleocitoplasmático de proteínas virais e celulares(Wang *et al.*, 2012). OPRA1 interage com os domínios citoplasmáticos da glicoproteína do envelope de diversos lentivírus (vírus da imunodeficiência símia, humana, bovina e felina)(Evans *et al.*, 2002). A proteína Rab1a/b é necessária para o envoltório secundário do vírus herpes simples 1, uma vez que na ausência de Rab1a/b as glicoproteínas virais são incapazes de trafegar do retículo endoplasmático para o compartimento de montagem e, assim, partículas sem envelope se acumulam no citoplasma(Zenner *et al.*, 2011). O ISAV provavelmente usa essas proteínas celulares para regular o seu tráfego nucleocitoplasmático e realizar suas modificações pós traducionais.

Após a replicação do vírus, os complexos de ribonucleoproteínas recém-formados são montados no núcleo seguido da sua exportação para o citoplasma e subsequente transporte para o local de brotamento na membrana plasmática(Cottet *etal.*, 2011). Muitas das proteínas celulares identificadas foram associadas a esta fase do ciclo do ISAV (Figura 14, etapas 6 e 7). *Heatshock 70 kDaprotein 4-like* (regulado para cima em 12hpi) interage com as proteínas M1 e NEP do vírus influenza e também do ISAV para a exportação de ribonucleoproteínas virais para o citoplasma(Zhang *et al.*, 2017). *Sulfotransferase* (regulada para baixo em 60hpi), *Polycomb protein suz12-B-*

like(regulada para cima em 36hpi) e *Peroxiredoxin-5* (exclusiva em 12hpi) também podem ser importantes para a exportação de vRNPs do ISAV (Figura 14, estágio 6).A sulfotransferase sintetiza o sulfatídeo que é necessário para a replicação eficiente do IAV, uma vez que o tratamento de células infectadas pelo IAV com um anticorpo anti-sulfatídeo resultou na redução da replicação do IAV e no acúmulo da nucleoproteína viral no núcleo(Takahashi *et al.*, 2008). O complexo repressivo Polycomb 2 (PRC2) promove a exportação nuclear do genoma viral do influenza através da sua interação com a proteína viral M1, uma vez que a depleção de PRC2 mostrou o acúmulo nuclear de vRNPs(Asaka *et al.*, 2016). Em relação às peroxiredoxinas, sabe-se que a proteína peroxiredoxina 1 (Prdx-1) interage com os vRNPs do IAV e que a inibição da expressão de Prdx-1 inibe a replicação do IAV(Daí *et al.*, 2018). Os dados deste estudo juntamente com os resultados dos estudos de IAV, reforçam a idéia de que essas proteínas celulares podem atuar na exportação de vRNPs do ISAV.

Ras-relatedprotein Rab-11B-like (exclusiva em 12 e 36hpi), *rab11 family-interactingprotein 1-like* (exclusiva em 12hpi) e *RAF proto-oncogeneserine/threonine-proteinkinase-like* (exclusiva em 12hpi e regulada para cima em 36hpi) podem estar relacionadas na montagem e no brotamento do ISAV (Figura 14, estágio 7) com base nos resultados dos estudos apresentados a seguir. A via Rab11 (RAB11A, Rab11 e a proteína de interação 3 da família Rab 11) é um fator essencial do hospedeiro para o transporte do genoma do vírus influenza para a membrana plasmática, local de seu brotamento (Bruce *et al.*, 2011).Durante a replicação, o vírus influenza ativa a cascata RAF/MEK/ERK que resulta na promoção do transporte do genoma viral para a montagem do vírus(Pinto *et al.*, 2011). *Annexin* (exclusiva em 12 e 36hpi) e *RuvB-like helicase* (exclusiva em 12hpi) podem atuar como fatores antivirais para montagem e brotamento do ISAV. A anexina humana A6 interage com a proteína M2 do IAV e essa interação prejudica o brotamento do vírus(Ma *et al.*, 2012). A proteína tipo RuvB 2 (RBL2) é um supressor da replicação do IAV, uma vez que a RBL2 humana parece interferir com a oligomerização da nucleoproteína viral, um passo na montagem do IAV(Kakugawa *et al.*, 2009). Por outro lado, *Filamin-A-like* (regulada para cima em 12hpi) e *reticulon* (exclusivo em 12hpi e regulado para cima em 36hpi) são

mencionados como fatores pró-virais para o ISAV. A proteína filamina A interage com a proteína Gag do HIV tipo 1 e essa interação contribui para a montagem de partículas virais (Cooper *et al.*, 2011). O reticulon 3.1A do hospedeiro é utilizado pelos flavivírus para promover a remodelação da membrana, incorporando fatores virais e do hospedeiro, aprimorando a replicação viral (Aktepe *et al.*, 2017).

6.4 Relação entre as proteínas de interesse e a resposta imune

Neste estudo, várias proteínas celulares relacionadas à resposta imune contra infecções virais foram identificadas em culturas de células infectadas pelo ISAV, onde a maioria delas foi detectada exclusiva ou supra-regulada nas primeiras horas de infecção (12 e 36 hpi) e reguladas negativamente ou até mesmo não mais detectadas a partir de 60 hpi. Esses achados conferem com a análise de ontologia gênica que apresentou os termos de processo biológico "resposta celular ao estímulo" e "regulação do sistema imune/resposta inflamatória" como termos enriquecidos em 12 e 36 hpi e também na análise de agrupamento que mostrou um aumento na produção de proteínas relacionadas com o termo de GO enriquecido "resposta a vírus" (Figura 13, *cluster 1*).

Leucine-rich repeat-containing protein 32-like (exclusiva em 12 e 36 hpi e regulada para baixo em 60 hpi), *phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit 5-like* (exclusiva em 12 hpi), *phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase type-1 beta-like* (regulada para cima em 12 hpi) e *erhoguanine nucleotide exchange factors 2* (exclusivo em 12 e 36 hpi) e 15 (regulado para cima em 60 hpi) podem estar envolvidos no reconhecimento de ISAV na célula. Proteínas contendo repetições ricas em leucina e domínio de ligação ao nucleotídeo (NLRs), receptores toll-like (TLRs) e proteínas do gene 1 indutíveis pelo ácido retinóico (RIG-Is) são três famílias de receptores de reconhecimento de padrões e estão envolvidas no reconhecimento do vírus influenza em cultura celular (Wu *et al.*, 2011). *Phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit 5-like* e *phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase type-1 beta-like* estão envolvidos na atividade da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) e a PI3K é ativada pelo RNA do vírus influenza via RIG-I para promover a produção do interferon (IFN-I) (Hrincius *et al.*,

2011). Sobre os fatores rho de troca de nucleotídeos de guanina, a ativação do fator de troca de nucleotídeos de guanina associado a microtúbulos, GEF-H1, é necessária para a detecção de ácidos nucleicos virais intracelulares por receptores do tipo RIG-I (Chiang *et al.*, 2014). Os resultados sugerem que o ISAV, bem como os outros vírus de RNA, também tem o seu genoma reconhecido por diferentes receptores celulares que ativam as vias de sinalização celular que culminam na produção de IFN-I.

O antígeno de MHC de classe I alfa 2 (exclusivo em 12hpi) e a aminopeptidase (exclusiva em 12hpi e regulada para baixo em 60hpi) estão envolvidos na apresentação dos antígenos do ISAV ao sistema imune. A expressão de genes da via do MHC de classe I já foi identificada em resposta ao ISAV em células de salmão do Atlântico (Jørgensen *et al.*, 2006) e a regulação positiva da aminopeptidase 1 foi detectada em células A549 infectadas com o vírus H1N1 com um aumento correspondente na expressão de antígenos MHC classe I (Wang *et al.*, 2013).

Os IFN-I são mais conhecidos pela sua capacidade de induzir um estado antiviral nas células através da indução de múltiplas proteínas antivirais que inibem diferentes etapas da replicação dos vírus (Robertson, 2018). *Palmitoyltransferase* (exclusiva em 12hpi), *interferon-induced very large GTPase 1-like* (exclusiva em 12hpi), diferentes *E3 ubiquitin-protein ligases*: *TRIM39-like* (exclusiva em 12hpi), *BRE1A-like* (regulada para cima em 12hpi) e *HERC2* (exclusiva em 36hpi) e *interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 5-like* (IFIT5, regulada para cima em 36hpi) podem agir como proteínas antivirais em uma infecção por ISAV. A palmitoiltransferase ZDHHC20 aumenta a palmitoilação da proteína transmembrana 3 induzida por interferon (IFITM3) e sua atividade antiviral restringe a infecção pelo vírus influenza inibindo a entrada do vírus nos endossomos (McMichael *et al.*, 2017). Sabe-se que as GTPases humanas detectam a infecção viral reconhecendo estruturas semelhantes a nucleocapsídeos que são capturadas e enviadas para locais onde ficam indisponíveis para a geração de novas partículas virais (Haller *et al.*, 2007). As proteínas do motivo tripartite (TRIM) formam uma grande família em vertebrados e estão envolvidas na atividade antiviral que depende de sua função como ligases de ubiquitina E3. Nas células TO de salmão do Atlântico, a transcrição de TRIM16, TRIM25 e TRIM39

mostrou-se regulada positivamente pela ação do IFN-I (Xu *et al.*, 2015). AIFIT5 aviária prejudica a replicação de vírus de RNA pela sua interação com estruturas de RNA que transportam um grupo trifosfato na sua extremidade 5' levando a uma possível inibição da tradução (Santhakumar *et al.*, 2018). Portanto, os resultados mostraram que o processo infeccioso pelo ISAV induziu em células ASK-2, através da ação do IFN-I, a expressão de genes estimulados por interferon (ISGs) que levou à síntese de várias proteínas antivirais que atuam em diferentes estágios do ciclo viral.

A proteína semelhante a NLRC3 (exclusiva em 12hpi e regulada negativamente em 60hpi) e o antígeno CD276 (exclusivo em 12hpi e regulado positivamente em 36hpi) são reguladores negativos da resposta imune. NLRC3 é uma proteína contendo repetição rica em leucina e domínio de ligação a nucleotídeos (NLR) recentemente caracterizada que regula negativamente a via do IFN do tipo I (Tocker *et al.*, 2017). O CD276 desempenha um papel importante na inibição da função das células T e durante a infecção pelo vírus da septicemia hemorrágica viral, a transcrição do CD276 foi induzida nas primeiras horas no fígado e expressa tardiamente no rim, no baço, no intestino e na brânquia (Hwang *et al.*, 2018). Estes resultados mostram que o ISAV tenta evadir da resposta imune por diferentes estratégias para assegurar a sua replicação.

6.5 Relação entre as proteínas de interesse e a apoptose

Os dados sugerem que as seguintes proteínas podem estar relacionadas ao processo de apoptose induzida pelo ISAV e responsável pelo ECP: *heatshockprotein 90-alpha 1* (exclusiva em 12hpi), *voltage-dependent anion channel 2* (exclusivo em 12 e 36hpi), *mitogen-activated protein kinase* (exclusiva em 12hpi), *transcription factor E2F1-like* (exclusivo em 12hpi) e *hexokinase-1-like* (regulada para cima em 60hpi). A proteína de choque térmico 90 em células epiteliais basais alveolares humanas interage com a proteína NS1 de IAV e essa interação promove a apoptose através da ativação da cascata de caspases (Zhang *et al.*, 2011). O canal de ânion dependente de voltagem 2 interage com a proteína viral 5 durante a infecção pelo vírus causador da doença de Gumboro e essa interação induz à apoptose restringindo a replicação viral (Li *et al.*,

2012). O ISAV desencadeia uma forte produção de radicais de oxigênio capazes de estimular a expressão e ativação de proteínas pró-apoptóticas através da via de sinalização da proteína quinase p38 ativada por mitógeno (MAPK), que resulta na apoptose de células SHK-1(Olavarría *et al.*, 2015). Um estudo propôs um papel pró-apoptótico para a nucleoproteína do IAV na qual ela suprime a expressão do fator anti-apoptótico API5 e potencializa a via de apoptose dependente do fator de transcrição E2F1 assegurando, assim, a replicação viral(Mayank *et al.*, 2015).A hexoquinase-1 (HK-1) promove a apoptose em macrófagos infectados pelo HIV-1. O HIV-1 induz o aumento na expressão da HK-1 ligada a mitocôndrias. Quando ocorre a dissociação da HK-1 da mitocôndria, isso induz a despolarização da membrana mitocondrial e a apoptose mediada por caspases(Sen *et al.*, 2015).Os dados deste trabalho alinhados com os resultados desses estudos inferem que o ISAV provavelmente induz a apoptose por diferentes vias, assim como o IAV que regula o processo apoptótico para garantir a sua replicação. Nos estágios iniciais da infecção, o IAV ativa sinais anti-apoptóticos para evitar o mecanismo de defesa do hospedeiro e, em estágios posteriores, o IAV induz a apoptose para dar prosseguimento à replicação viral(Mayank *et al.*, 2015).

Este estudo oferece uma abordagem mais abrangente sobre o processo infeccioso pelo ISAV. Pela primeira vez, foram descritas mudanças dinâmicas do proteoma celular ao longo do tempo que revelou processos dinâmicos de regulação de proteínas. Pelo uso da proteômica quantitativa livre de marcação, foram identificados vários fatores celulares interessantes que caracterizam a infecção pelo ISAV em células de salmão que participam de todos os estágios da replicação viral e também em diferentes processos da resposta imune. Análises adicionais são necessárias para elucidar os papéis precisos dessas proteínas celulares na infecção pelo ISAV.

CONCLUSÕES

7. Conclusões

Este estudo mostrou evidências robustas de que a infecção pelo ISAV tem impacto no proteoma da célula com a identificação de inúmeros fatores do hospedeiro que caracterizam o processo infeccioso viral. A infecção pelo ISAV em células ASK-2 caracteriza-se pelo aparecimento do efeito citopático e produção de novas partículas virais em 36 horas de infecção e com efeito progressivo ao longo do tempo, o que permite inferir que o ciclo de replicação do ISAV está entre 12 e 36 horas. O ISAV induz uma série de alterações ultraestruturais na célula, algumas já descritas em estudos anteriores e outras novas relacionadas à disposição do citoesqueleto. O proteoma da célula ASK-2 se mostrou distinto para cada tempo de coleta, altamente dinâmico e com tendência de redução progressiva das proteínas celulares, onde as proteínas virais, RdRp e NS1, atuam em diferentes mecanismos de *host shutoff*. Além disso, a PCR em tempo real validou o resultado da proteômica.

Parte das proteínas identificadas estão relacionadas às diferentes etapas do ciclo de replicação do ISAV (da entrada ao brotamento), a resposta imune e ao processo de apoptose responsável pelo ECP. Os resultados permitem inferir novos aspectos da biologia viral tais como:

- 1- ISAV utiliza diferentes mecanismos de reconhecimento e entrada na célula dependendo da sua morfologia
- 2- Para seu desnudamento, ISAV utiliza estratégias como a acidificação do endossomo e o uso da maquinaria celular denominada agressomo.
- 3- ISAV subverte as proteínas celulares para realizar o *splicing* dos seus RNAs mensageiros, a tradução, as modificações pós-traducionais e a regulação do tráfego núcleo-citoplasmático das suas proteínas.
- 4- ISAV tem seu genoma reconhecido por diferentes receptores celulares que ativam a produção de IFN-I e a síntese de diferentes proteínas antivirais que atuam em vários estágios do ciclo viral.
- 5- ISAV tenta evadir da resposta imune por diferentes estratégias para garantir sua replicação.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

8. Considerações finais

Este estudo permitiu criar um banco de dados de proteínas que tem sua produção alterada devido à infecção pelo ISAV. Vale lembrar que para boa parte das proteínas identificadas exclusivas ou diferencialmente produzidas nas culturas celulares infectadas não possuíam algum estudo prévio a respeito do seu papel biológico em uma infecção viral, seja da família *Orthomyxoviridae* ou de outras famílias virais. A partir desse banco de dados, novos estudos podem buscar confirmar as interações que ocorrem entre as proteínas celulares e a proteínas virais e o papel biológico dessas interações no ciclo do ISAV e, assim, contribuir para entender melhor a biologia viral, principalmente de membros da família *Orthomyxoviridae*.

O uso da proteômica em larga escala se mostrou uma ferramenta valiosa no estudo do ISAV e pode ser utilizada para tentar elucidar questões como as diferenças observadas no processo infeccioso de estirpes de virulências distintas por exemplo, uma vez que, ao comparar os proteomas das células infectadas ou de animais infectados pelas duas variantes do vírus, conseguirá identificar quais proteínas do hospedeiro tiveram sua produção modificada. Outra perspectiva poderia ser a de avaliar as alterações no proteoma da célula amostrados durante um ciclo único de multiplicação do ISAV (tempos 0, 6, 12, 18 e 24hpi) para compreender as alterações celulares decorrentes da infecção. Uma outra proposta seria a de avaliar as alterações proteômicas devido a infecção pelo ISAV utilizando uma população celular sincronizada, ou seja, em que todas as células da cultura estejam em uma mesma fase do ciclo celular. A sincronização celular é induzida pelo uso de substâncias e ajudaria a elucidar a questão de como o estado da célula hospedeira afeta a infecção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

9. Referências Bibliográficas

- Aamelfot, M., Dale, O. B., & Falk, K. (2014). Infectious salmon anaemia - pathogenesis and tropism. *Journal of Fish Diseases*, 37(4), 291–307. <https://doi.org/10.1111/jfd.12225>
- Aldrin, M., Lyngstad, T. M., Kristoffersen, A. B., & Storvik, B. (2011). Modelling the spread of infectious salmon anaemia among salmon farms based on seaway distances between farms and genetic relationships between infectious salmon anaemia virus isolates, (February), 1346–1356.
- Arseneau, J. R., Laflamme, M., Gautreau, C., Boston, L., & Goguen, M. L. (2018). Accelerated ISAV replication detection by cell culture methods combined with time - monitoring RT - qPCR, (August), 1–11. <https://doi.org/10.1111/jfd.12925>
- Asaka, M. N., Kawaguchi, A., Sakai, Y., Mori, K., & Nagata, K. (2016). Polycomb repressive complex 2 facilitates the nuclear export of the influenza viral genome through the interaction with M1. *Scientific Reports*, 6(August), 1–9. <https://doi.org/10.1038/srep33608>
- Austbø, L., Aas, I. B., König, M., Weli, S. C., Syed, M., Falk, K., & Koppang, E. O. (2014). Transcriptional response of immune genes in gills and the interbranchial lymphoid tissue of Atlantic salmon challenged with infectious salmon anaemia virus. *Developmental and Comparative Immunology*, 45(1), 107–114. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.02.007>
- Banerjee, I., Miyake, Y., Philip Nobs, S., Schneider, C., Horvath, P., Kopf, M., ... Yamauchi, Y. (2014). Influenza A virus uses the aggresome processing machinery for host cell entry. *Science*, 346(6208), 473–477. <https://doi.org/10.1126/science.1257037>
- Bavagnoli, L., Cucuzza, S., Campanini, G., Rovida, F., Paolucci, S., Baldanti, F., & Maga, G. (2015). The novel influenza A virus protein PA-X and its naturally deleted variant show different enzymatic properties in comparison to the viral endonuclease PA. *Nucleic Acids Research*, 43(19), 9405–9417. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv926>

- Brito, M. F., Auler, P. A., Tavares, G. C., Rezende, C. P., Almeida, G. M. F., Pereira, F. L., ... Henry, M. (2018). Label-free proteome of water buffalo (*Bubalus bubalis*) seminal plasma. *Reproduction in Domestic Animals*, *53*(5), 1243–1246. <https://doi.org/10.1111/rda.13206>
- Bruce, E. A., Digard, P., & Stuart, A. D. (2010). The Rab11 Pathway Is Required for Influenza A Virus Budding and Filament Formation. *Journal of Virology*, *84*(12), 5848–5859. <https://doi.org/10.1128/JVI.00307-10>
- Cárdenas, C., Ojeda, N., Labra, A., & Marshall, S. H. (2017). An updated proposal for classification of infectious salmon anemia virus strains. *Archives of Virology*, *162*(9), 2861–2867. <https://doi.org/10.1007/s00705-017-3440-z>
- Chang, C. K., Chen, C. J., Wu, C. C., Chen, S. W., Shih, S. R., & Kuo, R. L. (2017). Cellular hnRNP A2/B1 interacts with the NP of influenza A virus and impacts viral replication. *PLoS ONE*, *12*(11), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188214>
- Chen, Z., Li, Y., & Krug, R. M. (1999). Influenza A virus NS1 protein targets poly(A)-binding protein II of the cellular 3'-end processing machinery. *The EMBO Journal*, *18*(8), 2273–2283. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.8.2273>
- Chiang, H. Sen, Zhao, Y., Song, J. H., Liu, S., Wang, N., Terhorst, C., ... Reinecker, H. C. (2014). GEF-H1 controls microtubule-dependent sensing of nucleic acids for antiviral host defenses. *Nature Immunology*, *15*(1), 63–71. <https://doi.org/10.1038/ni.2766>
- Chiu, H.-C., Hannemann, H., Heesom, K. J., Matthews, D. A., & Davidson, A. D. (2014). High-Throughput Quantitative Proteomic Analysis of Dengue Virus Type 2 Infected A549 Cells. *PLoS ONE*, *9*(3), e93305. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093305>
- Claassen, M. (2012). Inference and Validation of Protein Identifications. *Molecular & Cellular Proteomics*, *11*(11), 1097–1104. <https://doi.org/10.1074/mcp.R111.014795>
- Collet, B., Urquhart, K., Monte, M., Collins, C., Perez, S. G., Secombes, C. J., & Hall, M. (2015). Individual monitoring of immune response in Atlantic Salmon *Salmo*

- Salar following experimental infection with infectious salmon anaemia virus (ISAV). *PLoS ONE*, *10*(9), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137767>
- Consortium, T. G. O. (2000). Gene ontology: Tool for the unification of biology. *Nature Genetics*, *25*(1), 25–29. <https://doi.org/10.1038/75556>.Gene
- Cook, J. D., Sultana, A., & Lee, J. E. (2017). Structure of the infectious salmon anemia virus receptor complex illustrates a unique binding strategy for attachment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *114*(14), E2929–E2936. <https://doi.org/10.1073/pnas.1617993114>
- Cooper, J. A., Liu, L., Woodruff, E. A., Taylor, H. E., Goodwin, J. S., D'Aquila, R. T., ... Dong, X. (2011). Filamin A protein interacts with human immunodeficiency virus type 1 Gag protein and contributes to productive particle assembly. *Journal of Biological Chemistry*, *286*(32), 28498–28510. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.239053>
- Cottet, L., Rivas-Aravena, A., Cortez-San Martin, M., Sandino, A. M., & Spencer, E. (2011). Infectious salmon anemia virus-Genetics and pathogenesis. *Virus Research*, *155*(1), 10–19. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.10.021>
- Cottrell, J. S. (2011). Protein identification using MS/MS data. *Journal of Proteomics*, *74*(10), 1842–1851. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2011.05.014>
- Crane, M., & Hyatt, A. (2011). Viruses of fish: An overview of significant pathogens. *Viruses*, *3*(11), 2025–2046. <https://doi.org/10.3390/v3112025>
- Cypryk, W., Lorey, M., Puustinen, A., Nyman, T. A., & Matikainen, S. (2017). Proteomic and Bioinformatic Characterization of Extracellular Vesicles Released from Human Macrophages upon Influenza A Virus Infection. *Journal of Proteome Research*, *16*(1), 217–227. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b00596>
- Dai, X., Li, N., & Roller, R. J. (2018). Peroxiredoxin 1 protein interacts with influenza virus ribonucleoproteins and is required for efficient virus replication. *Vaccine*, *36*(30), 4540–4547. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2018.05.125>
- Dannevig, B. H., Falk, K., & Ellen, N. (1995). Isolation of the causal virus of infectious salmon anaemia (ISA) in a long-term cell line from Atlantic salmon head kidney, 1353–1359.

- Devold, M., Krossay, B., Aspehaug, V., & Nylund, A. (2000). Use of RT-PCR for diagnosis of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in carrier sea trout *Salmo trutta* after experimental infection, 0–9.
- Dörr, F. A., Farmacêuticas, F. D. C., Paulo, U. D. S., Prof, A., Prestes, L., Sp, S. P., ... Naturais, D. C. (2011). Assuntos Gerais, *34*(10), 1875–1887.
- Eierhoff, T., Hrinčius, E. R., Rescher, U., Ludwig, S., & Ehrhardt, C. (2010). The epidermal growth factor receptor (EGFR) promotes uptake of influenza A viruses (IAV) into host cells. *PLoS Pathogens*, *6*(9). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001099>
- Eisfeld, A. J., Kawakami, E., Watanabe, T., Neumann, G., & Kawaoka, Y. (2011). RAB11A Is Essential for Transport of the Influenza Virus Genome to the Plasma Membrane. *Journal of Virology*, *85*(13), 6117–6126. <https://doi.org/10.1128/JVI.00378-11>
- Ersing, I., Nobre, L., Wang, L. W., Soday, L., Ma, Y., Paulo, J. A., ... Gewurz, B. E. (2017). A Temporal Proteomic Map of Epstein-Barr Virus Lytic Replication in B Cells. *Cell Reports*, *19*(7), 1479–1493. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.04.062>
- Evans, D. T., Tillman, K. C., & Desrosiers, R. C. (2002). Envelope Glycoprotein Cytoplasmic Domains from Diverse Lentiviruses Interact with the Prenylated Rab Acceptor. *Journal of Virology*, *76*(1), 327–337. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.1.327-337.2002>
- Falk, K., Namork, E., Rimstad, E., Mjaaland, S., & Dannevig, B. H. (1997). Characterization of Infectious Salmon Anemia Virus , an Orthomyxo-Like Virus Isolated from Atlantic Salmon (*Salmo salar* L .), *71*(12), 9016–9023.
- Feist, P., & Hummon, A. B. (2015). Proteomic challenges: Sample preparation techniques for Microgram-Quantity protein analysis from biological samples. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(2), 3537–3563. <https://doi.org/10.3390/ijms16023537>
- FUTSCHIK, M. E., & CARLISLE, B. (2005). Noise-Robust Soft Clustering of Gene Expression Time-Course Data. *Journal of Bioinformatics and Computational Biology*, *03*(04), 965–988. <https://doi.org/10.1142/S0219720005001375>

- Gagné, N., & LeBlanc, F. (2018). Overview of infectious salmon anaemia virus (ISAV) in Atlantic Canada and first report of an ISAV North American-HPR0 subtype. *Journal of Fish Diseases*, *41*(3), 421–430. <https://doi.org/10.1111/jfd.12670>
- Greco, T. M., Diner, B. A., & Cristea, I. M. (2014). The Impact of Mass Spectrometry–Based Proteomics on Fundamental Discoveries in Virology. *Annual Review of Virology*, *1*(1), 581–604. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-031413-085527>
- Gregory, A. (2002). Detection of infectious salmon anaemia virus (ISAV) by in situ hybridisation, *50*, 105–110.
- Guo, H., Zhang, J., Wang, Y., Bu, C., Zhou, Y., & Fang, Q. (2017). Comparative Proteomic Analysis of Lysine Acetylation in Fish CIK Cells Infected with Aquareovirus. <https://doi.org/10.3390/ijms18112419>
- Gustafson, L. L., Creekmore, L. H., Snekvik, K. R., Ferguson, J. A., Warg, J. V., Blair, M., ... Winton, J. R. (2018). A systematic surveillance programme for infectious salmon anaemia virus supports its absence in the Pacific Northwest of the United States. *Journal of Fish Diseases*, *41*(2), 337–346. <https://doi.org/10.1111/jfd.12733>
- Haller, O., Staeheli, P., & Kochs, G. (2007). Interferon-induced Mx proteins in antiviral host defense. *Biochimie*, *89*(6–7), 812–818. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2007.04.015>
- Hetland, D. L., Jørgensen, S. M., Skjødt, K., Dale, O. B., Falk, K., Xu, C., ... Press, C. M. (2010). In situ localisation of major histocompatibility complex class I and class II and CD8 positive cells in infectious salmon anaemia virus (ISAV)-infected Atlantic salmon. *Fish and Shellfish Immunology*, *28*(1), 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2009.09.011>
- Hetz, C. (2012). The unfolded protein response : controlling cell fate decisions under ER stress and beyond. *Nature Publishing Group*, *13*(2), 89–102. <https://doi.org/10.1038/nrm3270>
- Houston, R. D., & Macqueen, D. J. (2019). Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) genetics in the 21st century: taking leaps forward in aquaculture and biological understanding. *Animal Genetics*, *50*(1), 3–14. <https://doi.org/10.1111/age.12748>
- Hrincius, E. R., Dierkes, R., Anhlan, D., Wixler, V., Ludwig, S., & Ehrhardt, C. (2011).

- Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) is activated by influenza virus vRNA via the pathogen pattern receptor Rig-I to promote efficient type I interferon production. *Cellular Microbiology*, 13(12), 1907–1919. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2011.01680.x>
- Hu, Y., Smith, D. R., Nome, T., Grimholt, U., Walenz, B., Iturra, P., ... Maass, A. (2016). The Atlantic salmon genome provides insights into rediploidization. *Nature*, 533(7602), 200–205. <https://doi.org/10.1038/nature17164>
- Huang, P. N., Lin, J. Y., Locker, N., Kung, Y. A., Hung, C. T., Lin, J. Y., ... Shih, S. R. (2011). Far upstream element binding protein 1 binds the internal ribosomal entry site of enterovirus 71 and enhances viral translation and viral growth. *Nucleic Acids Research*, 39(22), 9633–9648. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr682>
- Hwang, J. Y., Jeong, J. M., Kwon, M. G., Seo, J. S., Hwang, S. D., Son, M. H., ... Park, C. II. (2018). Olive flounder CD276 (B7-H3) a coinhibitory molecule for T cells: Responses during viral hemorrhagic septicemia virus (VHSV) stimulation. *Fish and Shellfish Immunology*, 73(2018), 228–233. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.12.021>
- Hygiene, F., & Rimstad, E. (2002). Infectious salmon anaemia virus, 273–282.
- International Salmon Farmers Association. (2016). Salmon Farming: Continued Evolution and Sustainable Growth.
- Jagger, B. W., Wise, H. M., Kash, J. C., Walters, K., Wills, N. M., & Xiao, Y. (2013). Europe PMC Funders Group An Overlapping Protein-Coding Region In Influenza A Virus Segment 3 Modulates the Host Response, 337(6091), 199–204. <https://doi.org/10.1126/science.1222213>
- Jangra, R. K., Herbert, A. S., Li, R., Jae, L. T., Kleinfelter, L. M., Slough, M. M., ... Chandran, K. (2018). Protocadherin-1 is essential for cell entry by New World hantaviruses. *Nature*, 563(7732), 559–563. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0702-1>
- Jian, Y., George, C., Irena, Z., Ioana, C., Steve, R., & Madden Thomas, L. (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13(1), 134. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13->

- Jorgensen, S. M., Kleveland, E. J., Grimholt, U., & Gjoen, T. (2006). Validation of reference genes for real-time polymerase chain reaction studies in Atlantic salmon. *Marine Biotechnology*, 8(4), 398–408. <https://doi.org/10.1007/s10126-005-5164-4>
- Jørgensen, S. M., Lyng-Syvertsen, B., Lukacs, M., Grimholt, U., & Gjølven, T. (2006). Expression of MHC class I pathway genes in response to infectious salmon anaemia virus in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) cells. *Fish and Shellfish Immunology*, 21(5), 548–560. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2006.03.004>
- Joseph, T., Cepica, A., Brown, L., Ikede, B. O., & Kibenge, F. S. B. (2004). Mechanism of cell death during infectious salmon anemia virus infection is cell type-specific. *Journal of General Virology*, 85(10), 3027–3036. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80091-0>
- Jung, K. Il, Pyo, C. W., & Choi, S. (2018). Biochemical and Biophysical Research Communications Influenza A virus-induced autophagy contributes to enhancement of virus infectivity by SOD1 downregulation in alveolar epithelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 498(4), 960–966. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.03.089>
- Kabanova, A., Marcandalli, J., Zhou, T., Bianchi, S., Baxa, U., Tsybovsky, Y., ... Perez, L. (2016). Platelet-derived growth factor- α receptor is the cellular receptor for human cytomegalovirus gHgLgO trimer. *Nature Microbiology*, 1(8), 1–8. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.82>
- Kakugawa, S., Shimojima, M., Neumann, G., Goto, H., & Kawaoka, Y. (2009). RuvB-Like Protein 2 Is a Suppressor of Influenza A Virus Polymerases. *Journal of Virology*, 83(13), 6429–6434. <https://doi.org/10.1128/JVI.00293-09>
- Kärber G. (1931). Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Archiv f experiment Pathol u Pharmakol*; 162: 480-483. DOI: 10.1007/BF01863914.
- Karpievitch, Y. V., Polpitiya, A. D., Anderson, G. A., Smith, R. D., & Dabney, A. R. (2010). Liquid chromatography mass spectrometry-based proteomics: Biological and technological aspects. *Annals of Applied Statistics*, 4(4), 1797–1823.

<https://doi.org/10.1214/10-AOAS341>

- Kavaliauskis, A., Arnemo, M., Rishovd, A. L., & Gjøen, T. (2016). Activation of unfolded protein response pathway during infectious salmon anemia virus (ISAV) infection in vitro and in vivo. *Developmental and Comparative Immunology*, *54*(1), 46–54. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2015.08.009>
- Kibenge, F. S. B., & Godoy, M. G. (2016). *Aquaculture virology*. *Aquaculture Virology*. <https://doi.org/10.1177/026975801001700103>
- Kibenge, F. S., Gárate, O. N., Johnson, G., Arriagada, R., Kibenge, M. J., & Wadowska, D. (2001). Isolation and identification of infectious salmon anaemia virus (ISAV) from Coho salmon in Chile. *Diseases of Aquatic Organisms*, *45*(1), 9–18. <https://doi.org/10.3354/dao045009>
- Kileng, Ø., Brundtland, M. I., & Robertsen, B. (2007). Infectious salmon anemia virus is a powerful inducer of key genes of the type I interferon system of Atlantic salmon, but is not inhibited by interferon. *Fish and Shellfish Immunology*, *23*(2), 378–389. <https://doi.org/10.1016/j.fsi.2006.11.011>
- Krag, L. A., Herrmann, B., Karlsen, J. D., & Mieske, B. (2015). Species selectivity in different sized topless trawl designs: Does size matter? *Fisheries Research*, *172*, 243–249.
- Krossøy, B., Nilsen, F., Falk, K., Endresen, C., & Nylund, A. (2001). <Krossøy et al., 2001.pdf>, *44*, 1–6. Retrieved from <http://internal-pdf//Krossøy et al., 2001-1508781056/Krossøy et al., 2001.pdf>
- Kuleshov, M. V., Jones, M. R., Rouillard, A. D., Fernandez, N. F., Duan, Q., Wang, Z., ... Ma'ayan, A. (2016). Enrichr: a comprehensive gene set enrichment analysis web server 2016 update. *Nucleic Acids Research*, *44*(W1), W90–W97. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw377>
- Kummer, S., Flöttmann, M., Schwanhäusser, B., Sieben, C., Veit, M., Selbach, M., ... Herrmann, A. (2014). Alteration of protein levels during influenza virus H1N1 infection in host cells: A proteomic survey of host and virus reveals differential dynamics. *PLoS ONE*, *9*(4), 1–11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094257>
- Langevin, C., Aleksejeva, E., & Passoni, G. (2013). The Antiviral Innate Immune

- Response in Fish: Evolution and Conservation of the IFN System. *Journal of Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.09.033>
- Lauscher, A., Krossøy, B., Frost, P., Grove, S., König, M., Bohlin, J., ... Rimstad, E. (2011). Immune responses in Atlantic salmon (*Salmo salar*) following protective vaccination against Infectious salmon anemia (ISA) and subsequent ISA virus infection. *Vaccine*, 29(37), 6392–6401. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.04.074>
- Li, G. Z., Vissers, J. P. C., Silva, J. C., Golick, D., Gorenstein, M. V., & Geromanos, S. J. (2009). Database searching and accounting of multiplexed precursor and product ion spectra from the data independent analysis of simple and complex peptide mixtures. *Proteomics*, 9(6), 1696–1719. <https://doi.org/10.1002/pmic.200800564>
- Li, Z., Wang, Y., Xue, Y., Li, X., Cao, H., & Zheng, S. J. (2012). Critical Role for Voltage-Dependent Anion Channel 2 in Infectious Bursal Disease Virus-Induced Apoptosis in Host Cells via Interaction with VP5. *Journal of Virology*, 86(3), 1328–1338. <https://doi.org/10.1128/JVI.06104-11>
- Lin, J. Y., Li, M. L., & Shih, S. R. (2009). Far upstream element binding protein 2 interacts with enterovirus 71 internal ribosomal entry site and negatively regulates viral translation. *Nucleic Acids Research*, 37(1), 47–59. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn901>
- Liu, N., Song, W., Wang, P., Lee, K., Chan, W., Chen, H., & Cai, Z. (2008). Proteomics analysis of differential expression of cellular proteins in response to avian H9N2 virus infection in human cells. *Proteomics*, 8(9), 1851–1858. <https://doi.org/10.1002/pmic.200700757>
- Lovely, J. E., Dannevig, B. H., Falk, K., Hutchin, L., MacKinnon, A. M., Melville, K. J., ... Griffiths, S. G. (1999). First identification of infectious salmon anaemia virus in North America with haemorrhagic kidney syndrome. *Diseases of Aquatic Organisms*, 35(2), 145–148. <https://doi.org/10.3354/dao035145>
- Lum, K. K., & Cristea, I. M. (2016). Interactions During the Progression of Viral Infection, 13(3), 325–340. <https://doi.org/10.1586/14789450.2016.1147353>. Proteomic

- Lyngstad, T. M., Qviller, L., Sindre, H., Brun, E., & Kristoffersen, A. B. (2018). Risk Factors Associated With Outbreaks of Infectious Salmon Anemia (ISA) With Unknown Source of Infection in Norway. *Frontiers in Veterinary Science*, 5(December), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00308>
- M.G., G., R., S., E.S., L., K.O., L., M.J., K., Y., W., ... Y., W. (2014). Genetic analysis and comparative virulence of infectious salmon anemia virus (ISAV) types HPR7a and HPR7b from recent field outbreaks in Chile. *Virology Journal*, 11(1), 204. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1186/s12985-014-0204-1>
- Ma, H., Kien, F., Maniere, M., Zhang, Y., Lagarde, N., Tse, K. S., ... Nal, B. (2012). Human Annexin A6 Interacts with Influenza A Virus Protein M2 and Negatively Modulates Infection. *Journal of Virology*, 86(3), 1789–1801. <https://doi.org/10.1128/JVI.06003-11>
- Marshall, S. H., Ramirez, R., Labra, A., Carmona, M., & Munoz, C. (2014). Bona Fide Evidence for Natural Vertical Transmission of Infectious Salmon Anemia Virus in Freshwater Brood Stocks of Farmed Atlantic Salmon (*Salmo salar*) in Southern Chile. *Journal of Virology*, 88(11), 6012–6018. <https://doi.org/10.1128/jvi.03670-13>
- Matthiesen, R., & Bunkenborg, J. (2013). *Chapter 1 Introduction to Mass Spectrometry-Based Proteomics* (Vol. 1007). <https://doi.org/10.1007/978-1-62703-392-3>
- Mayank, A. K., Sharma, S., Nailwal, H., & Lal, S. K. (2015). Nucleoprotein of influenza A virus negatively impacts antiapoptotic protein API5 to enhance E2F1-dependent apoptosis and virus replication. *Cell Death & Disease*, 6, e2018. <https://doi.org/10.1038/cddis.2015.360>
- McBeath, A. J. A., Ho, Y. M., Aamelfot, M., Hall, M., Christiansen, D. H., Markussen, T., ... Matejusova, I. (2014). Low virulent infectious salmon anaemia virus (ISAV) replicates and initiates the immune response earlier than a highly virulent virus in Atlantic salmon gills. *Veterinary Research*, 45(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13567-014-0083-x>
- McMichael, T. M., Zhang, L., Chemudupati, M., Hach, J. C., Kenney, A. D., Hang, H.

- C., & Yount, J. S. (2017). The palmitoyltransferase ZDHHC20 enhances interferon-induced transmembrane protein 3 (IFITM3) palmitoylation and antiviral activity. *Journal of Biological Chemistry*, 292(52), 21517–21526. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.800482>
- Mindaye, S. T., Ilyushina, N. A., Fantoni, G., Alterman, M. A., Donnelly, R. P., & Eichelberger, M. C. (2017). Impact of Influenza A Virus Infection on the Proteomes of Human Bronchoepithelial Cells from Different Donors. *Journal of Proteome Research*, 16(9), 3287–3297. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.7b00286>
- Müller, K. H., Kainov, D. E., El Bakkouri, K., Saelens, X., De Brabander, J. K., Kittel, C., ... Müller, C. P. (2011). The proton translocation domain of cellular vacuolar ATPase provides a target for the treatment of influenza A virus infections. *British Journal of Pharmacology*, 164(2), 344–357. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01346.x>
- Nanbo, A., Imai, M., Watanabe, S., Noda, T., Takahashi, K., Neumann, G., ... Kawaoka, Y. (2010). Ebolavirus is internalized into host cells via macropinocytosis in a viral glycoprotein-dependent manner. *PLoS Pathogens*, 6(9). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001121>
- Nemeroff, M. E., Barabino, S. M. L., Li, Y., Keller, W., & Krug, R. M. (1998). Influenza virus NS1 protein interacts with the cellular 30 kDa subunit of CPSF and inhibits 3' end formation of cellular pre-mRNAs. *Molecular Cell*, 1(7), 991–1000. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80099-4](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80099-4)
- Nylund, A., Brattespe, J., Plarre, H., Kambestad, M., & Karlsen, M. (2019). Wild and farmed salmon (*Salmo salar*) as reservoirs for infectious salmon anaemia virus, and the importance of horizontal- and vertical transmission. *Plos One*, 14(4), e0215478. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0215478>
- OIE. (2018). Infection With HPR-Deleted or HPR0 Infectious Salmon Anaemia Virus. *Manual of Diagnostic Tests for Aquatic Animals*, 1–16. Retrieved from http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/aahm/current/chapitre_is_av.pdf

- Olavarría, V. H., Recabarren, P., Fredericksen, F., Villalba, M., & Yáñez, A. (2015). ISAV infection promotes apoptosis of SHK-1 cells through a ROS/p38 MAPK/Bad signaling pathway. *Molecular Immunology*, *64*(1), 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2014.10.016>
- Paton, N. W., Wilkins, M. R., Taylor, C. F., Heck, A. J. R., Vandekerckhove, J., Xenarios, I., ... Aebersold, R. (2007). The minimum information about a proteomics experiment (MIAPE). *Nature Biotechnology*, *25*(8), 887–893. <https://doi.org/10.1038/1329>
- Pinto, R., Herold, S., Cakarova, L., Hoegner, K., Lohmeyer, J., Planz, O., & Pleschka, S. (2011). Inhibition of influenza virus-induced NF-kappaB and Raf/MEK/ERK activation can reduce both virus titers and cytokine expression simultaneously in vitro and in vivo. *Antiviral Research*, *92*(1), 45–56. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2011.05.009>
- Ramírez, R., & Marshall, S. H. (2018). Identification and isolation of infective filamentous particles in Infectious Salmon Anemia Virus (ISAV). *Microbial Pathogenesis*, *117*, 219–224. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.02.029>
- Rector, T., Brown, N. E. C., Anderson, E. D., & Clouthier, S. C. (2015). Genomic organization of infectious salmon anaemia virus. *Journal of General Virology*, *83*(2), 421–428. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-83-2-421>
- Rivas, H. G., Schmaling, S. K., & Gaglia, M. M. (2016). Shutoff of host gene expression in influenza A virus and herpesviruses: Similar mechanisms and common themes. *Viruses*, *8*(4), 1–26. <https://doi.org/10.3390/v8040102>
- Robertsen, B. (2018). The role of type I interferons in innate and adaptive immunity against viruses in Atlantic salmon. *Developmental and Comparative Immunology*, *80*, 41–52. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2017.02.005>
- Rodriguez, A., Perez-Gonzalez, A., & Nieto, A. (2007). Influenza Virus Infection Causes Specific Degradation of the Largest Subunit of Cellular RNA Polymerase II. *Journal of Virology*, *81*(10), 5315–5324. <https://doi.org/10.1128/JVI.02129-06>
- Sadewasser, A., Paki, K., Eichelbaum, K., Bogdanow, B., Saenger, S., Budt, M., ... Wolff, T. (2017). Quantitative Proteomic Approach Identifies Vpr Binding Protein

- as Novel Host Factor Supporting Influenza A Virus Infections in Human Cells. *Molecular & Cellular Proteomics*, *16*(5), 728–742. <https://doi.org/10.1074/mcp.M116.065904>
- Santhakumar, D., Rohaim, M. A. M. S., Hussein, H. A., Hawes, P., Ferreira, H. L., Behboudi, S., ... Munir, M. (2018). Chicken Interferon-induced Protein with Tetratricopeptide Repeats 5 Antagonizes Replication of RNA Viruses. *Scientific Reports*, *8*(1), 1–20. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24905-y>
- Schiøtz, B. L., Roos, N., Rishovd, A. L., & Gjøen, T. (2010). Formation of autophagosomes and redistribution of LC3 upon in vitro infection with infectious salmon anemia virus. *Virus Research*, *151*(1), 104–107. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.03.013>
- Seki, F., Someya, K., Komase, K., & Takeda, M. (2016). A chicken homologue of nectin-4 functions as a measles virus receptor. *Vaccine*, *34*(1), 7–12. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.10.109>
- Sen, S., Kaminiski, R., Deshmane, S., Langford, D., Khalili, K., Amini, S., & Datta, P. K. (2015). Role of hexokinase-1 in the survival of hiv-1-infected macrophages. *Cell Cycle*, *14*(7), 980–989. <https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1006971>
- Spearman C. The Method of “Right and Wrong Cases” (Constant Stimuli) without Gauss’s Formula (1908). *Br J Psychol* ; *2*: 227-242. DOI: 10.1037/h0063767.
- Takahashi, T., Murakami, K., Nagakura, M., Kishita, H., Watanabe, S., Honke, K., ... Suzuki, T. (2008). Sulfatide is required for efficient replication of influenza A virus. *J.Virol.*, *82*(1098–5514 (Electronic)), 5940–5950. <https://doi.org/10.1128/JVI.02496-07>
- Tavares, G. C., Carvalho, A. F., Pereira, F. L., Rezende, C. P., Azevedo, V. A. C., Leal, C. A. G., & Figueiredo, H. C. P. (2018). Transcriptome and proteome of fish-pathogenic *Streptococcus agalactiae* are modulated by temperature. *Frontiers in Microbiology*, *9*(NOV), 1–21. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02639>
- Tocker, A. M., Durocher, E., Jacob, K. D., Trieschman, K. E., Talento, S. M., Rechnitzer, A. A., ... Davis, B. K. (2017). The Scaffolding Protein IQGAP1 Interacts with NLRC3 and Inhibits Type I IFN Production. *The Journal of*

- Immunology*, 199(8), 2896–2909. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601370>
- Toennessen, R., Lauscher, A., & Rimstad, E. (2010). Comparative aspects of infectious salmon anemia virus, an orthomyxovirus of fish, to influenza viruses. *Indian Journal of Microbiology*, 49(4), 308–314. <https://doi.org/10.1007/s12088-009-0055-4>
- Turewicz, M., Kohl, M., Ahrens, M., Mayer, G., Uszkoreit, J., Naboulsi, W., ... Eisenacher, M. (2017). BioInfra.Prot: A comprehensive proteomics workflow including data standardization, protein inference, expression analysis and data publication. *Journal of Biotechnology*, 261(June), 116–125. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.06.005>
- Valenzuela-Miranda, D., Cabrejos, M. E., Yañez, J. M., & Gallardo-Escárate, C. (2015). From the viral perspective: Infectious salmon anemia virus (ISAV) transcriptome during the infective process in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Marine Genomics*, 20, 39–43. <https://doi.org/10.1016/j.margen.2014.12.007>
- Venkatesh, L. K., Gettemeier, T., & Chinnadurai, G. (2003). A nuclear kinesin-like protein interacts with and stimulates the activity of the leucine-rich nuclear export signal of the human immunodeficiency virus type 1 rev protein. *J Virol*, 77(13), 7236–7243. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.13.7236>
- Vreede, F. T., Chan, A. Y., Sharps, J., & Fodor, E. (2010). Mechanisms and functional implications of the degradation of host RNA polymerase II in influenza virus infected cells. *Virology*, 396(1), 125–134. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.10.003>
- Walker, P. J., & Winton, J. R. (2010). Emerging viral diseases of fish and shrimp. *Veterinary Research*, 41(6). <https://doi.org/10.1051/vetres/2010022>
- Wang, B., Niu, D., Lai, L., & Ren, E. C. (2013). P53 increases MHC class I expression by upregulating the endoplasmic reticulum aminopeptidase ERAP1. *Nature Communications*, 4, 1–11. <https://doi.org/10.1038/ncomms3359>
- Wang, F., Zhu, Y., & Hew, C. L. (2015). Quantitative study of proteomic alterations in a Zebrafish (*Danio rerio*) cell line infected with the Singapore Grouper Iridovirus (SGIV). *Virus Research*, 199, 62–67.

<https://doi.org/10.1016/j.virusres.2015.01.025>

- Wang, H., & Jiang, C. (2009). Influenza A virus H5N1 entry into host cells is through clathrin-dependent endocytosis. *Science in China, Series C: Life Sciences*, 52(5), 464–469. <https://doi.org/10.1007/s11427-009-0061-0>
- Wang, Y. E., Pernet, O., & Lee, B. (2012). Regulation of the nucleocytoplasmic trafficking of viral and cellular proteins by ubiquitin and small ubiquitin-related modifiers. *Biology of the Cell*, 104(3), 121–138. <https://doi.org/10.1111/boc.201100105>
- Workenhe, S. T., Rise, M. L., Kibenge, M. J. T., & Kibenge, F. S. B. (2010). The fight between the teleost fish immune response and aquatic viruses. *Molecular Immunology*, 47(16), 2525–2536. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2010.06.009>
- Workenhe, S. T., Wadowska, D. W., Wright, G. M., Kibenge, M. J. T., & Kibenge, F. S. B. (2007). Demonstration of infectious salmon anaemia virus (ISAV) endocytosis in erythrocytes of Atlantic salmon, 5, 2–6. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-4-13>
- Wu, S., Metcalf, J. P., & Wu, W. (2011). Innate immune response to influenza virus. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 24(3), 235–240. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e328344c0e3>
- Wüstenhagen, E., Hampe, L., Boukhallouk, F., Schneider, M. A., Spoden, G. A., Negwer, I., ... Florin, L. (2016). *The cytoskeletal adaptor obscurin-like 1 interacts with the HPV16 capsid protein L2 and is required for HPV16 endocytosis. Journal of Virology* (Vol. 185). <https://doi.org/10.1128/JVI.01222-16>
- Xin, Q., Deng, C., Chen, X., Wang, J., & Wang, S. (2017). crossm Quantitative Proteomic Analysis of, 91(12), 1–17.
- Xu, C., Evensen, Ø., & Mweemba, H. (2015). De novo assembly and transcriptome analysis of Atlantic salmon macrophage / dendritic-like TO cells following type I IFN treatment and Salmonid alphavirus subtype-3 infection, (0033), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1302-1>
- York, A., Hutchinson, E. C., & Fodor, E. (2014). Interactome Analysis of the Influenza A Virus Transcription/Replication Machinery Identifies Protein Phosphatase 6 as a

- Cellular Factor Required for Efficient Virus Replication. *Journal of Virology*, 88(22), 13284–13299. <https://doi.org/10.1128/JVI.01813-14>
- Zenner, H. L., Yoshimura, S. -i., Barr, F. A., & Crump, C. M. (2011). Analysis of Rab GTPase-Activating Proteins Indicates that Rab1a/b and Rab43 Are Important for Herpes Simplex Virus 1 Secondary Envelopment. *Journal of Virology*, 85(16), 8012–8021. <https://doi.org/10.1128/JVI.00500-11>
- Zhang, C., Yang, Y., Zhou, X., Yang, Z., Liu, X., Cao, Z., ... Huang, P. (2011). The NS1 protein of influenza A virus interacts with heat shock protein Hsp90 in human alveolar basal epithelial cells: Implication for virus-induced apoptosis. *Virology Journal*, 8, 1–9. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-8-181>
- Zhang, W., Cai, C., Lin, L., Tao, Y. J., & Jin, M. (2017). Subcellular localization and interactions of Infectious Salmon Anemia Virus (ISAV) M1 and NEP as well as host Hsc70. *Virology Journal*, 14(1), 1–7. <https://doi.org/10.1186/s12985-017-0702-z>
- Zheng, J., Sugrue, R. J., & Tang, K. (2011). Mass spectrometry based proteomic studies on viruses and hosts - A review. *Analytica Chimica Acta*, 702(2), 149–159. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.06.045>
- Zona, L., Lupberger, J., Sidahmed-Adrar, N., Thumann, C., Harris, H. J., Barnes, A., ... Baumert, T. F. (2013). HRas signal transduction promotes hepatitis C virus cell entry by triggering assembly of the host tetraspanin receptor complex. *Cell Host and Microbe*, 13(3), 302–313. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.02.006>

ANEXOS

10. Anexo - Resumo do manuscrito já elaborado, a ser submetido para avaliação no periódico *Frontiers in Microbiology*.

Impact of infectious salmon anemia virus replication on the proteome of Atlantic salmon kidney cells

Denilson E. S. Cunha¹, Júlio César C. Rosa², Felipe L. Pereira², Cristiana P. Rezende², Knut Falk³ and Henrique C. P. Figueiredo^{1,2}

1. AQUAVET, Laboratory of Aquatic Animal Diseases, Veterinary School, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil
2. AQUACEN, National Reference Laboratory for Aquatic Animal Diseases, Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil
3. Norwegian Veterinary Institute, Oslo, Norway

Abstract

Infectious salmon anemia (ISA) is a disease of farmed Atlantic salmon caused by the aquatic orthomyxovirus infectious salmon anemia virus (ISAV). Although several molecular studies have aimed to understand salmon-ISAV interaction, none of them has focused their attention upon the viral and host cell proteomes dynamics. We studied the dynamics of the proteome and ultrastructural changes of Atlantic salmon kidney (ASK-2) cells infected with ISAV up to 12, 36, 60 and 84 hours post infection by mass spectrometry based quantitative proteomics and transmission electron microscopy. A total of 1.726 proteins were identified. From these, 390 proteins were differentially expressed in relation of control group and 434 were identified exclusively in ISAV-infected cell cultures. Our data revealed that changes in salmon protein expression levels increase during viral infection, where, most proteins were significantly down-regulated. Bioinformatics analysis showed that differentially expressed proteins are involved in several biological processes, such as gene expression and immune response, suggesting that intracellular activities were changed upon viral infection. Through literature review, many of the proteins identified here have already been studied as host factors relevant for viral

replication, acting from the entrance of the virus in the cell until its budding, especially for influenza virus. Our findings by electron microscopy confirmed some changes described in previous studies and also brought new changes in the cell. For the first time we are able to describe changes of the cellular proteome of the ASK-2 cells overtime, revealing dynamic regulation processes and provides evidence that ISAV infection has impact on the cell status at protein level.

Keywords: infectious salmon anemia virus, label-free shotgun HDMS, ASK-2 cell, proteome.