

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia

PAPEL DO RECEPTOR DO FATOR DE ATIVAÇÃO
PLAQUETÁRIA NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL
PELOS VÍRUS INFLUENZA A

Cristiana Couto Garcia

Orientador: Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira

Co-orientadora: Profa. Dra. Lirlândia Pires de Sousa

Belo Horizonte

2009

Cristiana Couto Garcia

**PAPEL DO RECEPTOR DO FATOR DE ATIVAÇÃO
PLAQUETÁRIA NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL
PELOS VÍRUS INFLUENZA A**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Mauro Martins Teixeira
Co-orientadora: Profa. Dra. Lirlândia Pires de Sousa

Belo Horizonte

2009

Dedico este trabalho aos meus amores:

Aos meus pais, Justino e Heloísa, pelo
exemplo de caráter e amor;

Às minhas irmãs queridas, Fabiana, Fernanda
e Letícia, por me ensinarem a responsabilidade
e a buscar os meus objetivos;

Ao meu namorado, Eduardo, pelo apoio, amor
e por crescer junto comigo.

AGRADECIMENTOS

Nenhum resultado obtido nessa dissertação seria possível sem o apoio, os ensinamentos, a formação acadêmica, o apoio técnico e, sobretudo um bom ambiente de trabalho proporcionado por diversas pessoas que merecem muitos agradecimentos.

Agradeço à minha irmã Letícia por insistir tanto para que eu não seguisse a mesma profissão dela e à minha insistência em contrariá-la e me fazer ter certeza que era o que eu queria. Agradeço ao Rafael Soares por me dar uma luz e me trazer para fazer Iniciação Científica no Laboratório de Imunofarmacologia, além é claro, pela amizade. Agradeço àquele que me recebeu com muito ânimo, trabalho, informação, respeito e carinho para ser a sua IC, em 2006: o Remo, por todas as suas lições, ensinamentos das mais variadas técnicas, sobre fibrose, quimiocinas e inflamação, discussões de resultados, mesmo à distância, por me deixar louca de tanto trabalhar e descobrir que no fim do mestrado todo mundo surta. Agradeço ao meu orientador, Mauro Martins Teixeira, pelo apoio, incentivo e confiança no meu projeto, pelas esclarecedoras reuniões, pelos puxões de orelha, pelos emails “OK” e “Veja”, pela paciência, pelos elogios motivadores, pela ótima orientação. Agradeço ao Dr. Alexandre Machado pela colaboração, fornecimento dos vírus e células para titulação, pelas ajudas práticas no início do projeto, pelas discussões de resultados e sugestões de artigos. Agradeço ao Rodrigo, por todo o apoio nos experimentos, pelas sugestões, pelas discussões de resultados no Gmail, pela aleatoriedade-suja-criativa e pela boa companhia. Agradeço ao Caio, unanimidade de pessoa de boa vontade, inteligência e de bom coração, por tudo isso e pelas ajudas em experimentos e análises. Agradeço à Landa pela co-orientação, incentivo de tocar um novo projeto, por me ensinar a técnica que exige mais paciência: o Western Blot e por todas as sugestões. Agradeço ao Polidoro, pelas titulações, ajudas nos experimentos. Agradeço ao Geovanni, pelas análises histológicas e por toda a gentileza e educação. Agradeço ao Professor Ricardo Gazzinelli pela colaboração e por disponibilizar o laboratório para as titulações. Agradeço aos meus alunos ou “co-alunos” de IC e IC Júnior, Ricardo, pela grande ajuda com os experimentos e pela oportunidade de ensinar; à Lu, extremamente responsável, inteligente e disponível, obrigada pela ajuda com os animais, com o Western, e pelo que vem pela frente; à Bárbara, que ficou sob minha “guarda provisória” e também me ajudou bastante, obrigada pela dedicação e pela ótima convivência.

Além dessas pessoas que colaboraram diretamente com o projeto, não poderia deixar de agradecer a todos os colegas e amigos do Laboratório de Imunofarmacologia que, sempre

têm algo a ensinar, a acrescentar ou simplesmente ajudam para que os dias mais cansativos sejam mais leves. Agradeço à turminha do *Happy Hour*, pela diversão e também pelo aprendizado. Angélica, pessoa de coração enorme, sempre pronta a ajudar e a dar boas risadas, obrigada pelo carinho, dicas, caronas. Daniels, por toda a disponibilidade, carinho, abraços, risadas, dicas tecnológicas. Cristiano, pelas piadinhas, pela parceria de “Crisis” e também pelas caronas. À Katita, Livia, ao Flavão, Flopes, Lets, Dani Sachs, à Lucíola, Vivinha, Marina, Fernando, Silvana, Elisão, Maria Clara, Ciça, Tiago pelo convívio diário, pelo carinho e respeito. À turminha do Antônio e ao próprio, que me acolhem como “agregada”. Ao meu casal favorito do lab e companheiros de bandeirão, Marcinha e David, pela ótima companhia, risadas e ajudas em diversos momentos. À Nóris, gracinha de pessoa, animada e educada. À Aline, Vanessa Amaral, Débora, ao Vinícius, Izabela, Fernanda, Larissa, Roberta... À turminha da Dani, Mila, Zélia, Fernanda Ferraz, Gil. Muito obrigada à Dani Souza, por ceder a estrutura do seu laboratório, por sentar e discutir alguns resultados comigo, pelo incentivo e pela simpatia. Obrigada também à Vanessa, que me ensinou muito na época de iniciação científica. Val, a chefe-mor do lab, ótima pessoa, de futuro promissor e que ajuda a todos sempre que preciso. À Ilma, pelo apoio técnico, bombons, puxões de orelha. À Dora, pelo tratamento dos camundongos, pela educação.

Agradeço, em especial, à Érica, pela ajuda imensa com o FACS e com as análises e ao professor Ken pelo kit de anexina.

Agradeço aos meus amigos da Bio, principalmente aos picaretas; à turminha de Bases sempre amiga e fonte de ajudas, reagentes e dicas científicas em momentos diversos; aos colegas de Departamento; à Celise e Grazi pela simpatia e disponibilidade em ajudar; ao Gilmar e ao Elmo do CEBIO; aos professores da graduação e do curso de Bases que deram a base e muito conhecimento para a realização desse trabalho.

Agradeço aos professores Flávio Guimarães da Fonseca, Kenneth John Gollob e Fabiana Simão Machado por aceitarem participar da banca.

À CAPES, pelo suporte financeiro.

Aos meus pais, minhas irmãs e ao Dudu, por estarem sempre presentes na minha formação pessoal, fundamentais para o que hoje sou. Agradeço a todo o amor e compreensão nos momentos de stress e de experimentos até tarde e nos finais de semana.

Muito obrigada a todos!

“Não há nada permanente, exceto a mudança.”

Heráclitus

RESUMO

A gripe é uma doença respiratória de grande relevância mundial, por causar grande número de mortes e internações durante as epidemias e pandemias. Estratégias para o combate ao vírus Influenza enfrentam desafios, como o surgimento de linhagens resistentes a vacinas e antivirais. Sabe-se que respostas inflamatórias exacerbadas ao vírus são causas da grande morbidade associada à infecção. O Fator de Ativação Plaquetária – PAF é um mediador fosfolipídico com efeitos diretos em respostas inflamatórias, como transmigração e ativação leucocitária. O presente estudo avaliou o papel do receptor de PAF na infecção pelos subtipos do vírus Influenza H1N1 e H3N1. Para isso, foi padronizado um modelo de infecção murina com dois inóculos do vírus H1N1, 10^4 e 10^6 PFU e com o inóculo de 10^6 PFU do vírus H3N1. Camundongos PAFR KO e WT foram infectados pelos dois tipos de vírus e monitorados quanto à perda de peso e letalidade por 21 dias. Animais infectados pelo vírus H1N1 foram sacrificados no 5º ou 8º dia de infecção para monitoramento do recrutamento e ativação leucocitária, produção de citocinas e quimiocinas, carga viral, sobrevivência celular e lesão tecidual. O antagonista do receptor de PAF, PCA 4248, também foi utilizado durante a infecção pelo vírus H1N1 e avaliação de letalidade, perda de peso e parâmetros inflamatórios. Os resultados mostraram que o desenvolvimento dos sinais associados à doença é progressivo e dependente do inóculo e subtipo viral utilizados. O vírus H1N1, mais patogênico, provocou um intenso infiltrado neutrofilico nas vias aéreas e pulmões, edema pulmonar, lesão tecidual e grande produção de citocinas pró-inflamatórias. Animais PAFR KO foram protegidos da letalidade e perda de peso causados pelo vírus H1N1 e H3N1, em relação ao grupo WT. O antagonista PCA conferiu proteção semelhante contra H1N1 à encontrada em animais PAFR KO. A proteção esteve relacionada à redução no recrutamento de neutrófilos para as vias aéreas, no extravasamento protéico e danos pulmonares. Nos animais PAFR KO houve ainda, aumento de células NK e NKT, mas menor produção de citocinas relacionadas à ativação destas células; menor desativação de fagócitos, níveis elevados de apoptose no pulmão, carga viral igual ou menor. A ausência de PAFR manteve a resposta adaptativa à reinfeção. Conclui-se que PAFR possui, então, papel fundamental na patogênese da gripe e pode representar um alvo terapêutico para a contenção da inflamação associada à infecção.

Palavras-chave: PAF, influenza, inflamação, neutrófilo, edema, NK

ABSTRACT

Flu is a respiratory illness of great global relevance, as it causes large number of hospitalizations and deaths during epidemics and pandemics. Strategies to combat the Influenza virus face challenges such as the emergence of strains resistant to vaccines and antiviral drugs. It is known that exacerbated inflammatory responses to the virus are causes of morbidity associated with infection. The Platelet Activation Factor – PAF is a phospholipid mediator with direct effects on inflammatory responses such as leukocyte activation and transmigration. This study evaluated the role of PAF receptor during infection by H1N1 and H3N1 influenza virus subtypes. To this purpose, a murine model of infection was determined with two inocula of H1N1 virus, 10^4 and 10^6 PFU and the inoculum of 10^6 PFU of the virus H3N1. PAFR KO and WT mice were infected by the two subtypes of virus and had weight loss and lethality monitored for 21 days. Animals infected with H1N1 virus were sacrificed at 5 or 8 days of infection to verify the recruitment and leukocyte activation, production of cytokines and chemokines, viral load, cell survival and tissue injury. The PAF receptor antagonist, PCA 4248, was also used during H1N1 virus infection and evaluation of lethality, weight loss and inflammatory parameters. The results showed that the development of the signs associated with the disease is progressive and dependent on the inoculum and viral strain used. The H1N1 virus, more pathogenic, caused an intense neutrophilic infiltrate into the airways and lungs, pulmonary edema, tissue injury and high production of proinflammatory cytokines. PAFR KO animals were protected from lethality and weight loss caused by H1N1 and H3N1 viruses compared to WT. The PAFR antagonist PCA provided similar protection to the PAFR KO mice against H1N1 infection. The protection was related to the reduction in neutrophils recruitment to the airways, in protein leakage and lung damage. There was also an increase in NK and NKT cells, but lower production of cytokines related to activation of the same, less deactivation of phagocytes, higher levels of apoptosis in the lungs, similar or greater viral clearance. The absence of PAFR kept the adaptive response to reinfection. Thus we conclude that PAFR has a crucial role in the pathogenesis of influenza and may represent a therapeutic target to control inflammation associated with infection.

Keywords: PAF, influenza, inflammation, neutrophil, edema, NK

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- Estrutura dos vírus Influenza A e elétron micrografia em contraste negativo de partículas de Influenza A	26
FIGURA 2- Distribuição por hospedeiro dos diferentes subtipos de Hemaglutinina e Neuraminidase	28
FIGURA 3- Transmigração neutrofílica dos capilares alveolares para o interstício e em seguida para o lúmen alveolar durante a inflamação pulmonar	45
FIGURA 4- Estrutura do antagonista do receptor de PAF, PCA 4248	51
FIGURA 5- Fórmula estrutural do Fosfato de Oseltamivir	52
FIGURA 6- Determinação das regiões referentes às populações leucocitárias analisadas nos pulmões e no BAL	56
FIGURA 7- Exemplificação do método empregado para determinação das frequências das subpopulações avaliadas	57
FIGURA 8- Determinação de populações de células apoptóticas utilizando o método de Anexina V	59
FIGURA 9- Esquema representativo de hematócrito	64
FIGURA 10- Letalidade e perda de peso observadas após infecção com os inóculos de 10^3 , 10^4 , 10^5 e 10^6 PFU do vírus Influenza A/WSN/33 H1N1	74
FIGURA 11- Perda de peso, aumento nos níveis de hematócrito e nos níveis de proteínas totais no lavado broncoalveolar observados após a infecção pelo vírus Influenza A/WSN/33 H1N1 nos inóculos de 10^4 PFU e 10^6 PFU	75
FIGURA 12- Recrutamento de leucócitos totais, células mononucleares e neutrófilos para o espaço alveolar observados após a infecção pelo vírus Influenza A/WSN/33 H1N1 nos inóculos de 10^4 PFU e 10^6 PFU	76

FIGURA 13- Medida indireta do recrutamento de neutrófilos e macrófagos para os pulmões após a infecção pelo vírus Influenza A/WSN/33 H1N1 nos inóculos de 10^4 PFU e 10^6 PFU	77
FIGURA 14- Níveis da quimiocina CXCL1 no BAL e nos pulmões; da quimiocina CXCL2 no BAL e nos pulmões; da quimiocina CCL2 nos pulmões e da citocina TNF- α nos pulmões de animais infectados com 10^4 PFU do vírus Influenza A/WSN/33 H1N1	79
FIGURA 15- Níveis da quimiocina CXCL1 no BAL e nos pulmões; da quimiocina CXCL2 no BAL e nos pulmões; da quimiocina CCL2 nos pulmões, da citocina TNF- α nos pulmões e da citocina IL-6 nos pulmões e no soro de animais infectados com 10^6 PFU do vírus Influenza A/WSN/33 H1N1	80/81
FIGURA 16- Cortes histológicos representativos de seções de pulmões de camundongos não infectados (Mock) e de camundongos infectados com 10^4 PFU do vírus Influenza A/WSN/33 H1N1 após 4 e 10 dias de infecção e de camundongos infectados com 10^6 PFU do vírus Influenza A/WSN/33 H1N1, após 3 e 5 dias de infecção.	81-83
FIGURA 17- Letalidade provocada pelo vírus Influenza A/WSN/33 H1N1 em camundongos WT e PAFR KO infectados com 10^4 e 10^6 PFU, observada por 21 dias	86
FIGURA 18- Acúmulo de proteínas totais no BAL 5 dias após infecção com 10^6 PFU do vírus Influenza A H1N1 e após 8 dias de infecção com 10^4 PFU do mesmo vírus	86
FIGURA 19- Recrutamento de leucócitos totais, células mononucleares e neutrófilos para o espaço alveolar observados após a infecção pelo vírus Influenza A/WSN/33 H1N1 em camundongos WT e PAFR KO no inóculo de 10^6 PFU após 5 dias de infecção e após 8 dias de infecção com o inóculo de 10^4 PFU	87
FIGURA 20- Níveis de Mieloperoxidase e N-acetilglicosaminidase nos pulmões após 5 dias de infecção com 10^6 PFU e após 8 dias de infecção com 10^4 PFU do vírus Influenza A H1N1	88

FIGURA 21- Níveis das citocinas IL-1 β , IL-6 e da quimiocina CXCL1 após 5 dias de infecção com 10 ⁶ PFU e após 8 dias de infecção com 10 ⁴ PFU do vírus Influenza A H1N1	90
FIGURA 22- Cortes histológicos representativos de seções de pulmões de camundongos não infectados WT (A, B), PAFR KO (C, D) e de camundongos infectados WT (E, F) e PAFR KO (G, H) com 10 ⁶ PFU do vírus Influenza A/WSN/33 H1N1, após 5 dias de infecção... ..	91/92
FIGURA 23- Título viral nos pulmões de animais infectados com 10 ⁶ PFU do vírus Influenza A H1N1 após 5 dias de infecção e nos pulmões de animais infectados com 10 ⁴ PFU, após 8 dias de infecção	92
FIGURA 24- Número de leucócitos totais, neutrófilos, linfócitos e macrófagos apoptóticos (Anexina V + PI-) recolhidos das vias aéreas após 5 dias de infecção com o inóculo de 10 ⁶ PFU do vírus Influenza A/WSN/33 H1N1	94
FIGURA 25- Número absoluto de células do espaço alveolar de animais WT e PAFR KO não infectados ou infectados com 10 ⁶ PFU do vírus Influenza A/WSN/33 H1N1, após 5 dias de infecção – linfócitos CD3+ CD4+, linfócitos CD3+ CD8+, células NK NK1.1+ CD3-, células NKT NK1.1+ CD3+, macrófagos F4/80+ e F4/80+ CCR5+, granulócitos GR1+ e neutrófilos GR1+ CXCR2+	97
FIGURA 26- Populações de células extraídas dos pulmões de animais WT e PAFR KO não infectados ou infectados com 10 ⁶ PFU do vírus Influenza A/WSN/33 H1N1, após 5 dias de infecção – linfócitos CD3+ CD4+, linfócitos CD3+ CD8+, células NK NK1.1+ CD3-, células NKT NK1.1+ CD3+, macrófagos F4/80+ e F4/80+ CCR5+, granulócitos GR1+ e neutrófilos GR1+ CXCR2+	98
FIGURA 27- Níveis de IL-2, IL-12/IL-23 P40, CCL5 e IFN- γ nos pulmões de camundongos não infectados ou após 1, 3 e 5 dias de infecção com 10 ⁶ PFU do vírus Influenza A/WSN/33 H1N1	99

FIGURA 28- Níveis de IL-2, IL-12/IL-23 P40, CCL5 e IFN- γ nos pulmões de camundongos WT e PAFR KO não infectados ou após 5 dias de infecção com 10^6 PFU do vírus Influenza A/WSN/33 H1N1	100
FIGURA 29- Padrões de quimioluminescência dependente de luminol induzida por Zimosan em células pulmonares de camundongos WT e PAFR KO, não infectados ou infectados com 10^6 PFU do vírus Influenza A/WSN/33 H1N1	101/102
FIGURA 30- Letalidade associada à infecção por dois inóculos do vírus Influenza A/WSN/33 H1N1, 10^4 e 10^6 PFU, em animais tratados com o antagonista do receptor de PAF, PCA 4248, ou tratados com veículo; perda de peso após a infecção com 10^4 PFU de animais tratados com PCA ou com veículo	105
FIGURA 31- Recrutamento de leucócitos totais, de mononucleares e de neutrófilos para o BAL; recrutamento de neutrófilos para os pulmões; níveis de proteínas totais no BAL; título viral nos pulmões de animais infectados com 10^6 PFU, tratados com PCA ou com veículo e sacrificados após 5 dias de infecção	106
FIGURA 32- Níveis das citocinas IL-1 β , TNF- α e IL-6 nos pulmões, de IL-6 no soro e das quimiocinas CCL2 e CCL5 nos pulmões de animais não infectados ou infectados com 10^6 PFU tratados com veículo ou com o antagonista de PAFR, PCA 4248, após 5 dias de infecção	108
FIGURA 33- Letalidade de camundongos infectados com 10^6 PFU tratados com veículo, PCA 4248, com o antiviral Tamiflu ou com a combinação de PCA e Tamiflu	110
FIGURA 34- Recrutamento de leucócitos totais, de mononucleares e de neutrófilos para o BAL; recrutamento de neutrófilos para os pulmões e título viral nos pulmões após 5 dias de infecção com 10^6 PFU em animais tratados com PCA, Tamiflu ou PCA e Tamiflu ou com veículo	111

FIGURA 35- Perda de peso e letalidade associadas à infecção pelo vírus Influenza A (equine/Cordoba/18/1985 - Yamagata/32/1989) H3N1 nos inóculos de 10^3 , 10^4 , 10^5 e 10^6 PFU	114
FIGURA 36- Perda de peso, níveis de hematócrito, níveis de proteínas totais no lavado broncoalveolar, recrutamento de leucócitos totais, células mononucleares e neutrófilos para o espaço alveolar e de neutrófilos para os pulmões observados após a 5 dias de infecção pelos vírus Influenza A/WSN/33 H1N1 e equine/Cordoba/18/1985 - Yamagata/32/1989 H3N1 no inóculo de 10^6 PFU	115
FIGURA 37- Perda de peso (a) e letalidade (b) causadas pela infecção por 10^6 PFU do vírus H3N1 em camundongos selvagens e deficientes no receptor de PAF	116

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- Marcações utilizadas para análise das populações leucocitárias nos pulmões e nas vias aéreas por citometria de fluxo	56
TABELA 2- Níveis das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α nos pulmões camundongos não infectados (Mock) ou infectados com 10^6 PFU, no quinto dia de infecção; ou infectados com 10^4 PFU, no oitavo dia de infecção pelo vírus Influenza A/WSN/33 H1N1	89
TABELA 3- Níveis das quimiocinas CXCL1 e CXCL2 nos pulmões camundongos não infectados (Mock) ou infectados com 10^6 PFU, no quinto dia de infecção; ou infectados com 10^4 PFU, no oitavo dia de infecção pelo vírus Influenza A/WSN/33 H1N1	89
TABELA 4- Níveis das citocinas IL-1 β , TNF- α e IL-6 nos pulmões e de IL-6 no soro de camundongos não infectados (Mock) ou infectados com 10^6 PFU do vírus Influenza A/WSN/33 H1N1 e tratados com PCA 4248 ou com veículo	107
TABELA 5- Níveis das quimiocinas CXCL1, CCL2, CCL3 e CCL5 nos pulmões e no BAL de camundongos não infectados (Mock) ou infectados com 10^6 PFU do vírus Influenza A/WSN/33 H1N1 e tratados com PCA 4248 ou com veículo	107

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA: análise de variância

AnV: Anexina V

ARDS: *Acute Respiratory Distress Syndrome* – síndrome da angústia respiratória aguda

BAL: *Bronchoalveolar Lavage* – lavado broncoalveolar

BSA: *Bovine Serum Albumin* – soro albumina bovina

C57BL/6J: linhagem de camundongos *C57 black 6J*

CCL(): *Chemokine (CC motif) Ligand ()* – quimiocina ligante () com motivo CC

CCR (): *Chemokine (C-C motif) Receptor ()* – receptor () de quimiocinas com motivo CC

CD (): *Cluster of Differentiation ()* – Agrupamento de diferenciação ()

CETEA: Comitê de Ética em Experimentação Animal

CO₂: dióxido de carbono

COX: cicloxigenase

CXCL (): *Chemokine (CXC motif) Ligand ()* – quimiocina ligante () com motivo CXC

CXCR (): *Chemokine (CXC motif) Receptor ()* receptor () de quimiocinas com motivo CXC

DAG: Diacilglicerol

DC: *Dendritic Cell* – célula dendrítica

DL-50: Dose Letal que representa a letalidade de 50% da população estudada

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

DTT: *dithiothreitol*

EDTA: *EthyleneDiamineTetracetic acid* - ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA: *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

EPM: erro padrão da média

EUA: Estados Unidos da América

FACS: *Fluorescence-Activated Cell Sorting*

FITC: *Fluorescein Isothiocyanate*

HA ou H(): Hemaglutinina

HEF: Esterase-Hemaglutinina de Fusão

HEPES/NaOH: *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethanesulphonic acid / sodium hydroxide*

ICAM-I: *Intercellular adhesion molecule-I* – molécula de adesão intercelular-I

IFN-(): Interferon

IgA: Imunoglobulina A

IgG: Imunoglobulina G

IgM: Imunoglobulina M

IL-(): interleucina-()

IP-10: *IFN-inducible protein 10* – proteína 10 induzível por IFN

IRF: *IFN regulator factor* – Fator regulador de IFN

KC: *Keratinocyte Chemokine*

KDa: quilo Dáton

KO: *Knock Out* – animais nocaute

LAIV: Vacina de Vírus Influenza Vivo Atenuado

M: molar

M1: Proteína de Matriz 1

mÅ: miliAmpere

MCP-(): *Monocyte chemotactic protein-()*

MDCK: *Madin-Darby Canine Kidney Cells*

mg: miligrama

mg/kg: miligramas por quilograma

mg/mL: miligramas por mililitro

mL: mililitro

mm: milímetro

mM: milimolar

MIP-(): *Macrophage Inflammatory Protein-()*

Mock: grupo controle, não infectado

MPO: Mieloperoxidase

n: número de observações

NA ou N(): Neuraminidase

NaCl: Cloreto de Sódio

NADPH: *Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*

NAG: N-acetil-glicosaminidase

NCRI: *Natural cytotoxicity triggering receptor 1* (NKp46)

NEP ou NS2: *Nuclear exporting protein* – proteína de exportação nuclear

NF-κB: *Nuclear Factor kappa B*

ng/mL: nanograma/mililitro

NK: *Natural Killer* – células matadoras naturais

NKT: *Natural Killer T cell* - células T matadoras naturais

NLRP3: *Nucleotide-binding domain and Leucine-rich-Repeat-containing protein 3*

nm: nanômetro

NP: nucleoproteína

NP-40: *nonyl phenoxypolyethoxylethanol-40*

NS1: *non-structural-1* – Proteína não-estrutural 1

OD: *Optical Density* – densidade ótica

OPD: *o-phenylenediamine dihydrochloride*

PAF: *Platelet Activating Factor* – Fator de Ativação Plaquetária

PAFR: *Platelet Activating Factor Receptor* – Receptor do Fator de Ativação Plaquetária

PAMP: *Pathogen Associated Molecular Pattern* – Padrão molecular associado a patógenos

PBS: *Phosphate-Buffered Saline*

PCA 4248: *[2-(phenylthio)ethyl-5-methoxycarbonyl- 2,4,6- trimethyl-1,4-dihydropyridine-3-carboxylate]* – antagonista do PAFR

PE: *Phycoerythrin* - ficoeritrina

PFU: *Plaque-Forming Unit* – unidade formadora de placas

pH: potencial hidrogeniônico

PI: *Propidium iodide* – iodeto de Propídio

PIP₃: Inositol Trifosfato

PKC: *Protein Kinase C* – proteína cinase C

PL(): *PhosphoLipase ()* – fosfolipase ()

PMSF: *phenylmethylsulphonyl fluoride*

p/v: porcentagem entre peso do soluto e o volume da solução

RANTES: *Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted*

RIG-I: *Retinoic acid Inducible Gene-I*

RLU: *Relative Luminescence Units*

RNA: ácido ribonucleotídico

RPM: rotações por minuto

RPMI 1640: meio de cultura desenvolvido no *Roswell Park Memorial Institute*

SDS-PAGE: *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

TCR: *T cell receptor* – receptor da célula T

TIV: Vacina inativada trivalente

TLR(): *Toll like receptor* – receptor do tipo Toll

TMB: tetrametilbenzidina

TNF- α : *Tumor Necrosis Factor alpha* – fator de necrose tumoral alfa

Tris/HCl: tampão tris hidroximetil aminometano com ácido clorídrico

VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor*

A/WSN/33: *Wilson Smith Neuroadapted 1933*; vírus influenza A H1N1 isolado em 1933 por Wilson Smith neuroadaptado a camundongos

WT: *Wild Type* – animal selvagem

WHO: *World Health Organization* – Organização Mundial de Saúde (OMS)

μg : micrograma

μL : microlitro

$\mu\text{g/mL}$: micrograma por mililitro

μm : micrômetro

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	24
1.1 – O VÍRUS INFLUENZA	25
1.1.1 – Classificação	25
1.1.2 – Morfologia e estrutura genética do vírus Influenza A	26
1.1.3 – Hospedeiros	27
1.2 – EPIDEMIAS E PANDEMIAS	29
1.2.1 – Gripe espanhola	30
1.2.2 – Gripe aviária	31
1.2.3 – Gripe suína	31
1.3 – A GRIPE E A RESPOSTA IMUNE CONTRA O VÍRUS	33
1.3.1 – Histopatologia e modelos animais	33
1.3.2 – A entrada do vírus no organismo e a resposta imune inata	34
1.3.3 – A resposta imune adaptativa ao vírus Influenza	37
1.4 – PROFILAXIA E TRATAMENTO DA GRIPE	38
1.4.1 – Vacinas	38
1.4.2 – Antivirais	39
1.4.3 – Outros alvos de tratamento	40
1.5 – O FATOR DE ATIVAÇÃO PLAQUETÁRIA	41

1.5.1 – O receptor do Fator de Ativação Plaquetária	42
1.5.2 – PAF e infecções virais	43
1.5.3 – PAF e os pulmões	43
1.5.4 – PAF e a transmigração neutrofílica nos pulmões	44
2 – OBJETIVOS	46
2.1 – OBJETIVO GERAL	47
2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
3 – MATERIAL E MÉTODOS	49
3.1 – ANIMAIS	50
3.2 – VÍRUS	50
3.3 – CÉLULAS	51
3.4 – FÁRMACOS	51
3.5 – MODELO EXPERIMENTAL DE INFECÇÃO PELO VÍRUS INFLUENZA A/WSN/33 H1N1	52
3.5.1 – Infecção intranasal	52
3.5.2 – Padronização da DL-50	52
3.5.3 – Cinética da resposta inflamatória	53
3.5.3.1 – Inóculos e tempos de observação	53
3.5.4 – Infecção em camundongos deficientes no receptor de PAF	53
3.5.4.1 – Letalidade	53
3.5.4.2 – Comparação da resposta inflamatória e combate ao vírus	53

3.5.4.3 – <i>Análise do perfil celular por citometria de fluxo (FACS)</i>	54
3.5.4.4 – <i>Análise da atividade respiratória induzida por Zimosan</i>	58
3.5.4.5 – <i>Análise da sobrevivência celular por ensaio de Anexina V</i>	58
3.5.5– Reinfecção	60
3.5.6– Tratamento com o antagonista do receptor de PAF, PCA 4248	60
3.5.6.1 – <i>Letalidade</i>	60
3.5.6.2 – <i>Resposta inflamatória e combate ao vírus</i>	60
3.5.6.3 – <i>Combinação com o inibidor de Neuraminidase Fosfato de Oseltamivir (Tamiflu®)</i>	61
3.6 – MODELO EXPERIMENTAL DE INFECÇÃO PELO VÍRUS INFLUENZA A (EQUINE/CORDOBA/18/1985 - YAMAGATA/32/1989) H3N1	62
3.6.1 – Adaptação do vírus H3N1 a camundongos	62
3.6.2 – Determinação do inóculo letal	62
3.6.3 – Resposta inflamatória	62
3.6.4 – Infecção em camundongos deficientes no receptor de PAF	63
3.7 – SACRIFÍCIO E COLETA DE TECIDOS	63
3.8 – ENSAIOS E ANÁLISES COM TECIDOS	64
3.8.1 – Análise do índice de hematócrito	64
3.8.2 – Contagem total e diferencial de células	65
3.8.3 – Dosagem de proteínas totais no lavado broncoalveolar (BAL)	65

3.8.4 – Processamento dos pulmões para ensaios de Mieloperoxidase (MPO), N-acetilglicosaminidase (NAG) e ELISA	66
3.8.5 – Ensaio de MPO	66
3.8.6 – Ensaio de NAG	67
3.8.7 – Ensaio de ELISA	67
3.8.8 – Titulação viral	68
3.8.9 – Histologia	69
3.9 – ANÁLISES ESTATÍSTICAS	70
4 – RESULTADOS	71
4.1 – MODELO EXPERIMENTAL DE INFECCÃO PELO VÍRUS INFLUENZA A/WSN/33 H1N1	72
4.1.1 – Padronização da DL-50	72
4.1.2 – Cinética da resposta inflamatória	72
4.2 – PAPEL DO RECEPTOR DE PAF NA INFECCÃO PELO VÍRUS INFLUENZA A/WSN/33 H1N1	83
4.2.1 – Letalidade	83
4.2.2 – Comparação da resposta inflamatória e do combate ao vírus	83
4.2.3 – Análise da sobrevivência celular	93
4.2.4 – Análise do perfil celular por citometria de fluxo (FACS)	95
<i>4.2.4.1 – Análise de citocinas e quimiocinas relacionadas à atividade de células NK</i>	96

4.2.5 – Perfil de ativação celular	101
4.2.6 – Reinfecção	103
4.2.7 - Tratamento com o antagonista do receptor de PAF, PCA 4248	103
4.2.7.1 – Combinação com o inibidor de Neuraminidase Fosfato de Oseltamivir (Tamiflu[®])	109
4.3 – MODELO EXPERIMENTAL DE INFEÇÃO PELO VÍRUS INFLUENZA A (EQUINE/CORDOBA/18/1985 - YAMAGATA/32/1989) H3N1.....	112
4.3.1 – Determinação do inóculo letal	112
4.3.2 – Comparação da resposta inflamatória	112
4.3.3 - Infecção em camundongos deficientes no receptor de PAF	113
5 – DISCUSSÃO	117
5.1 – DISCUSSÃO	118
5.2 –CONCLUSÃO	127
6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	128

1 - Introdução e Revisão da Literatura

1.1 – O VÍRUS INFLUENZA

1.1.1 – Classificação

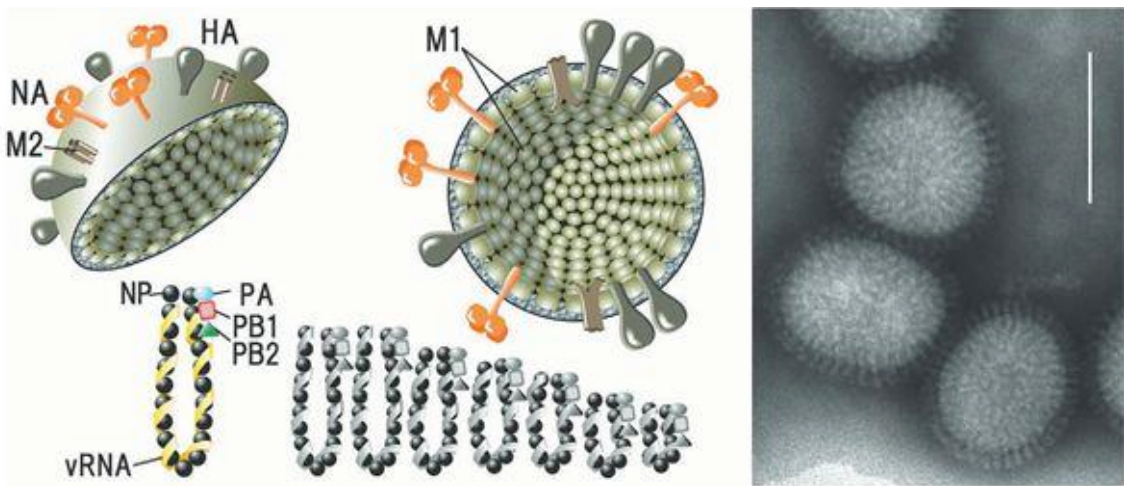
A família Orthomyxoviridae (do grego, orthos – correto e myxa – muco) é composta por cinco gêneros de vírus envelopados, com genoma segmentado em uma fita simples de RNA em senso negativo: Influenza A, Influenza B, Influenza C, Thogotovírus e o recém adicionado Isavírus. O envelope dos vírions, derivado de lipídios da membrana celular do hospedeiro, contém um número variável de glicoproteínas – de 1 a 3 – e proteínas não glicosiladas – uma a duas. Tal classificação dos gêneros é feita, principalmente, por diferenças entre as seqüências codificadoras das proteínas do nucleocapsídeo e da matriz, bem como pela composição do material genético (KAWAOKA *et al.*, 2005).

Os três gêneros Influenza – A, B e C – podem ser distinguidos entre si de acordo com a seqüência codificadora das nucleoproteínas e das proteínas da matriz, assim como pelo número de segmentos gênicos que possuem. Enquanto o gênero Influenza C possui apenas sete segmentos de RNA, os gêneros A e B possuem oito segmentos. Quanto às glicoproteínas de superfície, que são os principais determinantes antigênicos desses vírus, os gêneros A e B possuem duas – a Hemaglutinina (HA) e a Neuraminidase (NA) – e o gênero C possui apenas a glicoproteína Esterase-Hemaglutinina de Fusão (HEF). Embora todos os vírus Influenza possam infectar seres humanos, apenas o gênero Influenza A causa pandemias e possui um grande número de subtipos (CHEUNG e POON, 2005; KAWAOKA *et al.*, 2005).

Os vírus Influenza A são classificados em diferentes subtipos com base em diferenças sorológicas e na variação antigênica de suas glicoproteínas de superfície, sendo que, até o momento, já foram identificados dezesseis tipos de Hemaglutinina, H1-H16, e nove tipos de Neuraminidase, N1-N9. Todos os subtipos já encontrados podem ser isolados de aves aquáticas, seus hospedeiros naturais. A última subdivisão, em linhagens, correlaciona-se com o surgimento de variantes dos subtipos devido a mutações, isolados em diversos hospedeiros e com distintas antigenicidades (CHEUNG e POON, 2005; BOUVIER e PALESE, 2008).

1.1.2 – Morfologia e estrutura genética do vírus Influenza A

Os vírus Influenza A são esféricos ou filamentosos, medindo de 10 a 300 nm; são formados por 10 proteínas, um envelope lipídico e oito segmentos de RNA fita simples, senso negativo. Dentre essas proteínas, três estão inseridas no envelope lipídico: o tetrâmero da proteína integral M2, que atua como um canal iônico para controle do pH viral; e as glicoproteínas Hemaglutinina e Neuraminidase que se projetam na superfície do vírion. A HA, principal antígeno do vírus Influenza e responsável pela fusão à célula infectada, apresenta-se na forma trimérica em uma proporção de quatro para cada NA, que, por sua vez tem forma tetraédrica e possui atividade de sialidase para a liberação dos novos vírions da célula hospedeira. A proteína M1, ou proteína de matriz, é recoberta pelo envelope e determina a camada interna ou o *core* do vírion. Na camada interna é encontrada a proteína de exportação nuclear (NEP ou NS2) e o complexo ribonucleoprotéico, formado pelos segmentos de RNA cobertos pela nucleoproteína (NP) e pelas RNA polimerases PA, PB1 e PB2. Além dessas proteínas estruturais, existe a proteína não-estrutural 1 (NS1) relacionada à regulação da expressão gênica do vírus e da célula hospedeira (CHEUNG e POON, 2005; BOUVIER e PALESE, 2008). A figura 1 esquematiza a organização dos componentes do vírus Influenza A.



Adaptado de Kawaoka *et al.*, 2005

Figura 1: Estrutura dos vírus Influenza A e elétrons micrografia em contraste negativo de partículas de Influenza A. A barra representa 100 nm.

Por apresentar o genoma segmentado, o vírus Influenza A é susceptível à ocorrência da troca gênica (*antigenic shift*), ou rearranjo, a qual ocorre durante uma co-infecção de dois subtipos de vírus. Na co-infecção, um segmento que codifica, por exemplo, a Hemaglutinina, é trocado pelo segmento que codifica a glicoproteína de outro subtipo de vírus, formando um terceiro subtipo de Influenza (BOUVIER e PALESE, 2008; HAMPSON e MACKENZIE, 2006). Outra forma comum de variação antigênica que ocorre nos gêneros Influenza A e B é a flutuação antigênica (*antigenic drift*), devido a pequenas substituições de aminoácidos na HA ou na NA após eventos de mutações (CHEN e DENG, 2009). Enquanto a primeira forma de variação antigênica permite que subtipos encontrados em hospedeiros silvestres sejam adaptados a novos hospedeiros, criando a possibilidade do surgimento de pandemias altamente patogênicas, a segunda representa a causa da necessidade de formulações anuais de vacinas contra a gripe, pois permite o surgimento de novas linhagens do vírus (BONI, 2008; HAMPSON e MACKENZIE, 2006; COX e SUBBARAO, 1999).

1.1.3 – Hospedeiros

Os vírus Influenza infectam diversos animais, incluindo os seres humanos, suínos, eqüinos, mamíferos marinhos e aves. As aves aquáticas silvestres são o reservatório de todos os subtipos de Influenza A, sendo que nesses animais a infecção é, na maioria das vezes, assintomática. Todavia, algumas linhagens do vírus são capazes de produzir infecções sistêmicas fatais em aves, como os isolados dos subtipos H5 e H7. Nas aves portadoras, o vírus Influenza replica nas células do trato intestinal e é liberado nas suas fezes, em elevadas concentrações. Dessa maneira, as águas de lagos em que as aves habitam tornam-se um grande reservatório de vírus, permitindo assim que esses vírus possam infectar outras aves e causar doença. Aves jovens são mais susceptíveis à doença, assim como aves domésticas que entram em contato com água contaminada. Vírus aviários possuem capacidade limitada de replicar em humanos. Nos suínos, pelo contrário, o epitélio traqueal possui dois tipos de receptores para a entrada do vírus Influenza: o ácido siálico com ligação α -2-3 à galactose e o ácido siálico com ligação α -2-6, altamente susceptíveis à infecção pelos vírus aviários e pelos vírus de humanos, respectivamente. Acredita-se que os porcos sejam o reservatório e local de rearranjos gênicos desses vírus, representando fontes de novos vírus Influenza A com

potencial pandêmico. Nesses animais, comumente são encontrados os subtipos H1N1 e H3N2, os mesmos subtipos mais comumente circulantes entre os seres humanos (COX e SUBBARAO, 1999; WEBSTER *et al.*, 1992; WIDJAJA *et al.*, 2004; WEBBY e WEBSTER, 2003).

As tabelas abaixo (Figura 2) mostram a distribuição de subtipos de Hemaglutinina e Neuraminidase em diversos hospedeiros. É possível perceber que as aves apresentam todos os subtipos dessas glicoproteínas e que, por outro lado, a infecção em humanos se dá principalmente por quatro subtipos de HA – H1, H2, H3 e H5 – e a dois subtipos de NA – N1 e N2 (LIU *et al.*, 2009).

Table 3. Host distribution of 14328 influenza A viruses with HA sequences in GenBank*

	Birds	Humans	Pigs	Horses	Others
H1	71	<i>1994</i>	<i>311</i>	0	1
H2	77	84	2	0	0
H3	<i>215</i>	<i>6868</i>	<i>179</i>	<i>154</i>	9
H4	129	0	2	0	1
H5	<i>2120</i>	<i>240</i>	11	0	<i>27</i>
H6	<i>374</i>	0	0	0	0
H7	<i>446</i>	6	0	12	2
H8	12	0	0	0	0
H9	<i>759</i>	7	34	0	0
H10	58	0	0	0	0
H11	65	0	0	0	0
H12	24	0	0	0	0
H13	14	0	0	0	1
H14	3	0	0	0	0
H15	6	0	0	0	0
H16	10	0	0	0	0

*The presumably predominant HA subtypes circulating in the hosts were in bold and italics.
doi:10.1371/journal.pone.0005022.t003

Table 4. Host distribution of 7836 influenza A viruses with NA sequences in GenBank*

	Birds	Humans	Pigs	Horses	Others
N1	<i>1602</i>	<i>1285</i>	<i>188</i>	0	<i>25</i>
N2	<i>1167</i>	<i>2617</i>	<i>183</i>	0	0
N3	187	1	4	0	0
N4	25	0	0	0	1
N5	58	0	0	0	0
N6	124	0	1	0	0
N7	68	2	1	3	1
N8	147	0	0	<i>74</i>	3
N9	68	0	0	0	1

*The presumably predominant NA subtypes circulating in the hosts were marked with in bold and italics.
doi:10.1371/journal.pone.0005022.t004

Retirado de Liu *et al.*, 2009

Figura 2: Distribuição por hospedeiro dos diferentes subtipos de Hemaglutinina (Table 3) e Neuraminidase (Table 4).

1.2 – EPIDEMIAS E PANDEMIAS

Dentre os diversos subtipos de vírus Influenza A, apenas os subtipos H1N1, H2N2 e H3N2 são os causadores de surtos e epidemias anuais (COX e SUBBARAO, 1999; BOUVIER e PALESE, 2008). Segundo a Organização Mundial de Saúde, a definição de surto ou epidemia de uma determinada doença é: “A ocorrência de casos da doença excedendo o que seria normalmente esperado em uma comunidade, área geográfica ou estação. Um surto pode ocorrer em uma área geográfica restrita, ou pode estender-se por alguns países. Pode durar alguns dias ou semanas, ou alguns anos.” (http://www.who.int/topics/disease_outbreaks/en/). Surtos ou epidemias anuais de gripe ocorrem mundialmente, relacionados às estações frias do ano no hemisfério norte, enquanto em regiões tropicais o período de aparecimento da doença é mais extenso (BEIGEL, 2008). Havendo transmissão continuada de pessoa para pessoa com grande abrangência geográfica, o termo utilizado é o de epidemia (BOUVIER e PALESE, 2008). A diferença entre a epidemia e a pandemia, no caso da gripe, não é baseada necessariamente na gravidade da doença e no número de óbitos causados, e sim, na distribuição de casos graves em diferentes faixas etárias: jovens apresentam um risco 20 vezes maior de mortalidade causada por pandemias do que epidemias de Influenza, enquanto idosos com mais de 65 anos enfrentam os mesmos riscos de complicações que os ocorridos devido à gripe sazonal (COX e SUBBARAO, 1999).

As epidemias anuais de gripe são causadas por vírus que sofreram mutações nas proteínas HA e/ou NA, de tal forma que os anticorpos gerados durante as infecções anteriores ou vacinações não são mais capazes de reconhecer e neutralizar as novas variantes de influenza (COX e SUBBARAO, 1999). Dentre as doenças cuja prevenção é possível através de vacinas, a chamada gripe sazonal representa a maior causa anual de morte, aproximadamente 250 mil a 500 mil mortes no mundo (NICHOL e TREANOR, 2006). Formulações anuais de vacinas contra os subtipos causadores das epidemias anuais são direcionadas para parcelas da população consideradas de alto risco, como idosos, que apresentam as maiores taxas de mortalidade decorrentes de gripes (FLEMING, 2001).

O primeiro relato de pandemia causada pelo vírus Influenza data de 1580, iniciou-se na Ásia e se espalhou pela Europa, África e Américas (GARCÍA-GARCÍA e RAMOS, 2006).

Após a gripe espanhola em 1918, novas pandemias ressurgiram em 1957, 1968 e 1977 com outros subtipos de vírus causadores, respectivamente H2N2, H3N2 e H1N1 novamente. Em 2001, a Organização Mundial de Saúde criou a Agenda Global para o Monitoramento e Controle da Influenza com objetivos de aperfeiçoar técnicas de diagnósticos, produção de vacinas e ampliar o conhecimento sobre o risco de um novo surto pandêmico (WEBBY e WEBSTER, 2003).

1.2.1 – Gripe espanhola

Em 1918 ocorreu a maior pandemia de gripe já registrada, conhecida como gripe espanhola que causou a morte de cerca de 40 milhões de pessoas no mundo, grande parte dessas pessoas, adultos saudáveis. Estima-se que aproximadamente um terço da população mundial tenha sido infectada e apresentou sintomas da doença durante a pandemia (FROST, 1920 *apud* TAUBENBERGER *et al.*, 2001). Além da grande abrangência mundial, tratou-se de uma pandemia com maior potencial letal que outras pandemias, sendo a taxa de letalidade observada de mais de 2.5% enquanto outras epidemias de gripe têm taxas menores que 0.1% (MARKS e BEATTY, 1976 *apud* TAUBENBERGER *et al.*, 2001).

Análises histopatológicas dos pulmões de vítimas da gripe espanhola mostraram uma intensa lesão pulmonar, associada com perda da arquitetura do órgão, edema e hemorragia; a maioria dos óbitos deu-se devido a uma pneumonia bacteriana aguda secundária, uma vez que na época o controle de infecções bacterianas com uso de antibióticos era limitado (REID *et al.*, 1999). A partir dos tecidos conservados das vítimas foi possível, recentemente, isolar o vírus o causador da gripe espanhola, que foi identificado como um vírus Influenza A H1N1, sendo que o gene da HA mostrou-se proximamente relacionado a linhagens encontradas em suínos (TAUBENBERGER *et al.*, 1997). O mesmo estudo foi ainda capaz de definir uma ancestralidade de vírus aviários entre os vírus de 1918 e vírus suínos. Tal descoberta justifica a grande taxa de infecções em porcos ocorrida quase simultaneamente aos casos da gripe espanhola (TAUBENBERGER e MORENS, 2006).

1.2.2 – Gripe aviária

Em Hong Kong, a partir de 1997, surgiram casos de infecções humanas pelo subtipo H5N1 altamente patogênico, proveniente de aves. Esse foi o primeiro relato de um surto de gripe ocorrido devido à transmissão direta de aves para seres humanos, sem a passagem por um hospedeiro intermediário. Dentre os 18 casos diagnosticados no ano, seis resultaram em óbito (COX e SUBBARAO, 1999).

Desde o surgimento dos primeiros casos em 1997 até julho de 2009, já foram relatados 436 casos de infecções em humanos, com uma taxa de letalidade de 60% (site da Organização Mundial de Saúde). A maioria dos casos surgiu após um evento epizootico, em 2003, de infecção pelo vírus altamente patogênico H5N1 em aves domésticas e migratórias em diversos países da Ásia, Europa e África (PAPPAIOANOU, 2009). Os casos humanos concentram-se em 14 países da Ásia e no Egito (site da Organização Mundial de Saúde). Apenas na Tailândia e na Indonésia já ocorreram casos de transmissão entre seres humanos (PAPPAIOANOU, 2009). A transmissão sustentada de humano para humano, característica fundamental para o surgimento de uma pandemia (MAINES *et al.*, 2008) ainda não existe (site da Organização Mundial de Saúde).

Outros subtipos de vírus Influenza A também de alta patogenicidade e provenientes de aves – H9N2, H7N7, H7N3, H7N2 e H7N3 – vêm sendo isolados de humanos ou aves em diferentes partes do mundo. No entanto, infecções em humanos não têm se mostrado de alto potencial letal e restringem-se, algumas vezes, a episódios de conjuntivite (GARCÍA-GARCÍA e RAMOS, 2006; WEBBY e WEBSTER, 2003).

1.2.3 – Gripe suína

Em abril de 2009, a primeira pandemia de gripe do século XXI surgiu com o aparecimento de casos de infecção humano-humano de um subtipo de vírus Influenza A característico de suínos. A nova gripe surgida no México foi chamada de gripe suína e agora está sendo chamada de Influenza A H1N1, uma vez que não houve casos de contaminação em porcos. Em 11 de junho de 2009, a Organização Mundial de Saúde elevou o nível de alerta

epidêmico de gripe para 6, devido à abrangência mundial do novo vírus e transmissão sustentada de pessoa para pessoa. Até 6 de julho de 2009, quando a Organização Mundial de Saúde parou de divulgar boletins com atualizações de novos casos, 135 países e territórios já haviam notificado um total de 94512 indivíduos infectados com um total de 429 mortes em 19 países. Após essa última atualização, a Organização constatou que o vírus H1N1 espalhou-se pelo mundo com velocidade sem precedentes na história e, assim, admitiu a dificuldade de se diagnosticar todos os novos casos afetados (site da Organização Mundial de Saúde – WHO).

De forma característica a outras pandemias, nos Estados Unidos da América, a gripe causada pelo vírus Influenza A H1N1 de origem suína afetou em sua maioria (75%), pacientes jovens de 10 a 50 anos, causando, na maioria dos casos, doença auto limitada similar à gripe sazonal. Análises filogenéticas dos vírus isolados desses pacientes americanos mostraram que o vírus causador da nova pandemia é uma mistura composta por seis segmentos gênicos similares aos de vírus Influenza suínos triplamente reassociados circulantes na América do Norte e dois segmentos: o que codifica a Neuraminidase e o que codifica a proteína M1, relacionado aos vírus suínos circulantes na Eurásia. Os vírus norte-americanos de tripla reassociação que deram origem aos seis segmentos do novo vírus H1N1 são, por sua vez, formados por uma combinação de genes de vírus Influenza suínos clássicos, genes de vírus Influenza aviários e genes de vírus Influenza A humano H3N2 (Novel Swine-Origin Influenza A (H1N1) Virus Investigation Team, 2009; NEUMANN *et al.*, 2009).

A análise da seqüência de aminoácidos do vírus de origem suína causador da nova pandemia mostram que, para quase todos os determinantes avaliados, o novo vírus é característico de um vírus de baixa patogenicidade. Mas, tendo a gripe espanhola como exemplo, é preciso ter cautela nas perspectivas otimistas, pois em 1918, a pandemia devastadora foi precedida de uma primeira onda de baixa patogenicidade. Além disso, com o inverno no hemisfério sul e o surgimento de episódios de gripe sazonal, a co-infecção por um subtipo comum de Influenza A com o novo vírus pandêmico pode representar uma fonte de novos vírus mais patogênicos (NEUMANN *et al.*, 2009).

1.3 – A GRIPE E A RESPOSTA IMUNE CONTRA O VÍRUS

A gripe é a segunda doença aguda respiratória de maior prevalência e possui alto potencial de transmissão. Após entrar através das vias aéreas, o vírus se replica nas células colunares do epitélio do trato respiratório, onde tem acesso às secreções respiratórias e é transmitido em pequenas partículas durante a tosse, espirros ou na fala. Outra forma de transmissão é através do contato com as mãos da pessoa doente ou de fômites que tenham entrado em contato com as secreções das mesmas. Uma única pessoa é capaz de transmitir o vírus para um grande número de indivíduos susceptíveis. Os subtipos H1N1 e H3N2 são os causadores mais comuns das epidemias anuais cujos sintomas são fadiga, febre, tosse seca, mialgia, dores de garganta e de cabeça e congestão nasal, que aparecem um ou dois dias após a infecção, período que representa a incubação do vírus. Esses sintomas perduram por dois ou três dias (BEIGEL, 2008; COX e SUBBARAO, 1999).

A gripe representa um grande risco para a população, especialmente para crianças, idosos e pessoas imunocomprometidas, mesmo em sua forma “branda” epidêmica anual. Nos anos 90, foram registradas 36 mil mortes e 200 mil hospitalizações decorrentes da gripe nos EUA, que também leva a perdas econômicas, uma vez que debilita o indivíduo afetado por uma semana ou mais, e gera gastos elevados para o sistema público de saúde (MOLINARI *et al.*, 2007). Além disso, a infecção viral facilita a adesão e co-infecção por bactérias, como *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* e *Haemophilus influenzae*, no epitélio danificado do trato respiratório, desencadeando a pneumonia (JULKUNEN *et al.*, 2001) e também pode levar a complicações de doenças cardiopulmonares prévias (BEIGEL, 2008).

1.3.1 – Histopatologia e modelos animais

A infecção pelo vírus Influenza A é normalmente limitada à traquéia e aos brônquios, mas pode, nas formas mais graves da doença, estender-se para os bronquíolos e alvéolos, desencadeando uma pneumonia intersticial (WANG *et al.*, 2008). Quando as vias aéreas distais, onde ocorrem as trocas de gases, são atingidas, o dano pulmonar é intenso. A lesão

alveolar manifesta-se com a perda de células epiteliais, edema, hemorragia, formação de membrana hialina e infiltrado de células inflamatórias nos septos alveolares e no espaço alveolar. A forma mais grave da doença é causada por subtipos de vírus altamente patogênicos ou em pessoas com falha no controle da replicação viral (BRUDER *et al.*, 2006).

O conhecimento da patologia associada à gripe se deve a criação de modelos de infecção experimental que permitem o estudo mais detalhado dos mecanismos celulares e fisiológicos de controle da infecção. As cobaias mais estudadas são os camundongos, devido ao vasto número de anticorpos e ferramentas para estudos moleculares; e os furões, que apresentam sintomas e perfil da doença bem próximo a de humanos, além de ratos, porcos, cães e primatas (MAINES *et al.*, 2008). Modelos de Influenza benigna, auto-limitada, utilizam isolados de vírus de patologia leve, não adaptado às cobaias, em que a perda de peso, no caso de camundongos, é o principal parâmetro da doença. Os modelos de Influenza sazonal grave e pneumonia utilizam vírus adaptados a camundongos, após sucessivas passagens pulmonares e os parâmetros avaliados incluem perda de peso, letalidade, título viral, peso do pulmão e escores histopatológicos (BARNARD, 2009).

O vírus Influenza A/WSN/33 H1N1 teve origem do primeiro isolado de humanos em 1933 por Wilson Smith que posteriormente foi adaptado para infectar o sistema nervoso central de camundongos. Essa propriedade do vírus deve-se a uma modificação no gene da Neuraminidase, que, na posição 130, não possui um sítio de glicosilação encontrado em outras linhagens (LI *et al.*, 1993). Além de ser utilizada no modelo neurotrópico, a linhagem WSN/H1N1 também é base em modelos de estudo da infecção pulmonar em camundongos (BOT *et al.*, 1998) e para a construção de vírus recombinantes (KASH *et al.*, 2004).

1.3.2 – A entrada do vírus no organismo e a resposta imune inata

A Hemaglutinina presente na superfície do vírus Influenza permite o contato do vírus com a célula hospedeira, através da sua ligação com ácidos siálicos da superfície de diversas células hospedeiras, o que culmina com a endocitose da partícula viral. No endossomo, a perda do envelope viral induz à liberação do complexo nucleoprotéico que atravessa o citoplasma em direção ao núcleo, onde realiza a replicação (BOUVIER e PALESE, 2008).

Durante o processo de entrada na célula, tráfego intracelular e liberação de novas partículas virais, o vírus Influenza é reconhecido por três diferentes mecanismos do sistema imune inato. Quando presente em endossomos acidificados, o vírus é reconhecido por receptores do tipo Toll, incluindo o TLR7 e provavelmente o TLR8 que são capazes de reconhecer o RNA de fita simples como um padrão molecular associado a patógenos – PAMP (WANG *et al.*, 2008), além de ser reconhecido pelo TLR3 durante a sua fase de multiplicação em que é encontrado em fita dupla de RNA (LE GOFFIC *et al.*, 2007). Enquanto está presente no citoplasma, o RNA do vírus Influenza é reconhecido por uma helicase citoplasmática chamada RIG-I, de *retinoic acid inducible gene-1* (OPITZ *et al.*, 2007). O reconhecimento via TLR7 e RIG-I leva à ativação dos fatores de transcrição IRF – Fator regulador de IFN, que ativa a produção de IFN do tipo I (α e β) e NF- κ B que ativa a produção de citocinas pró-inflamatórias, IL-1 β , IL-6, TNF- α e CXCL2 (KOHLMEIER e WOODLAND, 2008). O terceiro e mais recente descoberto mecanismo de ativação de resposta inata ao vírus Influenza é o complexo do Inflamassoma com a proteína NLRP3. O Inflamassoma é uma plataforma molecular responsável pela ativação da Caspase-1 que, por sua vez, promove a clivagem das formas inativas das citocinas IL-1 β , IL-18 e IL-33 nas suas formas ativas (ALLEN *et al.*, 2009).

As células epiteliais da traquéia e dos brônquios são as primeiras a serem infectadas e, através do reconhecimento mediado por TLR3 e RIG-I (LE GOFFIC *et al.*, 2007), ativam a produção de quimiocinas como CCL5/RANTES, CCL2/MCP-1 e CXCL8/IL-8, além das citocinas antivirais IFN- α/β ; em estágios avançados da multiplicação do vírus, essas células perdem parte do poder de transcrição e acabam morrendo por citólise ou apoptose (JULKUNEN *et al.*, 2001). Os vírus que se multiplicaram no epitélio respiratório acabam infectando macrófagos alveolares que ativam a produção de citocinas – IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-18, IFN- α e IFN- β e quimiocinas – CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β , CCL5/RANTES, CCL7/MCP-3, CCL20/MIP-3 α , CXCL10/IP-10 e CXCL8/IL-8 (JULKUNEN *et al.*, 2001). A liberação desses mediadores inflamatórios é responsável pelo recrutamento de neutrófilos, plasmócitos, células NK e linfócitos T para o tecido pulmonar após a infecção (WAREING *et al.*, 2004). Esta resposta inflamatória inicial está associada às formas mais graves da doença (LA GRUTA *et al.*, 2007).

As células NK e os neutrófilos predominam nos pulmões durante os primeiros dias da resposta primária à infecção viral. As células NK, estimuladas pelos IFN- α/β , reconhecem o

vírus Influenza diretamente através da interação da Hemaglutinina com o seu receptor de ativação NCR1 ou NKp46. O reconhecimento do vírus pelas células NK estimula a citólise de células infectadas e aumenta a produção de IFN- γ , eventos que aceleram o combate ao vírus (KOHLMEIER e WOODLAND, 2008).

Modelos de estudo *in vitro*, *in vivo* e estudos em pacientes revelam que o vírus Influenza A ativa neutrófilos, estimulando a produção de espécies reativas de oxigênio e aumentando a expressão de moléculas de adesão, que facilitam a transmigração dessas células para o sítio de infecção (HARTSHORN *et al.*, 1990; DAIGNEAULT *et al.*, 1992; HARTSHORN e WHITE, 1999). A ativação da explosão respiratória de neutrófilos pelo vírus Influenza é seguida por uma inativação metabólica da célula, que se torna hiporresponsiva a um segundo estímulo, fato que está diretamente associado à grande ocorrência de infecções bacterianas após uma gripe comum (ABRAMSON *et al.*, 1982). O papel dos neutrófilos na infecção por Influenza já foi demonstrado em alguns trabalhos em que foi feita a depleção dessas células com uso de anticorpos específicos. Quando essa depleção foi feita antes da infecção, o curso da doença foi mais grave resultando em maior letalidade (TUMPEY *et al.*, 2005; FUJISAWA, 2008). No entanto, quando depletados após três ou cinco dias de infecção, não houve alteração na resposta ao vírus (TUMPEY *et al.*, 2005). Por outro lado, já foi demonstrada uma correlação direta entre a gravidade da patologia pulmonar associada a vírus mais patogênicos como o H5N1 e a magnitude da infiltração neutrofílica no órgão (PERRONE *et al.*, 2008). Logo, os neutrófilos têm papel importante no controle viral no início da infecção, quando não há montagem de respostas adaptativas. Uma vez que a depleção neutrofílica total induz a uma piora da evolução da infecção pelo vírus Influenza, outras estratégias que diminuam o recrutamento e a ativação desses leucócitos podem ser mais promissoras no controle dos danos causados pelos polimorfonucleares.

Os macrófagos também têm papel importante na patologia pulmonar, uma vez que, durante a resposta pró-inflamatória decorrente da infecção, liberam grandes quantidades de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, que contribuem com o dano inicial do tecido pulmonar (LA GRUTA *et al.*, 2007).

1.3.3 – A resposta imune adaptativa ao vírus Influenza

O reconhecimento do vírus Influenza pelas células do sistema imune inato e a produção de citocinas são importantes para a maturação de células dendríticas que migram para os linfonodos onde inicia-se a resposta adaptativa contra o vírus. Após a ativação e proliferação de células T CD4⁺ e CD8⁺ antígeno-específicas nos linfonodos, essas células começam a migrar para os pulmões e vias aéreas entre seis e sete dias após a infecção. A chegada de células T efetoras reduz a carga viral, através da citólise mediada por CD8 e pela secreção de citocinas por CD4, como IFN- γ , TNF- α , IL-2 e IL-10 (KOHLMEIER e WOODLAND, 2008). Mas, por outro lado, estas células também desencadeiam um dano pulmonar exacerbado típico desta patologia (LA GRUTA *et al.*, 2007).

Outra população de células da resposta adaptativa são as células NKT, linfócitos T especializados que expressam marcadores da linhagem de células NK e possuem um TCR invariante. A ação dessas células consiste na produção de IFN- γ , ativação de células NK e amplificação da produção de IL-12 por células dendríticas. Foi demonstrado que, ao se estimular essa população durante a infecção por Influenza, é possível obter proteção parcial na perda de peso e aumento do combate ao vírus, em associação ao aumento de citocinas e quimiocinas da resposta inata. (HO *et al.*, 2008)

A presença de anticorpos específicos, IgA, para a glicoproteína viral Hemaglutinina, passível de variação antigênica, em locais de infecção sistêmica ou mucosa, garante proteção imediata contra a infecção viral secundária. Em infecções primárias, ocorre a produção de anticorpos neutralizantes, IgM, que são necessários para o combate ao vírus. (KOHLMEIER e WOODLAND, 2008)

É possível concluir que a resposta imune ao vírus Influenza envolve uma grande quantidade de células e mediadores inflamatórios. Esta resposta inflamatória é crucial na eliminação do patógeno, porém uma exacerbção desses processos implica em um maior dano tecidual, que resulta na morbidade observada em certos surtos de gripe.

1.4 – PROFILAXIA E TRATAMENTO DA GRIPE

1.4.1 – Vacinas

A produção de vacinas que estimulem a produção de anticorpos específicos contra os subtipos mais frequentes de vírus vem sendo amplamente utilizada (SUBBARAO e JOSEPH, 2007). Atualmente, a vacinação contra os subtipos causadores das epidemias anuais é direcionada para parcelas da população consideradas de alto risco, como idosos, que apresentam as maiores taxas de mortalidade decorrentes de gripes e deve ser dada anualmente (FLEMING, 2001). A Organização Mundial de Saúde recomenda que a produção de vacinas deva ser anual e baseada nas variantes dos subtipos de Influenza A H1N1, H3N2 e Influenza B causadores de surtos em 83 países do ano corrente. (LANGLEY e FAUGHNAN, 2004).

Existem, atualmente, dois principais tipos de vacina, a Vacina Inativada Trivalente – TIV – e a Vacina de Vírus Influenza Vivo Atenuado – LAIV. TIV é administrada via intramuscular e contém as proteínas Hemaglutinina e Neuraminidase purificadas, desencadeando uma alta resposta de anticorpos IgG; é indicada a indivíduos com mais de seis meses de idade e resulta em uma redução de gripe diagnosticada em laboratório de 65%. A vacina contendo o vírus atenuado, administrada via intranasal, leva a uma melhor resposta por IgA nos locais primários de entrada dos vírus, as mucosas; é indicada para indivíduos saudáveis de cinco a 49 anos e pode desencadear sintomas respiratórios, como a coriza, por dois dias, conferindo proteção de 79-80%. (NICHOL e TREANOR, 2006)

Um cenário pandêmico representa um grande desafio na produção de vacinas, uma vez que a pandemia pode afetar milhões de pessoas em todo o mundo – 20% da população – espalhando-se rapidamente. Vacinas contra o vírus Influenza para humanos são produzidas em ovos de galinha embrionados e todo o processo de produção demora de seis a nove meses. Uma pandemia é capaz de atingir todo o planeta em seis a 10 meses após o seu surgimento. Sendo assim, obstáculos técnicos e clínicos na produção de vacinas contra o tipo de vírus causador da pandemia devem ser superados para que mais pessoas possam ser imunizadas a tempo (STÖHR e ESVELD, 2004; SUBBARAO e JOSEPH, 2007). Devido à recente ameaça de pandemia causada pelo vírus H5N1, o investimento em pesquisas para a produção de

vacinas aumentou significativamente nos últimos anos. Entretanto, ainda não existe uma previsão de quanto tempo seria necessário para imunizar a população mundial contra o vírus de origem suína H1N1. Ainda existe o risco de a produção de vacinas contra a pandemia interferir na produção de vacinas contra a gripe sazonal, destinadas a parcelas da população de alto risco, além da possibilidade de não ocorrer uma distribuição homogênea entre países desenvolvidos e subdesenvolvidos (COLLIN *et al.*, 2009).

1.4.2 – Antivirais

A glicoproteína de superfície viral Neuraminidase, envolvida na liberação de vírions de células infectadas através da clivagem de resíduos de Ácido Siálico, vem sendo alvo de terapias inibidoras da atividade viral. Embora esta glicoproteína apresente diversas regiões de variação antigênica, seu sítio ativo é altamente conservado dentre os subtipos de Influenza A e B. Desse modo, inibidores da Neuraminidase, como o Zanamivir e o Oseltamivir, ou Tamiflu, têm se mostrado estratégias antivirais promissoras (COLMAN, 1999; KAČERGIUS *et al.*, 2006; SIDWELL *et al.*, 1998). Outro alvo viral no desenvolvimento de fármacos é a proteína M2, responsável pela perda do envelope viral dentro da célula infectada, que levou ao desenvolvimento dos antivirais Amantadine e Ribamantadine. As duas estratégias antivirais são utilizadas tanto na profilaxia quanto no tratamento da gripe (REGOES e BONHOEFFER, 2006).

No entanto, os inibidores de Neuraminidase são drogas com custo elevado e de difícil produção e, assim como acontece com o uso de drogas inibidoras de M2, cujos efeitos colaterais são mais intensos, podem surgir linhagens ou subtipos de vírus resistentes a elas. Durante uma epidemia, em que a pressão seletiva se torna maior, linhagens resistentes poderiam sobreviver e fatalmente continuariam a matar milhares de pessoas (REGOES e BONHOEFFER, 2006).

1.4.3 – Outros alvos de tratamento

A alta morbidade associada à gripe está relacionada com o recrutamento e ativação de linfócitos T e outros leucócitos para a eliminação de vírus, que ocorre de forma excessiva no pulmão, levando a danos teciduais, oclusão das vias aéreas e produção de mediadores inflamatórios de forma sistêmica. Dentre estes mediadores, principalmente o TNF- α e IL-6, levam à maioria dos sintomas das infecções respiratórias, como caquexia, febre e perda de apetite (HUSSEL *et al.*, 2004). Logo, estratégias que bloqueiem uma ativação excessiva do sistema imune em resposta à infecção viral, são alvos potenciais para intervenção farmacológica com objetivo de tratamento dos sintomas e redução na morbidade. A redução do recrutamento de células inflamatórias para o pulmão pode ter grande potencial terapêutico ao reduzir as manifestações clínicas, sem alterar, necessariamente o curso da eliminação do patógeno (HUSSEL *et al.*, 2004). Outra forma de reduzir a patologia sem ter como alvo o vírus, passível de mutação e resistência a drogas, é focar nas moléculas de sinalização intracelular utilizadas pelo vírus para multiplicar (MCCARTY *et al.*, 2009).

No que se refere ao vírus Influenza aviário do subtipo H5N1, foi demonstrado que grande parte dos efeitos devastadores da infecção em seres humanos são resultantes da produção exacerbada e descontrolada das citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-1 β , TNF- α . Desta forma, abordagens farmacológicas capazes de abolir a chamada “tempestade de citocinas” decorrente da infecção podem representar uma alternativa simples e barata para o tratamento da gripe com conseqüente redução da sua morbidade. A reação imune excessiva em resposta ao vírus leva à inflamação e danos pulmonares que podem desencadear falência múltipla de órgãos e a morte. Dessa forma, regular a produção exacerbada de citocinas, bem como a de outros produtos resultantes da inflamação acentuada, tais como os eicosanóides, radicais de oxigênio e nitrogênio seriam estratégias alternativas para evitar os danos da doença, assim como o controle da ativação dos leucócitos nas vias aéreas. O uso de estatinas e de outros fármacos redutores dos níveis lipídicos no sangue mostrou-se eficiente contra a letalidade associada à gripe (BUTLER, 2007; RAINSFORD, 2006). Outro alvo potencial de tratamento da inflamação associada à gripe é o fator de transcrição NF- κ B, que, aumentado em células epiteliais durante a infecção, contribui para a sobrevivência viral e aumenta a produção de citocinas pró-inflamatórias. Mais um alvo seria a NADPH oxidase, uma vez que o vírus Influenza induz ao estresse oxidativo que favorece a replicação viral e leva ao dano

tecidual; a administração em camundongos de N-acetilcisteína, um regulador negativo da enzima diminui a mortalidade associada à infecção por Influenza (MCCARTY *et al.*, 2009).

Fármacos antiinflamatórios não esteroidais e analgésicos são comumente utilizados no combate aos sintomas da gripe, como febre, dores de cabeça, coriza e dores musculares. No entanto, existem poucos estudos sobre os mecanismos de controle da inflamação pulmonar desses fármacos durante a infecção viral. Mais além, já foi demonstrado que o uso dessas substâncias, aumentado durante o inverno em decorrência da gripe, aumenta a ocorrência de reações adversas no trato gastrointestinal, no fígado e nos rins (RAINSFORD, 2006).

Por outro lado, a combinação de estratégias antivirais com estratégias antiinflamatórias pode potencializar o efeito protetor de cada uma delas aplicada separadamente, reduzindo o dano pulmonar (OTTOLINI *et al.*, 2003).

1.5 – O FATOR DE ATIVAÇÃO PLAQUETÁRIA

Diferentes processos fisiológicos e patológicos envolvem uma série de mediadores inflamatórios que agem diretamente sobre os leucócitos ou sobre células epiteliais, endoteliais entre outras. Uma das moléculas envolvidas nesses processos é o Fator de Ativação Plaquetária, ou PAF, considerado como um dos mediadores mais potentes e versáteis encontrados em mamíferos. O PAF, ou mais precisamente 1-O-alkil-2-acetil-sn-glicero-3-fosfolina, é um mediador fosfolipídico que pode funcionar como mensageiro intercelular ou intracelular de comunicação célula-a-célula. Diversas células, desde monócitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos e plaquetas, até células endoteliais, linfóides e cardiomiócitos, entre outras, produzem PAF sob estímulo apropriado e a maioria das células produtoras são também alvos da ação de PAF, por possuírem o receptor específico para a molécula (PAFR). A síntese de PAF ocorre a partir de estimulação celular em que a fosfolipase A₂ citoplasmática – PLA₂ – hidrolisa fosfolipídios de membrana liberando Ácido Araquidônico e Liso-PAF, o precursor direto de PAF (MONTRUCCHIO *et al.*, 2000; WEIJER *et al.*, 2003)

PAF está envolvido em diversos fenômenos fisiológicos além do clássico efeito de agregação plaquetária, como a modulação da pressão sanguínea, a ovulação, a gravidez e implantação do óvulo (MONTRUCCHIO *et al.*, 2000; CHAO e OLSON, 1993). Durante a resposta inflamatória, que pode estar relacionada a patologias ou não, PAF medeia a transmigração leucocitária, a produção de superóxido e a expressão de VEGF, diretamente relacionada à angiogênese; aumenta a permeabilidade vascular e o extravasamento de proteínas plasmáticas (ISHII e SHIMIZU, 2000; MONTRUCCHIO *et al.*, 2000). A transmigração de neutrófilos é mediada por PAF, uma vez que o mediador fosfolipídico ativa a célula e o endotélio, modulando a expressão de moléculas de adesão e mediadores vasoativos que facilitam a sua passagem através do endotélio e estimulando a produção de espécies reativas de oxigênio (CONDLIFFE *et al.*, 1996).

Os efeitos patológicos de PAF, envolvendo uma excessiva ativação inflamatória, são observados em diversas doenças como a trombose, inflamações agudas, asma, anafilaxia sistêmica, choque, úlceras gastrointestinais, pancreatite, anafilaxia cardíaca e na lesão pulmonar aguda (CHAO e OLSON, 1993). Por outro lado, o bloqueio da ação do PAF nestas doenças não resulta, necessariamente, em melhora nos sinais clínicos das mesmas implicando em efeito terapêutico (JOHNSON *et al.*, 2001; ABU-ZIDAN *et al.*, 1994).

1.5.1 – O receptor do Fator de Ativação Plaquetária

O receptor de PAF – PAFR – contém sete domínios de α -hélices transmembranares e é acoplado à proteína G heterotrimérica que, dependendo do tipo celular, pode ser a isoforma G_i , G_s ou G_q . A recente descoberta de que a geração de PAF pode se dar a partir de fosfolipídios do envelope nuclear e que existe um receptor nuclear levantou a possibilidade de que essa via de ativação levaria à ativação de fatores de transcrição como o NF- κ B que regula a transcrição de genes pró-inflamatórios. Essa ativação, chamada intrácrina, estaria restrita ao aumento da expressão de certos genes, enquanto os efeitos de interação celular mediados por PAF necessitam da interação da molécula com o receptor de superfície celular (HONDA *et al.*, 2002; MARRACHE *et al.*, 2002). A estimulação de PAFR faz com que a proteína G ative a fosfolipase C – PLC que leva a produção de Diacilglicerol – DAG que, por sua vez, ativa

Proteína Cinase C – PKC e Inositol Trifosfato – PIP₃, que irá mediar a liberação de cálcio de estoques citoplasmáticos, fundamental para a ativação celular (CHAO e OLSON, 1993).

1.5.2 – PAF e infecções virais

O primeiro estudo a demonstrar aumento na produção de PAF após infecção viral foi realizado *in vitro*, através da infecção de fagócitos mononucleares com o Vírus Sincicial Respiratório, principal causador de inflamação pulmonar em crianças (VILLANI et al., 1991). Sabe-se também, que PAF tem papel fundamental na neuropatogênese associada à infecção pelo vírus da imunodeficiência humana, aumentando a resposta inflamatória e a replicação viral (MARTIN *et al.*, 2000). Outro estudo recente demonstrou aumento nos níveis de PAF e redução de acetil-hidrolase de PAF, seu principal modulador negativo, em pacientes com hepatite C crônica (CAINI *et al.*, 2007). O trabalho de van der Sluijs e colaboradores mostrou, ainda, que a infecção pelo vírus Influenza A induz a um aumento na expressão do RNA mensageiro do receptor de PAF, indicando que o receptor pode exercer algum papel durante a infecção (VAN DER SLUIJS *et al.*, 2006).

1.5.3 – PAF e as doenças pulmonares

Vários estudos relacionam PAF a doenças respiratórias, uma vez que este mediador aumenta a permeabilidade vascular via produção de prostaglandina E₂, que leva à broncoconstrição e ao edema pulmonar. Níveis de PAF encontram-se elevados em pacientes com asma, síndrome da angústia respiratória aguda (ARDS), edema pulmonar hidrostático, trauma e sepse. Em doenças pulmonares crônicas, PAF induz remodelamento e perda de matriz vascular e do conteúdo de hidroxiprolina (UHLIG *et al.*, 2005). Modelos animais de asma mostram que, além de PAF ser produzido por células como macrófagos alveolares, plaquetas, neutrófilos, mastócitos e eosinófilos e ser capaz de ativar as mesmas, o mediador provoca broncoconstrição, hiperresponsividade aérea, exsudação plasmática e aumento na secreção de muco, respostas fundamentais no desenvolvimento da inflamação pulmonar (ISHII e SHIMIZU, 2000). Vale ressaltar, entretanto, que o uso de antagonistas de PAFR em

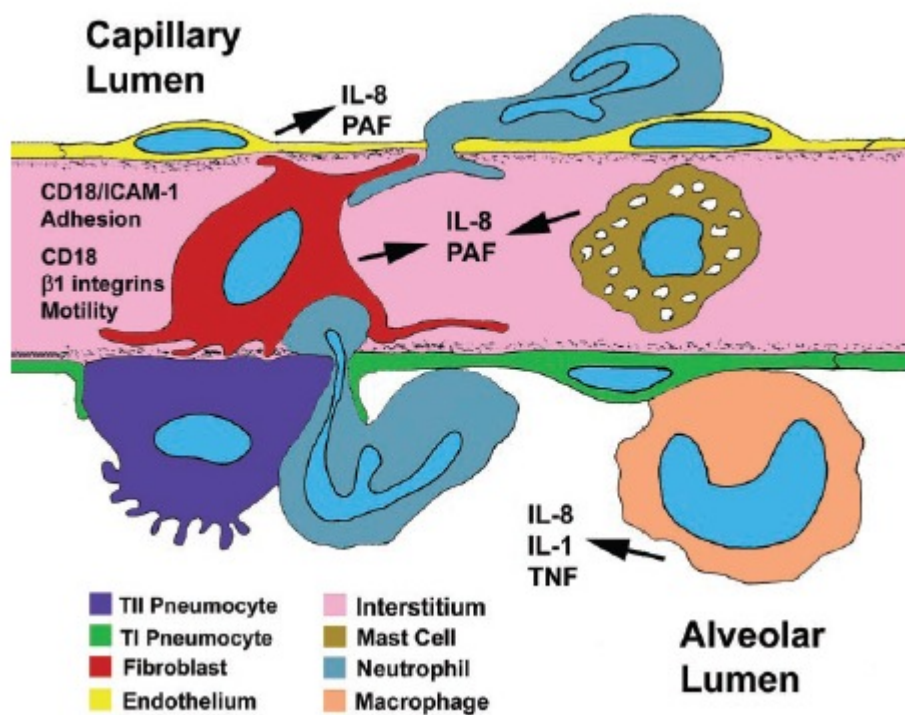
seres humanos não está associado à diminuição de hiperreatividade brônquica ou de sintomas de asma (KUITERT et al., 1995).

Uma vez que o receptor de PAF favorece a aderência e invasão bacteriana e que infecções pelo vírus Influenza também favorecem infecções bacterianas que levam à pneumonia, três trabalhos investigaram o bloqueio do receptor na pneumonia por *Streptococcus pneumoniae*. O primeiro estudo utilizou um antagonista competitivo do receptor de PAF antes da infecção bacteriana pós-influenza que proporcionou atraso, mas nenhuma diferença significativa na letalidade, com maior bacteremia no grupo tratado, o que sugeriu que a invasão bacteriana na célula hospedeira poderia ter mecanismos independentes do receptor de PAF (MCCULLERS e REHG, 2002). Outro estudo avaliou o papel do receptor de PAF através do uso de animais deficientes para seu receptor e mostrou redução da letalidade nos camundongos nocaute, causada por pneumonia pós-influenza. Sendo assim, o bloqueio do receptor na infecção por Influenza pode resultar em menor susceptibilidade a uma subsequente infecção por *Streptococcus pneumoniae* (VAN DER SLUIJS et al., 2006). O terceiro e mais conflitante estudo revelou que a ausência ou o bloqueio do receptor de PAF não leva a proteção da letalidade causada pela infecção bacteriana secundária e ainda aumenta a resposta inflamatória (MCCULLERS et al., 2008).

1.5.4 – PAF e a transmigração neutrofílica nos pulmões

Diferentemente dos outros sítios de migração, nos pulmões os leucócitos migram diretamente do leito capilar alveolar, onde ocorrem as trocas gasosas da respiração, para o espaço alveolar. Essa rede de pequenos segmentos de capilares alveolares contém um número 50 vezes maior de neutrófilos e um número acentuado de monócitos e linfócitos em relação a vasos maiores. Um neutrófilo possui o diâmetro maior que o do próprio capilar, o que favorece o número de interações do leucócito com o endotélio; quando ativado por estímulos inflamatórios, sua aderência ao endotélio alveolar é mais acentuada, o que resulta em um número maior de neutrófilos nos pulmões. Dessa maneira, o mecanismo de recrutamento de neutrófilos provenientes dessa rede capilar para os pulmões requer etapas diferentes do recrutamento vascular sistêmico. A figura 3 explicita as duas migrações realizadas pelos neutrófilos em resposta a estímulos inflamatórios no sistema respiratório: a migração vascular

em direção ao espaço intersticial e a migração epitelial em direção ao lúmen alveolar. Macrófagos alveolares após estímulos, como uma infecção viral, produzem citocinas como IL-1 β , TNF- α e IL-8, que ativam células endoteliais, fibroblastos e mastócitos intersticiais a produzirem fatores quimioatrativos para neutrófilos como IL-8 e o PAF. Esses estímulos levam à transmigração do neutrófilo através das bordas das células endoteliais para o interstício. No interstício, o neutrófilo adere à superfície de fibroblastos através da interação de integrinas β_2 (CD18) dos neutrófilos com moléculas ICAM-1 dos fibroblastos. O fibroblasto então, direciona a migração dos neutrófilos, de maneira CD18/Integrina β_1 dependente, para o lúmen alveolar. A passagem do neutrófilo ocorre através de fendas na membrana basal e o leucócito migra, em seguida, pelo epitélio, no ponto de contato de dois pneumócitos do tipo I e um pneumócito do tipo II (BURNS *et al.*, 2003).



Retirado de Burns et al., 2003

Figura 3: Transmigração neutrofilica dos capilares alveolares para o interstício e em seguida para o lúmen alveolar durante a inflamação pulmonar.

2 - Objetivos

RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA:

Devido à crescente preocupação mundial com a nova pandemia causada pelo vírus Influenza A H1N1, faz-se necessário o estudo dos mecanismos da patogênese da doença. Da mesma forma, é de grande relevância a busca de novas estratégias terapêuticas no combate às manifestações inflamatórias associadas à infecção pelo vírus Influenza A, uma vez que estas são isentas da variação antigênica do vírus.

A hipótese a ser estudada é a de que o controle do recrutamento de neutrófilos para o sítio de infecção, através do antagonismo ou ausência do receptor de PAF, pode acarretar em proteção contra a infecção experimental pelos vírus Influenza A.

2.1- OBJETIVO GERAL:

Determinar o papel do receptor do Fator de Ativação Plaquetária – PAF – na infecção experimental pelo vírus Influenza A.

2.2- OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1- Padronizar o modelo de infecção pelo vírus Influenza A H1N1 WSN/33 em camundongos C57 BL6/J

- a.** Determinar a DL-50 do vírus;
- b.** Avaliar os parâmetros inflamatórios em diferentes tempos de infecção com um inóculo letal e um inóculo sub-letal;

2- Comparar o curso da infecção em camundongos selvagens (WT) e deficientes no receptor de PAF (PAFR KO)

- a.** Comparar a letalidade entre os grupos WT e PAFR KO após a infecção com dois inóculos do vírus Influenza A H1N1 WSN/33;
- b.** Comparar os parâmetros inflamatórios entre os grupos infectados e seus controles não-infectados;

- c. Comparar a carga viral nos grupos infectados;
- d. Comparar a sobrevivência celular entre os grupos infectados e não infectados;
- e. Comparar o perfil leucocitário pulmonar e do espaço alveolar em decorrência da infecção através de citometria de fluxo;
- f. Comparar a ativação celular induzida por Zimosan das células pulmonares de animais WT e PAFR infectados ou não;
- g. Avaliar se a ausência de PAFR interfere na montagem da resposta imune contra o vírus.

3- Estudar os efeitos do fármaco antagonista de PAFR – PCA 4248 – como tratamento da inflamação causada pela infecção pelo vírus Influenza A H1N1 WSN/33

- a. Definir se o tratamento com o antagonista de PAFR gera proteção contra a infecção com dois inóculos do vírus H1N1;
- b. Confrontar a resposta inflamatória decorrente da infecção entre o grupo tratado com PCA 4248 e o grupo veículo;
- c. Determinar o título viral pulmonar dos grupos veículo e tratamento;
- d. Verificar se a combinação de tratamento do antagonista de PAFR com o fármaco antiviral Tamiflu[®] altera a letalidade, o recrutamento celular e a carga viral.

4- Padronizar o modelo de infecção pelo vírus Influenza A Equine/Cordoba/18/1985 - Yamagata/32/1989 H3N1 em camundongos C57 BL6/J

- a. Realizar passagens pulmonares do vírus, para torná-lo capaz de induzir doença em camundongos;
- b. Determinar o inóculo letal do vírus Influenza A H3N1;
- c. Comparar os parâmetros inflamatórios associados à infecção pelo vírus Influenza A H1N1 WSN/33 e pelo vírus Influenza A H3N1

5- Avaliar o curso da infecção pelo vírus Influenza A Equine/Cordoba/18/1985 - Yamagata/32/1989 H3N1 em camundongos deficientes no receptor de PAF

- d. Comparar a letalidade e a perda de peso de camundongos WT e PAFR KO em decorrência da infecção pelo vírus Influenza A H3N1

3 - Material e Métodos

3.1 – ANIMAIS

Os experimentos com animais foram realizados em camundongos C57BL/6J machos de 8 a 12 semanas, fornecidos pelo Centro de Bioterismo da UFMG e mantidos em condições de temperatura e luz controladas, com livre acesso à água e ração, no biotério do laboratório de Imunofarmacologia.

Camundongos C57BL/6J deficientes no receptor do fator de ativação plaquetária, denominados PAFR KO, cedidos pelo grupo japonês de Satoshi Ishii (Universidade de Tóquio), foram criados no biotério do laboratório de Imunofarmacologia e infectados com idade entre 8 e 12 semanas. Todos os experimentos foram realizados de acordo com as normas do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG – CETEA – número de protocolo 203/08.

Após a infecção, os animais foram mantidos em gaiolas com microisoladores alocadas em estantes refrigeradas para animais, com controle de temperatura e filtros de entrada e saída de ar. Os animais foram pesados diariamente após a infecção e monitorados quanto à letalidade por 21 dias. Para análise dos parâmetros inflamatórios e titulação viral, grupos de camundongos infectados foram sacrificados em diferentes tempos de infecção.

3.2 – VÍRUS

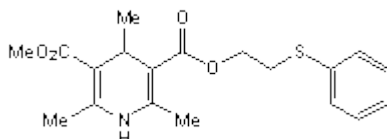
Foram utilizadas duas linhagens de vírus Influenza A, ambas gentilmente cedidas pelo Dr. Alexandre de Magalhães Vieira Machado (Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ): o vírus Influenza A/WSN/33 H1N1 e o vírus Influenza A Equine/Cordoba/18/1985 - Yamagata/32/1989 H3N1. As alíquotas contendo os estoques dos vírus foram diluídas em PBS estéril para que cada 25 µL de solução contivessem o inóculo a ser utilizado. As infecções foram feitas via intranasal.

3.3 – CÉLULAS

As células MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) foram utilizadas para crescimento do vírus e titulação, cultivadas em meio de Dulbecco modificado (DMEM) com alta concentração de glicose (4,5g/L), na presença de penicilina (1%) e estreptomicina (1%) (Sigma) e suplementado com 5% de soro fetal bovino (Cultilab).

3.4 – FÁRMACOS

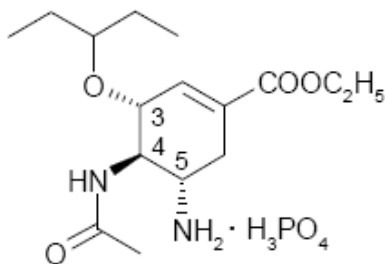
O antagonista do receptor de PAF (Figura 4), PCA 4248 [1,4-Dihidro-2,4,6-trimetil-3,5-ácido piridinedicarboxílico metil 2- (feniltio) éster de etila], foi adquirido da Tocris Bioscience e utilizado na dose de 5 mg/kg, duas vezes ao dia, com administração subcutânea. A diluição do fármaco foi feita em 5% de álcool etílico 98% em 95% de PBS estéril. O volume total administrado por animal foi de 200 µL.



Retirado de <http://www.tocris.com/dispprod.php?ItemId=1649>

Figura 4: Estrutura do antagonista do receptor de PAF, PCA 4248

O inibidor de Neuraminidase Fosfato de Oseltamivir [(3R,4R,5S)-4-acetamino-5-amino-3-(1-etil-propoxi)-1-ciclo-hexeno-1-ácido carboxílico, éster de etila, fosfato (1:1)], 75 mg, com nome comercial de Tamiflu (Figura 5), da indústria farmacêutica Roche, foi adquirido em estabelecimento comercial. A dose utilizada do fármaco foi de 1mg/kg nos experimentos de inflamação e letalidade, a diluição foi feita em salina 0,9% estéril, para a administração oral de 100 µL da solução, duas vezes ao dia através de uma agulha de gavagem para camundongos.



Retirado de <http://www.rocheusa.com/products/tamiflu/pi.pdf>

Figura 5: Fórmula estrutural do Fosfato de Oseltamivir

3.5 – MODELO EXPERIMENTAL DE INFECÇÃO PELO VÍRUS INFLUENZA A/WSN/33 H1N1

3.5.1 - Infecção intranasal

Em todos os experimentos foi utilizada a via de infecção intranasal adotada na literatura. Para a realização do procedimento, os camundongos foram anestesiados, via intraperitoneal com uma solução contendo 60 mg/kg de cetamina e 4mg/kg de xilazina. Após a anestesia, que de fato consistia apenas em uma sedação, os animais foram direcionados ao fluxo laminar, onde receberam, através de uma ponteira estéril, 25 μ L do inóculo do vírus diluído em PBS estéril, ou apenas o PBS estéril nos grupos não infectados (Mock). A cultura com o vírus foi gotejada lentamente nas narinas, de maneira que o animal aspirasse todo o volume correspondente. Após o procedimento, os animais eram mantidos com o ventre voltado para cima e monitorados até que voltassem do efeito do anestésico. A perda de peso foi utilizada como critério de confirmação da infecção.

3.5.2 - Padronização da Curva de Letalidade

Foram utilizados quatro inóculos dos vírus Influenza A/WSN/33 H1N1 para infecção de camundongos C57BL/6J machos de 8 a 12 semanas. Para determinar a dose letal para 50% dos animais infectados, os inóculos avaliados foram de 10^3 , 10^4 , 10^5 e 10^6 PFU (Unidades Formadoras de Placas). Após serem infectados com 25 μ L do vírus via intranasal, a sobrevivência e a perda de peso dos animais foram observadas durante 21 dias após a infecção.

3.5.3 - Cinética da resposta inflamatória

3.5.3.1 - Inóculos e tempos de observação

Uma vez determinados os inóculos letal e sub-letal do vírus Influenza A/WSN/33 H1N1, a cinética das respostas inflamatórias no decorrer da infecção foi avaliada. Para isso, camundongos C57BL/6J machos de 8 a 12 semanas foram infectados via intranasal com os inóculos de 10^4 PFU – sub-letal – e de 10^6 PFU – letal – e sacrificados em diferentes momentos da infecção. Para o inóculo sub-letal foram escolhidos os dias 1, 4, 7 e 10 após a infecção e para o inóculo letal, os dias 1, 3 e 5 após a infecção. Nesses tempos, os animais foram sacrificados e submetidos a procedimentos de extração de células, fluidos e tecidos que, posteriormente, foram utilizados para as análises dos parâmetros inflamatórios: análise do índice de hematócrito; dosagem de proteínas totais no BAL; quantificação de células totais, neutrófilos e mononucleares no BAL; quantificação de neutrófilos e macrófagos nos pulmões; análises histopatológicas dos pulmões, quantificação das quimiocinas CXCL1, CXCL2, CCL2 nos pulmões e no BAL, CCL5 nos pulmões e das citocinas IL-6 no soro e nos pulmões, IFN- γ , TNF- α , IL-2 e IL-12/IL-23 P40 nos pulmões.

3.5.4 - Infecção em camundongos deficientes no receptor de PAF

3.5.4.1 - Letalidade

Camundongos deficientes no receptor de PAF (PAFR KO) e camundongos C57 selvagens (WT) machos de 8 a 12 semanas foram infectados com os inóculos sub-letal, de 10^4 PFU e letal, de 10^6 PFU. A sobrevivência dos animais foi observada durante 21 dias após a infecção.

3.5.4.2 - Comparação da resposta inflamatória e combate ao vírus

Camundongos PAFR KO e WT foram infectados com os inóculos de 10^6 PFU e 10^4 PFU e sacrificados 5 e 8 dias após a infecção, respectivamente, para que fosse feita uma comparação entre os grupos infectados e seus respectivos controles não infectados, do título viral nos pulmões e dos seguintes marcadores da resposta inflamatória: dosagem de proteínas

totais no BAL; quantificação de células totais, neutrófilos e mononucleares no BAL; quantificação de neutrófilos e macrófagos nos pulmões; análises histopatológicas dos pulmões, quantificação das citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-2, IL-12/IL-23 p40 e IFN- γ e das quimiocinas CXCL1, CXCL2 e CCL5 nos pulmões.

3.5.4.3 - Análise do perfil celular por citometria de fluxo (FACS)

Em um novo experimento, um grupo de animais WT e um grupo de PAFR KO foram infectados com 10⁶ PFU de influenza, como descrito anteriormente, enquanto seus controles – Mock – foram instilados com PBS.

No quinto dia de infecção, os animais foram sacrificados com dose letal de anestésico e foram submetidos ao lavado broncoalveolar com 2 mL de meio RPMI 1640 incompleto (Cultilab) e os seus pulmões foram perfundidos com 5 ml de meio RPMI através da artéria pulmonar na base do coração. Após esse procedimento para remover o excesso de sangue no tecido, os pulmões direitos foram recolhidos e estocados em meio RPMI, enquanto os pulmões esquerdos foram congelados para posterior processamento para Western Blot. Logo depois, os pulmões foram cortados em pequenos pedaços com bisturi e encubados na estufa a 37°C, com colagenase tipo IV (Sigma) – 100 unidades/mL durante 45 minutos. Após a reação com a colagenase, o tecido foi passado em peneiras estéreis (*cell strainer*) de 70 μ m. A solução de pulmão filtrada e o lavado broncoalveolar foram submetidos à lise, para a remoção de hemácias residuais, através da adição de PBS 10x concentrado, seguida imediatamente da adição de água destilada. Por fim, o pellet foi ressuscitado em RPMI incompleto e, a partir dessa solução foi feita uma contagem de células de modo que houvesse 5x10⁵ células por tubo para marcação para a citometria de fluxo. A mesma solução de células em RPMI também foi utilizada para avaliação da atividade respiratória dos leucócitos, como descrito mais adiante. Antes de serem marcadas com os anticorpos fluorescentes, as células foram encubadas com anticorpos *FC Block*, utilizados para evitar a ligação não específica. As populações analisadas e as combinações de anticorpos utilizados estão descritos na tabela 1.

Após a marcação, as células foram lavadas para a remoção de anticorpos não ligados e logo após ressuscitadas em PBS e fixadas com paraformaldeído 4% em PBS/Azida 0.1%. As células marcadas foram adquiridas no citômetro FACScan (Becton Dickinson) do Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB, considerando 40 a 50 mil eventos ou

células, por amostra de pulmão e 15 a 45 mil eventos por amostra de BAL de animais infectados ou 500 a 3000 eventos por amostra de BAL de animais não infectados (Mock). Os dados adquiridos foram analisados no programa FlowJo (Tree Star). A calibração do aparelho com células não marcadas feita no dia da aquisição bem como a marcação dos *gates* contendo as diferentes populações leucocitárias foi feita com o auxílio da aluna de doutorado do Departamento de Bioquímica e Imunologia Érica Leandro Marciano Vieira.

As populações analisadas foram selecionadas através da delimitação de *gates* em que as células em estudo situam-se de acordo com o seu tamanho e granulosidade (Figura 6). As análises de uma determinada população definida nos *gates* foram feitas levando em consideração o marcador constitutivo daquela população, por exemplo, CD3 para linfócitos. Após a determinação dos quadrantes de marcações $-/-$, $+/-$, $-/+$, e $+/+$, os dois quadrantes positivos para o marcador constitutivo eram selecionados para a análise do segundo marcador, por determinação de picos de histograma. Com base nesses picos, definiam-se as duas subpopulações positivas para o primeiro marcador, sendo uma negativa para o segundo marcador e a outra positiva para o segundo marcador. No caso da população de macrófagos e de granulócitos, em que foram avaliadas também os marcadores constitutivos individualmente (F4/80 e GR1, respectivamente), foi utilizado o valor referente à porcentagem da população nos dois quadrantes positivos para aquele marcador, em relação aos eventos adquiridos. Os valores utilizados para a determinação dessas duas subpopulações utilizados foram as porcentagens daquelas subpopulações em relação aos eventos totais adquiridos, no caso das células pulmonares (Figura 7). As células do lavado broncoalveolar foram expressas em número absoluto de células, ajustando-se a porcentagem da subpopulação com a contagem de células após a realização do BAL.

Tabela 1: Marcações utilizadas para análise das populações leucocitárias nos pulmões e nas vias aéreas por citometria de fluxo.

Populações analisadas	Anticorpo	Anticorpo
Linfócitos T CD4+	CD4 FITC (BD Pharmigen TM)	CD3 PE (BD Pharmigen TM)
Linfócitos T CD8+	CD8 FITC (BD Pharmigen TM)	CD3 PE (BD Pharmigen TM)
Células NK (NK1.1+ CD3-) Células NKT (NK1.1+ CD3+)	NK1.1 FITC (BD Pharmigen TM)	CD3 PE (BD Pharmigen TM)
Macrófagos	F4-80 FITC (Biolegend)	CCR5 biotinilado (Biolegend)
Neutrófilos	GR1 FITC (BD Pharmigen TM)	CXCR2 PE (R&D Systems)

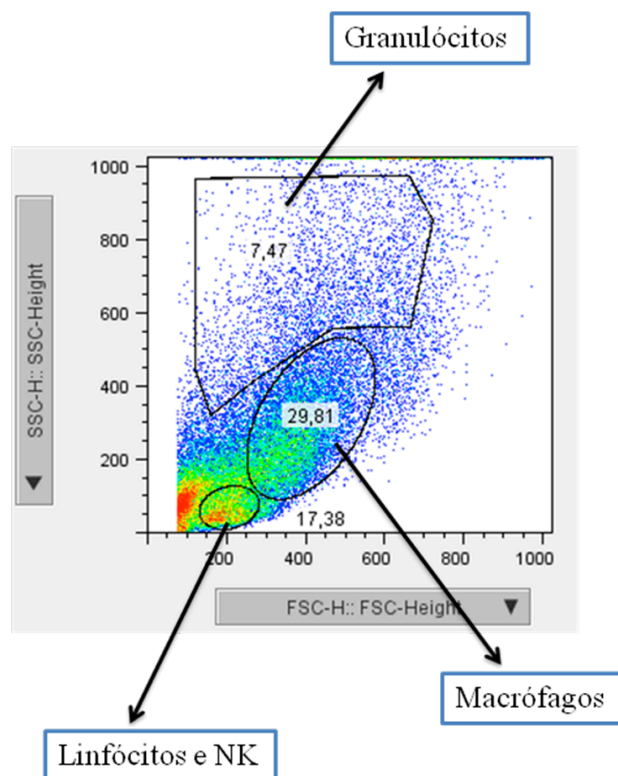


Figura 6: Determinação das regiões (“gates”) referentes às populações leucocitárias analisadas nos pulmões e no BAL

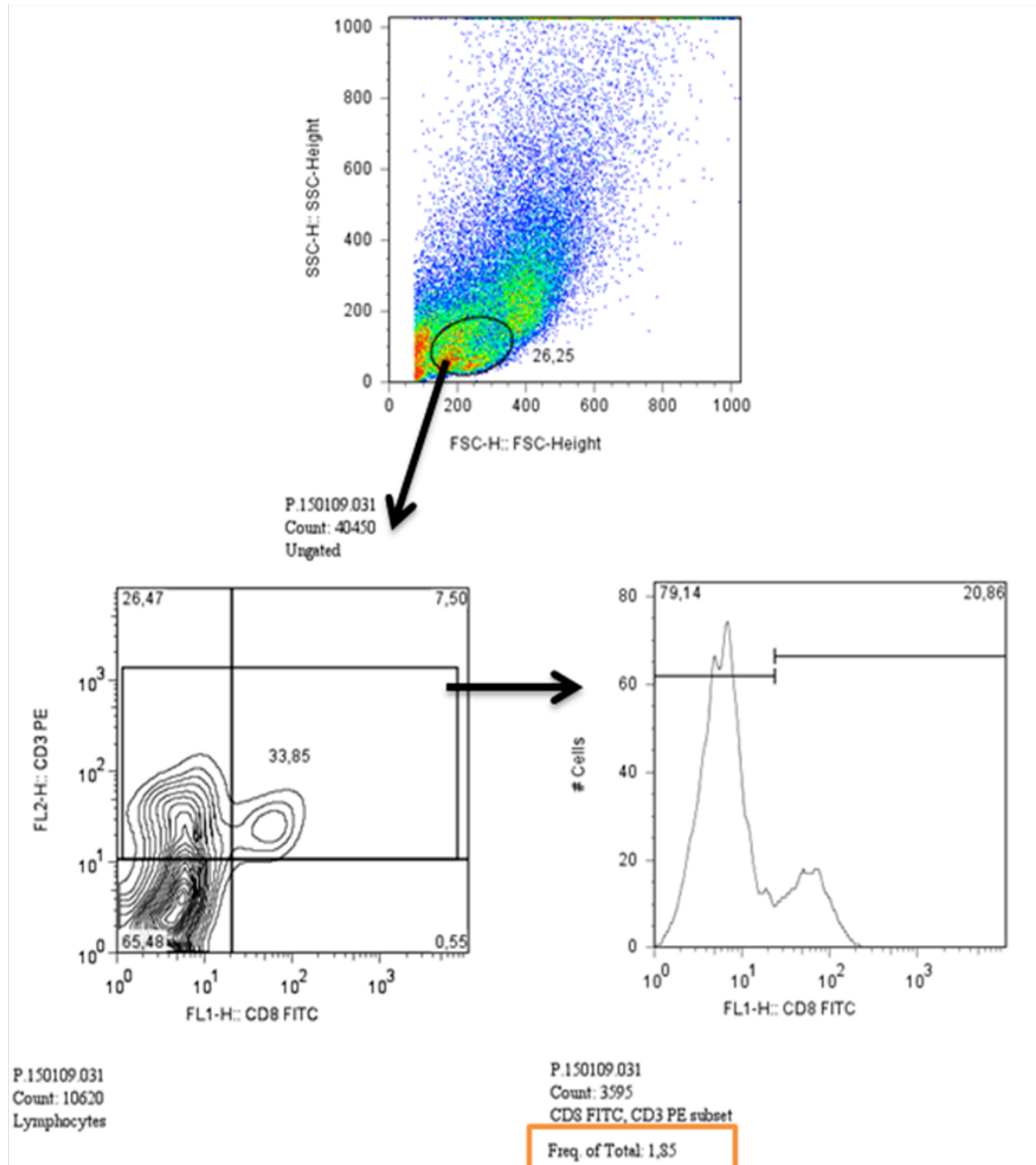


Figura 7: Exemplificação do método empregado para determinação das frequências das subpopulações avaliadas. No primeiro quadro, é mostrada a delimitação do *gate* para linfócitos; em seguida, os quadrantes foram divididos com base na densidade da distribuição de células. Por último, foi selecionada uma área em que as células são, no caso, CD3+. Essa área é analisada em forma de histograma para o segundo marcador, no caso CD8 e a subpopulação positiva em relação ao esse marcador é expressa em frequência do total de eventos adquiridos.

3.5.4.4 - Análise da atividade respiratória induzida por Zimosan

A avaliação da atividade respiratória dos fagócitos, diretamente relacionada à ativação dessas células, foi feita através do ensaio de quimioluminescência dependente de luminol, induzida por Zimosan não opsonizado. Após o processamento dos pulmões com colagenase e após a lise osmótica, as células de cada animal, WT não infectado e infectado com 10^6 PFU do vírus Influenza A/WSN/33 H1N1 e PAFR KO não infectado e infectado com 10^6 PFU de Influenza, ressuspensas em RPMI incolor, foram plaqueadas em triplicata na quantidade de 3×10^5 células por poço, em uma placa de 96 poços. Foi adicionado a cada poço, o luminol na concentração de 5×10^{-5} M e o Zimosan, na proporção de 20 partículas por célula. A luminescência induzida por Zimosan foi medida por um luminômetro no laboratório de Gnotobiologia da Professora Leda Quércia Vieira, por 120 minutos a 37°C , através de 60 ciclos com medidas a cada 2 minutos. A emissão de cada poço foi expressa em unidades relativas de luminescência – RLU. Após a construção de curvas com os pontos de RLU, foram calculadas as áreas sobre cada curva, para comparar os padrões de quimioluminescência dependente de luminol dos grupos.

3.5.4.5 – Análise da sobrevivência celular por ensaio de Anexina V

Visando avaliar a sobrevivência dos leucócitos recrutados para o espaço alveolar, as células de animais WT e PAFR KO não infectados, WT e PAFR KO infectados com 10^6 PFU do vírus Influenza A H1N1 recolhidas através do lavado broncoalveolar com 2 mL de meio RPMI foram processadas como descrito no item anterior para a realização do ensaio de Anexina V. Após a lise de hemácias e contagem de células, uma quantidade de 5×10^5 células foi ressuspensa em 100 μL de *Binding Buffer* (HEPES/NaOH 10 mM, NaCl 140 mM, CaCl_2 2.5 mM) e à essa solução foi adicionado 1 μL de Annexin V FITC (Caltag Laboratories) para incubação por 30 minutos. Após esse período, foram adicionados 400 μL de *Binding Buffer* e, 5 minutos antes da aquisição das células no citômetro FACScan do Departamento de Bioquímica e Imunologia do ICB, foram adicionados 2 μL de PI (Iodeto de Propídio - Caltag Laboratories). Foram adquiridos de 10 a 40 mil eventos por amostra dos animais infectados e 500 a 3500 eventos dos animais não infectados. A análise dos dados foi feita no programa FlowJo (Tree Star). A partir da seleção das populações, foram definidos os 4 quadrantes de acordo com a marcação de Anexina V e PI; a região correspondente às células marcadas com

Anexina V foi avaliada em histograma quanto à incorporação de PI. Finalmente, a população negativa para PI foi expressa em porcentagem dos eventos adquiridos que, posteriormente foi ajustada de acordo com a contagem total de células do BAL, e os resultados foram expressos como número de células do BAL. A determinação dos *gates*, quadrantes e histogramas é exemplificada na figura 8.

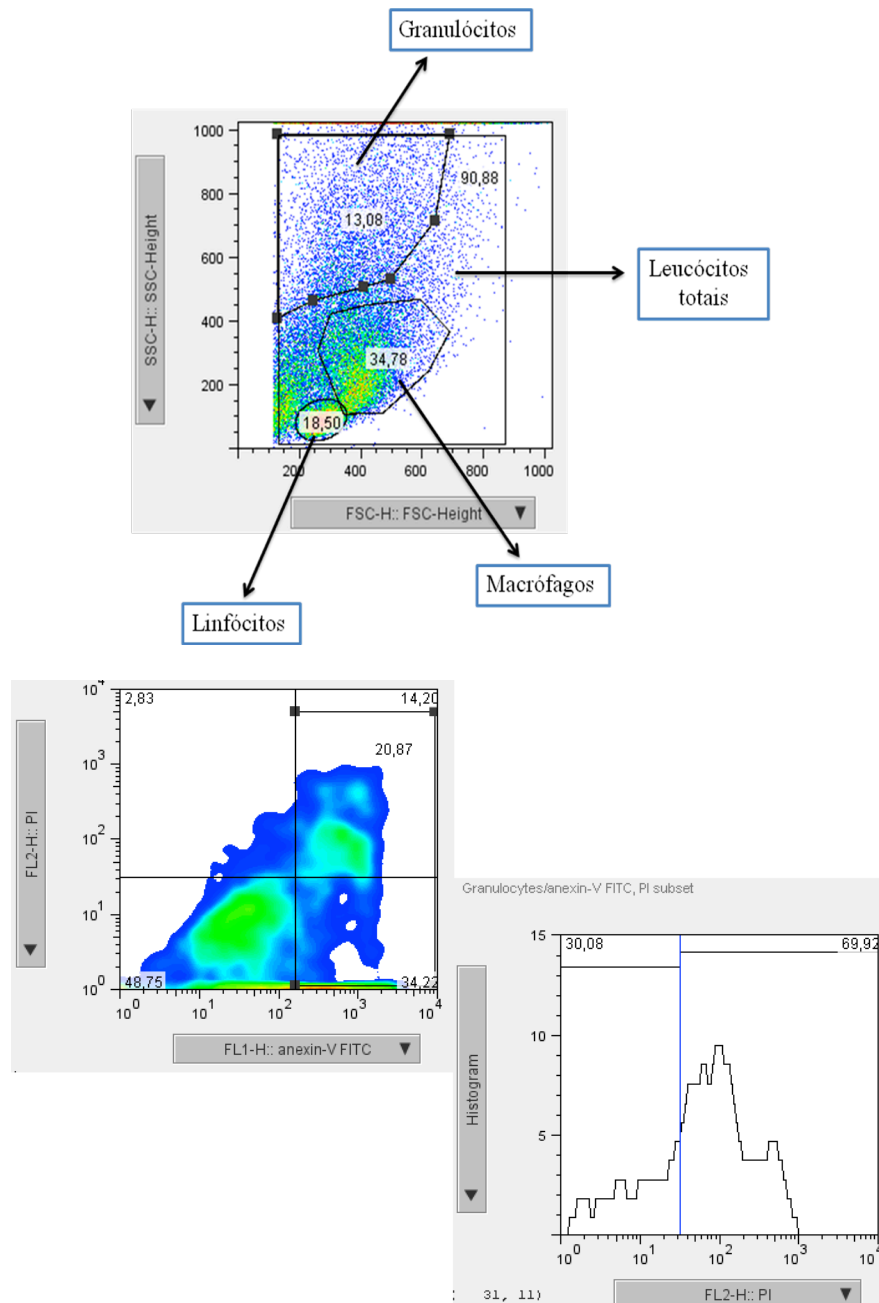


Figura 8: Determinação de populações de células apoptóticas utilizando a marcação com Anexina V. O primeiro quadro mostra as quatro populações delimitadas de acordo com o tamanho e granulocidade. No segundo quadro, a população de granulócitos é dividida em quadrantes com base na densidade da distribuição de células. As células positivas para Anexina V (quadro selecionado) são, na última figura, separadas de acordo com a incorporação de PI.

3.5.5 - Reinfecção

Camundongos WT e PAFR KO foram infectados com um inóculo de 10^3 PFU incapaz de causar qualquer letalidade, da mesma maneira que as infecções descritas anteriormente. Após 14 dias de infecção, esses animais foram novamente anestesiados para a inoculação de 10^6 PFU do vírus. A sobrevivência dos animais foi acompanhada por mais 21 dias e no fim do período, eles foram sacrificados para a coleta de sangue.

3.5.6 - Tratamento com o antagonista do receptor de PAF, PCA 4248

3.5.6.1 - Letalidade

Camundongos C57BL/6 foram anestesiados e infectados com os inóculos de 10^4 e 10^6 PFU via intranasal, como descrito anteriormente. Após três dias de infecção, verificada com a perda de peso, os animais, divididos em grupo veículo e PCA começaram a receber o tratamento de 12 em 12 horas. Os grupos denominados “veículo” receberam 200ul de uma solução de 5% de álcool etílico absoluto (Synth) em PBS estéril por via subcutânea de 12 em 12 horas, do 3º ao 10º dia de infecção. Os grupos de tratamento, denominados “PCA” tratados com 5mg/kg de PCA 4248 (ToCris Bioscience) diluído em 5% de álcool etílico 98% em 95% de PBS estéril. O volume total administrado por animal foi de 200 µL, de 12 em 12 horas, do terceiro ao décimo dia de infecção. A letalidade e a perda de peso decorrentes da infecção foram monitoradas por 21 dias.

3.5.6.2 - Resposta inflamatória e combate ao vírus

Para a comparação da inflamação associada à infecção viral com 10^6 PFU do vírus Influenza A/WSN/33 H1N1 entre os grupos tratados com veículo e com o antagonista de PAFR, PCA 4248, o mesmo protocolo de tratamento foi utilizado. Entretanto, os animais tratados ou não foram sacrificados no quinto dia de infecção para a realização de lavado broncoalveolar, coleta de sangue e pulmões. Foram avaliados: a quantidade de proteínas totais no BAL; o recrutamento de leucócitos para as vias aéreas (células totais, neutrófilos e mononucleares); o recrutamento de neutrófilos para os pulmões (MPO); a produção das

citocinas IL-1 β , TNF- α nos pulmões e IL-6 nos pulmões e no soro e das quimiocinas CXCL1, CCL2, CCL3 e CCL5 nos pulmões e no BAL. Além disso, foram feitas análises histopatológicas dos pulmões que também foram utilizados para a verificação do título viral.

3.5.6.2 - Combinação com o inibidor de Neuraminidase Fosfato de Oseltamivir (Tamiflu[®])

Em um segundo experimento, foi verificado o efeito da combinação do tratamento com o inibidor do receptor de PAF com um antiviral inibidor da Neuraminidase. Para isso, um grupo não infectado (Mock) e quatro grupos infectados com 10⁶ PFU e tratados com diferentes fármacos, foram acompanhados quanto à letalidade e perda de peso por 21 dias. No quinto dia de infecção, 5 a 6 animais de cada grupo foram sacrificados para realização de lavado broncoalveolar, para medida do recrutamento celular, coleta dos pulmões para ensaio de MPO e verificação do título viral. Os grupos e protocolo de tratamento utilizado foram:

- 1- Mock – não infectados, não tratados;
- 2- Veículo – infectados com 10⁶ PFU e tratados com o veículo dos fármacos utilizados, 100 μ L de salina 0,9% via oral pela manhã e 200 μ L da solução de 5% de álcool etílico em PBS estéril via subcutânea de noite, do terceiro ao décimo dia de infecção;
- 3- PCA – infectados com 10⁶ PFU e tratados com 5mg/kg de PCA 4248 duas vezes ao dia, do terceiro ao décimo dia de infecção;
- 4- Tamiflu – infectados com 10⁶ PFU e tratados com 100 μ L via oral de uma solução contendo 1mg/kg de Tamiflu[®], diluído em salina 0,9%, duas vezes ao dia, do terceiro ao décimo dia de infecção;
- 5- PCA + Tamiflu – infectados com 10⁶ PFU e tratados com PCA 4248 e Tamiflu[®], nas mesmas concentrações, volumes e vias de administração que os grupos 3 e 4, duas vezes ao dia, do terceiro ao décimo dia de infecção.

3.6 – MODELO EXPERIMENTAL DE INFEÇÃO PELO VÍRUS INFLUENZA A (EQUINE/CORDOBA/18/1985 - YAMAGATA/32/1989) H3N1

3.6.1 – Adaptação do vírus H3N1 a camundongos

Para que o vírus H3N1 Equine/Cordoba/18/1985 - Yamagata/32/1989, usado em infecções *in vitro* se tornasse adaptado a camundongos, foram realizadas três passagens pulmonares nesses animais. O procedimento consistiu em uma primeira infecção via intranasal com 10^4 PFU do vírus H3N1 em 5 animais. Após 5 dias, esses animais foram sacrificados e tiveram os pulmões recolhidos para titulação, como descrito no item 3.8.8. O pulmão do animal que apresentou o maior título, de 10^5 PFU, foi utilizado para uma nova infecção intranasal. Para essa infecção, o macerado do pulmão foi filtrado com filtro de $0.45\mu\text{m}$ e 100 PFU foram inoculados em 5 animais. O processo de seleção do pulmão com maior título viral se repetiu e uma terceira infecção com 100 PFU gerou um vírus que, após infecção em células MDCK possuía título de 5×10^7 PFU e foi utilizado nos experimentos descritos a seguir.

3.6.2 – Determinação do inóculo letal

Para verificar o potencial do vírus de causar patologia em camundongos C57BL/6J, após dois ciclos de adaptação em camundongos, foram utilizados quatro diferentes inóculos do mesmo para infecção intranasal – 10^3 , 10^4 , 10^5 e 10^6 PFU. A perda de peso e a letalidade foram monitoradas diariamente durante 21 dias após a infecção.

3.6.3 – Resposta inflamatória

Um grupo de animais foi infectado com 10^6 PFU do vírus H3N1 e sacrificado no quinto dia de infecção para coleta de sangue para hematócrito, realização de lavado broncoalveolar e retirada de pulmões para avaliação do recrutamento de células e do extravasamento protéico em decorrência da infecção. Os tecidos foram processados juntamente com os tecidos de animais infectados com o mesmo inóculo do vírus H1N1

WSN/33 e sacrificados no quinto dia de infecção. Os dados dos dois subtipos de vírus foram comparados quanto à magnitude da resposta inflamatória em cinco dias de infecção em resposta a diferentes vírus.

3.6.4 - Infecção em camundongos deficientes no receptor de PAF

Camundongos C57 selvagens (WT) e deficientes no receptor de PAF (PAFR KO) foram infectados com 10^6 PFU do vírus H3N1 e acompanhados diariamente quanto à perda de peso e letalidade por 21 dias.

3.7 – SACRIFÍCIO E COLETA DE TECIDOS

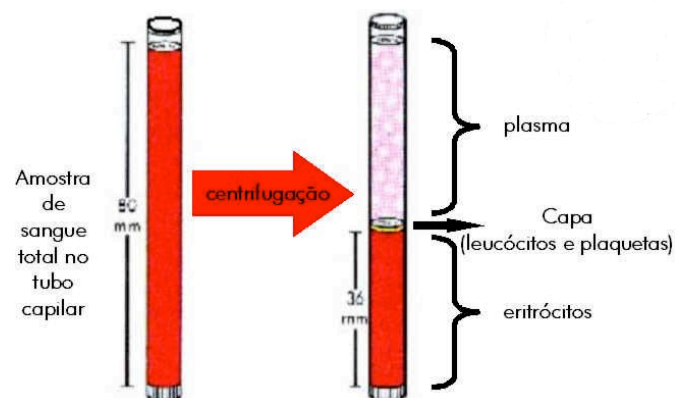
Antes de serem sacrificados, os animais foram anestesiados com uma solução de anestésico contendo 150mg/kg de cetamina e 10mg/kg de xilazina. Através de uma incisão na artéria braquial, foi coletado cerca de 1 mL de sangue dos animais, para a subsequente separação do soro para detecção de citocinas através do ELISA. Uma pequena fração do sangue foi também recolhida por meio de um capilar de vidro para análise dos níveis de hematócrito. Após a morte por choque hipovolêmico, os animais foram submetidos à exposição da traquéia para a realização do lavado broncoalveolar (BAL), para recolher os leucócitos do espaço alveolar. O lavado consiste na introdução, através de uma cânula de 1,7 mm conectada a uma seringa, de 1 mL de PBS no pulmão, sendo que esse volume é recolhido e reintroduzido 3 vezes. Para a obtenção de uma quantidade satisfatória de células, o lavado é realizado em duas etapas, totalizando 2 mL de PBS, de uma forma que 70% a 90% do volume total seja recuperado. Após a realização do BAL, os animais tiveram os seus pulmões extraídos e divididos em duas porções: o pulmão esquerdo foi alocado em tubos de 15 mL contendo 10 mL de uma solução de Formaldeído 10% tamponado em PBS para posterior processamento histológico; e o pulmão direito foi congelado para posterior processamento

para ensaios de Mieloperoxidase neutrofílica (MPO), N-acetil-glicosaminidase (NAG) e ELISA para quantificação de quimiocinas e citocinas.

3.8 – ENSAIOS E ANÁLISES COM TECIDOS

3.8.1 - Análise do índice de hematócrito

Os tubos capilares heparinizados (Perfecta) com as amostras de sangue recolhidas foram centrifugados na centrífuga de micro-hematócrito (Centrifuge Hematocrit HT) por 10 minutos. Após a centrifugação, as medidas em centímetros do volume total e do volume de eritrócitos foram tomadas, como mostrado na figura 9, para chegar ao índice de hematócrito. A porcentagem do volume de eritrócitos para o volume total representa o índice de hemoconcentração, sendo que a maior porcentagem indica extravasamento plasmático para sítios inflamatórios e a menor porcentagem representa a perda de eritrócitos, ou seja, hemorragia.



Retirado de <http://www6.ufrgs.br/favet/lacvet/hematocrito.htm>

Figura 9: Esquema representativo de hematócrito.

3.8.2 - Contagem total e diferencial de células

O BAL foi submetido à centrifugação a 4°C a 1200 RPM por 5 minutos. O sobrenadante foi recolhido e congelado, para posterior dosagem de quimiocinas e proteínas totais, enquanto o pellet foi ressuspensionado em 100 µL de BSA 3%. Uma alíquota das células em albumina foi diluída 10 vezes na solução de lise de hemácias Turk (IMBRALAB), para a realização da contagem total de células, na câmara de Neubauer. A partir dessa contagem, foram preparadas lâminas de Cytospin com as células ressuspensas em albumina, de forma que a lâmina de Cytospin contivesse aproximadamente 40 mil células. Tais lâminas foram coradas com os corantes do kit Panótico Rápido (LB Laborclin), para a realização da contagem diferencial de células no aumento de 100 vezes no microscópio ótico. As células foram diferenciadas em mononucleares (incluindo macrófagos, monócitos e linfócitos), neutrófilos e eosinófilos, através de três contagens em campos aleatórios totalizando cem células em cada contagem.

3.8.3 - Dosagem de proteínas totais no lavado broncoalveolar (BAL)

Para realizar a dosagem de proteínas presentes no BAL, foi utilizado o kit Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad Laboratories EUA) baseado no método de Bradford. O ensaio envolve a adição de um corante ácido à amostra do BAL e a uma curva padrão de Albumina Bovina fração V (INLAB). O volume de 2 µL de cada amostra e da curva são adicionados, em duplicata, a uma microplaca de 96 poços (NUNC) e sobre as amostras são adicionados 200 µL do corante diluído 5 vezes em água destilada, com o auxílio de uma pipeta multicanal, homogeneizando o conteúdo dos poços. Após cerca de 5 minutos de incubação, a leitura é feita em espectrofotômetro (Spectra Max 190, Molecular Devices) a 595 nm. A absorbância das amostras é comparada com a absorbância da curva, com concentrações variando de 0.063 mg/mL a 2 mg/mL e os resultados são expressos em mg/mL.

3.8.4 - Processamento dos pulmões para ensaios de Mieloperoxidase (MPO), N-acetil-glicosaminidase (NAG) e ELISA

A partir de 100 mg de pulmão, 1 ml de solução de extração de citocinas (NaCl 0.4 M, NaPO₄ 10 mM, PMSF 0.1 mM, cloreto de benzetônio 0.1 mM, EDTA 10 mM, Tween 20 0.05%, 0.5% de BSA, 20 KI de aprotinina) foi adicionado para o processamento em homogeneizador de tecidos (Power Gen 125 - Fisher Scientific Pennsylvania, EUA). Após centrifugação por 10 minutos, a 4°C a 10000 RPM, o sobrenadante foi recolhido em tubos de 1.5 mL e congelado a -20°C para a detecção de quimiocinas e citocinas por ELISA. A partir do *pellet* o processamento seguiu para a detecção das enzimas Mieloperoxidase (MPO) e N-acetil-glicosaminidase (NAG). Para isso, o *pellet* foi homogeneizado em 1.9 mL do Tampão 1, no pH 4.7, contendo 0.1 M de NaCl, 0.02 M de NaPO₄, 0.015 M de NaEDTA e centrifugado por 10 minutos, a 4°C a 10000 RPM. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* foi submetido à lise de hemácias através da adição de 1.5 mL de NaCl 0.2% e após um período de aproximadamente 30 segundos, foi feita a adição de 1.5 mL de uma solução de NaCl 1.6% com glicose 5% e a solução final foi homogeneizada e dividida igualmente em dois tubos de 2 mL que foram centrifugados por 10 minutos, a 4°C a 10000 RPM. O sobrenadante foi novamente desprezado e a cada tubo devidamente identificado (NAG e MPO) foram adicionados 800 µL de salina 0.9% com 0.1% de Triton X-100, para o ensaio de NAG; ou 800 µL de Tampão fosfato (0.05 M de Na₃PO₄ e 0.5% de HETAB em pH 5.4) para o ensaio de MPO. Cada solução foi homogeneizada e congelada em freezer -20°C para posterior realização de ensaio enzimático.

3.8.5 - Ensaio de MPO

O tecido processado foi submetido a três ciclos de congelamento e descongelamento em nitrogênio líquido para liberação da enzima das vesículas citoplasmáticas e centrifugado a 4°C por 15 minutos a 10000 RPM. O sobrenadante, diluído em Tampão fosfato (0.05 M de Na₃PO₄ e 0.5% de HETAB em pH 5.4) na proporção de 1:5, foi utilizado para o ensaio enzimático. A reação se inicia com a adição de 25 µL de tetrametilbenzidina (TMB, Sigma) diluída em dimetilsulfoxido (DMSO, Synth) na concentração final de 1.6mM a 25 µL da amostra diluída em uma placa de 96 poços (NUNC). A placa é levada a uma estufa a 37°C

por 5 minutos e depois são adicionados 100 µL de peróxido de hidrogênio 0.003% em Tampão fosfato e em seguida é feita uma nova incubação a 37°C por 5 minutos. Para o término da reação, adiciona-se 100 µL de H₂SO₄ 1M e a atividade da mieloperoxidase é calculada pela medida das alterações na densidade óptica (OD) a 450 nm. Os resultados foram expressos como número total de neutrófilos em 100 mg de tecido, a partir da comparação com a curva padronizada no Laboratório de Imunofarmacologia. Tal curva refere-se à OD resultante da atividade de MPO de neutrófilos purificados e igualmente processados, obtidos da cavidade peritoneal de camundongos, após indução com caseína 5% (RUSSO et al., 2009)

3.8.6 - Ensaio de NAG

O tecido processado foi centrifugado a 4°C por 10 minutos a 3000 RPM e o sobrenadante diluído na proporção de 1:2 em Tampão citrato/fosfato (Ácido cítrico 0.1 M, Na₂HPO₄ 0.1M, em pH 4.5) para ser usado no ensaio. A reação se inicia com a adição, a 100 µL das amostras diluídas em uma placa de 6 poços (NUNC), de 100 µL de p-nitrofenil-N-acetil-β-glicosaminidina (Sigma) diluído em Tampão citrato/fosfato na concentração de 2.24M para posterior incubação a 37°C por 10 minutos. Após essa incubação, a reação é interrompida pela adição de 100 µL de Tampão Glicina 0.2 M (pH 10.6) e a placa é submetida à leitura da absorbância das amostras a 405 nm em espectrofotômetro (Spectra Max 190, Molecular Devices). O conteúdo de macrófagos é calculado com base em uma curva-padrão de NAG, feita com diluições seriadas de macrófagos peritoneais, em concentração conhecida, recolhidos de camundongos estimulados com 3mL tioglicolato 3% (BARCELOS et al., 2005)

3.8.7 - Ensaio de ELISA

Os pulmões processados, diluídos três vezes em PBS contendo 0.1% de albumina bovina (Sigma), o BAL ou o soro foram utilizados para ensaio de ELISA para a detecção das citocinas IL-1β, IL-6, TNF-α, IL-2 e IL-12/IL-23 P40 e das quimiocinas CXCL1, CXCL2, CCL2, CCL3 e CCL5 através do protocolo estabelecido no kit de ELISA murino da R&D

Systems, em placa de 96 poços. Os anticorpos de captura foram diluídos em PBS, pH 7.4, sendo que a sensibilização ocorre durante 18 horas à 4° C. O bloqueio da reação foi feito com PBS acrescido de 1% de albumina bovina. A detecção se dá pela incubação com estreptavidina conjugada com peroxidase (“*HRP-Streptavidin Pharmingen*” - 1:4000) e revelada com OPD (*o-phenylenediamine dihydrochloride* - Sigma). Após cerca de 30 minutos a reação é interrompida com H₂SO₄ 1 M.

A leitura foi feita no espectrofotômetro (Spectra Max 190, Molecular Devices) com filtro para um comprimento de onda de 492 nm.

3.8.8 - Titulação viral

Os fragmentos de pulmões coletados em fluxo laminar para a titulação viral foram estocados a -70°C até o momento do processamento para a titulação. Os tubos contendo os fragmentos de tecidos foram pesados e a cada um deles foram adicionados 2 mL de uma solução estéril de PBS. Os tecidos foram triturados com o auxílio de um homogeneizador de tecidos (Power Gen 125 - Fisher Scientific Pennsylvania, EUA). Após a formação do homogenato, os tubos foram centrifugados e o sobrenadante foi recolhido, aliquotado e estocado a -70°C.

A carga viral presente nos pulmões dos animais infectados foi determinada através da técnica de titulação por placa de lise sob agarose em monocamadas de células MDCK. Placas de cultivo celular de 6 poços foram utilizadas para o crescimento de células MDCK a 37°C, 5% de CO₂ durante 24 horas, de modo que ao final do período de cultivo, cada poço contivesse 8x10⁵ células. No momento da titulação, os tecidos processados foram submetidos a seis diluições decimais seriadas em meio DMEM completo sem soro. O meio de cultura das células foi retirado e as monocamadas foram lavadas com 2 mL de meio DMEM completo sem soro. Os tecidos diluídos foram adicionados aos poços das placas de cultura (400 µL de homogenato/poço). As células infectadas foram incubadas durante 1 hora a 35° C em estufa com 5% de CO₂ para a adsorção das partículas virais. Em seguida, as monocamadas foram cobertas com meio de cultura DMEM completo suplementado com 2% de soro fetal bovino e agarose na concentração de 20 mg/mL, totalizando 4 mL de meio com agarose por poço.

As placas foram incubadas por mais 72 horas a 35° C e atmosfera de 5% de CO₂. Após esse período, foi possível observar o aparecimento de placas de lise nas monocamadas de células infectadas. Através da coloração com cristal de violeta, após a remoção do meio de cultura suplementado com agarose e fixação com solução de formaldeído 10%, foi possível contar o número de placas de lise. A carga viral foi determinada a partir da seguinte fórmula:

$$\frac{\text{número de placas de lise} \times \text{diluição} \times 2,5}{\text{peso do fragmento (g)}}$$

Os valores obtidos foram expressos em unidades formadoras de placas de vírus por grama de pulmão.

3.8.9 - Histologia

Os pulmões esquerdos foram recolhidos em tubos contendo 10 mL de solução de formol 10% tamponado. O processamento para histologia foi feito pelas técnicas do laboratório de Patologia Comparada, sob coordenação do Professor Geovanni Dantas Cassali, do Departamento de Patologia. Os tecidos foram incluídos em parafina, cortados em micrótomos, fixados em lâminas histológicas e corados com Hematoxilina e Eosina. As análises das lâminas foram feitas pelo Professor Geovanni em microscópio ótico com aumento objetivo de 10 e 60 vezes para determinação do padrão inflamatório e do grau de dano tecidual provocado pela infecção viral. Campos de imagens representativos de cada grupo foram capturadas e fotografadas no Microscópio Olympus Bx41.

3.9 –ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). As diferenças entre as médias foram comparadas utilizando-se análise de variância (ANOVA) com pós-testes de Student-Newman-Keuls. Na comparação entre dois grupos foi utilizado o teste t de Student não pareado. Os resultados foram considerados significativos quando valor de $p < 0.05$. Para a construção dos gráficos, foi utilizado o software GraphPad PRISM 4. A exclusão de valores que se portaram como outliers foi feita através do teste de Grubbs, com nível de significância igual a 0.05. As curvas de letalidade, construídas no mesmo software, foram comparadas utilizando o teste Log-rank qui-quadrado. Diferenças entre os grupos infectados e seus respectivos controles não-infectados, com $p < 0.05$ foram representadas graficamente com um asterisco (*); diferenças com $p < 0.01$ foram representadas com dois asteriscos (**) e com $p < 0.001$ com três asteriscos (***) ; diferenças entre os grupos infectados – WT versus KO, Veículo versus Tratamento, H1N1 versus H3N1 – foram representadas graficamente com o um símbolo (#); diferenças com $p < 0.01$ foram representadas com dois símbolos (##) e com $p < 0.001$ com três símbolos (###).

4 - Resultados

4– MODELO EXPERIMENTAL DE INFECCÃO PELO VÍRUS INFLUENZA A/WSN/33 H1N1

4.1.1 – Padronização da Curva de Letalidade

Foram utilizados quatro inóculos do vírus Influenza A/WSN/33 H1N1 – 10^3 , 10^4 , 10^5 e 10^6 PFU – para a determinação da dose letal para 50% dos animais (DL-50). Quando infectados com 10^6 PFU, todos os animais sucumbiram à infecção em 7 dias; a infecção com 10^5 PFU levou à 100% de letalidade em 9 dias (Figura 10 a). O inóculo de 10^4 PFU causou a morte de 45% dos animais infectados e uma perda de peso progressiva até 8º dia de infecção, seguida de uma recuperação gradual até o fim do período de observação (Figura 10 b). O inóculo de 10^3 PFU não induziu letalidade nem perda de peso nos animais infectados.

4.1.2 - Cinética da resposta inflamatória

Com o objetivo de caracterizar a resposta inflamatória decorrente da infecção experimental pelo vírus Influenza A/WSN/33 H1N1, dois inóculos do vírus foram escolhidos, um inóculo letal, contendo 10^6 PFU e um inóculo sub-letal, com 10^4 PFU. Uma vez que a infecção com o inóculo de 10^6 PFU leva a uma letalidade de 100% em 7 dias de infecção, foram escolhidos os dias 1, 3 e 5 pós infecção para o sacrifício dos animais e coleta de tecidos. Por outro lado, sabendo-se que o curso da letalidade associada à infecção com o inóculo de 10^4 PFU dá-se de forma mais tardia, foram escolhidos os dias 1, 4, 7 e 10 após a infecção, para a avaliação dos mesmos parâmetros.

Os primeiros resultados mostram o caráter progressivo e inóculo-dependente dos sinais associados à gravidade da doença tais como perda de peso, níveis de hematócrito e quantidade de proteína total no BAL (Figura 11). Houve uma perda de peso significativa a partir do 4º dia de infecção causada pelo inóculo de 10^4 PFU (Figura 11 a) e a partir do 3º dia de infecção pelo inóculo de 10^6 PFU, sendo que, com o inóculo maior, foi possível observar um agravamento da doença mais precocemente (Figura 11 b). Os níveis de hematócrito, que refletem a perda de plasma sanguíneo para sítios de inflamação e infecção, mostraram-se elevados a partir do 4º dia de infecção pelo inóculo de 10^4 PFU (Figura 11 c) e a partir do primeiro dia de infecção pelo inóculo de 10^6 PFU (Figura 11 d), aumentando

progressivamente, em ambos os inóculos durante o curso da infecção. De maneira semelhante, os níveis de proteínas totais presentes no lavado broncoalveolar aumentam ao longo do curso da infecção e foram mais elevados com o inóculo maior; porém, seus níveis só estiveram elevados a partir do 7º dia de infecção para o inóculo de 10^4 PFU (Figura 11 e) e a partir do 3º dia de infecção pelo inóculo de 10^6 PFU (Figura 11 f), posteriormente ao que foi encontrado para os níveis de hematócrito.

O recrutamento de leucócitos para o espaço alveolar em resposta à infecção também se mostrou inóculo-dependente, mas não ocorreu de forma progressiva. O pico no acúmulo de leucócitos totais e de células mononucleares ocorreu no 7º dia de infecção pelo o inóculo de 10^4 PFU (Figura 12 a, c); os neutrófilos tiveram aumento máximo no 4º dia de infecção, seguido de redução no 10º dia (Figura 12 e). Quando a infecção foi feita com o inóculo de 10^6 PFU, os picos de leucócitos totais e de neutrófilos ocorreram no 3º dia de infecção, sendo que no 1º dia de infecção já foi possível notar um aumento no recrutamento de neutrófilos (Figura 12 b, f), enquanto os níveis de mononucleares mantêm-se igualmente elevados no dias 3 e 5 após a infecção (Figura 12 d). Outra característica interessante é o aumento da magnitude do recrutamento celular paralelo ao aumento da carga viral utilizada, que foi possível de ser observada pelo número quase duas vezes maior de leucócitos totais encontrados (Figura 12 a, b) e mais de duas vezes maior de neutrófilos (Figura 12 e, f).

O acúmulo de leucócitos nos pulmões pôde ser quantificado por ensaios que medem a atividade de enzimas presentes em certas populações celulares, como a mieloperoxidase (MPO), enzima com alta expressão em neutrófilos e, usada como marcador da presença dessas células (RUSSO *et al.*, 2009); e a N-acetil-glicosaminidase (NAG), presente em macrófagos e, da mesma maneira, usada como marcador de macrófagos (BARCELOS *et al.*, 2005). Através da dosagem de MPO, observou-se um aumento no recrutamento de neutrófilos para os pulmões de camundongos infectados com 10^4 PFU apenas no 4º dia de infecção (Figura 13 a); a diminuição nos níveis de neutrófilos nos dias subseqüentes pode ser explicada pela transmigração dessas células para o espaço alveolar. Na infecção com 10^6 PFU, ocorreu um acúmulo de neutrófilos em todos os dias analisados, mas que é menor no 5º dia de infecção (Figura 13 b). Os níveis de NAG a partir do 4º dia de infecção pelo inóculo de 10^4 PFU (Figura 13 c) e somente no 5º dia de infecção pelo inóculo de 10^6 PFU (Figura 13 d) foram maiores que os encontrados em animais não infectados.

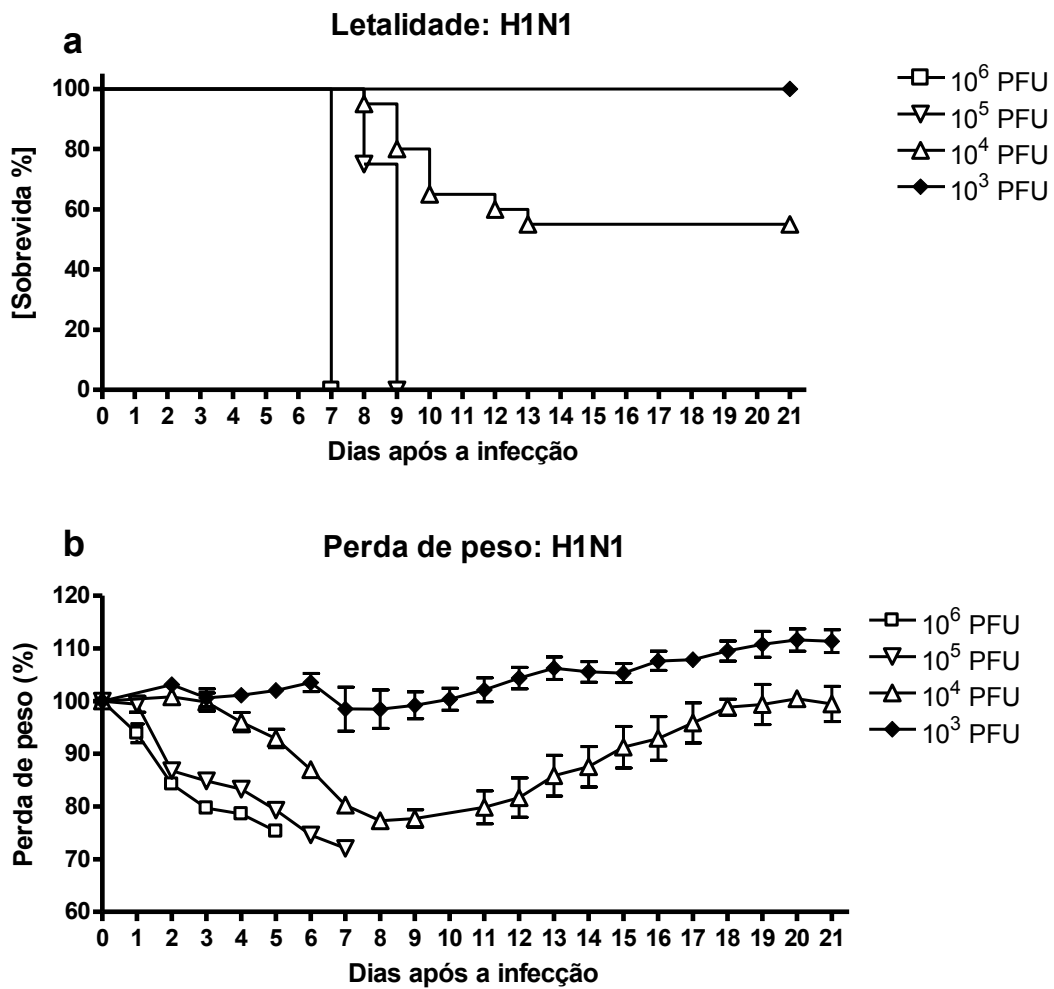


Figura 10: Letalidade (a) e perda de peso (b) observadas após infecção com os inóculos de 10^3 , 10^4 , 10^5 e 10^6 PFU do vírus Influenza A/WSN/33 H1N1. Os grupos foram de 4-6 animais e os resultados de perda de peso estão expressos em média \pm EPM. O grupo 10^4 PFU representa dois experimentos independentes com n de 6 por grupo.

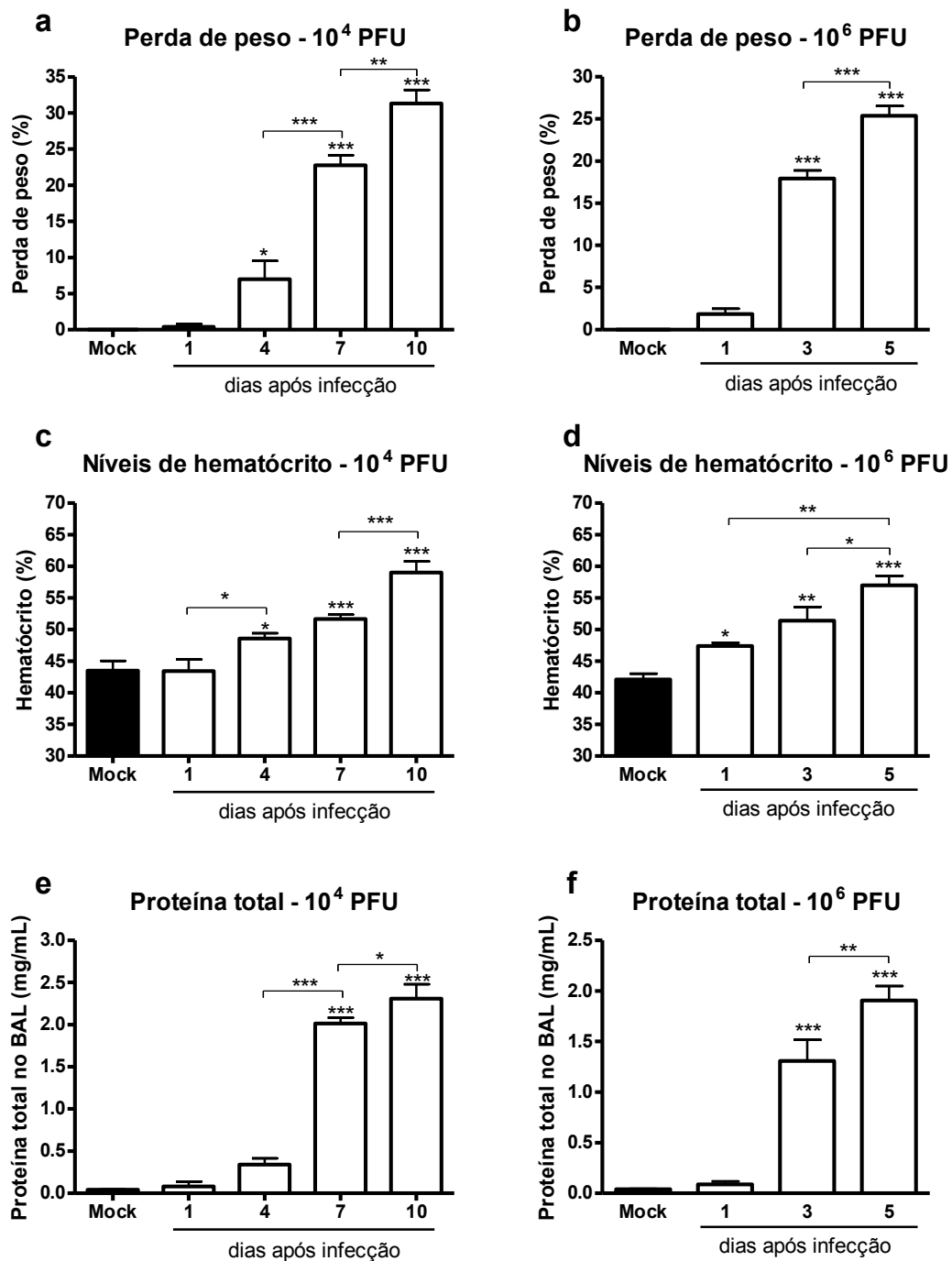


Figura 11: Perda de peso (a, b), aumento nos níveis de hematócrito (c, d) e nos níveis de proteínas totais no lavado broncoalveolar (e,f) observados após a infecção pelo vírus Influenza A/WSN/33 H1N1 nos inóculos de 10^4 PFU (a, c, e) e 10^6 PFU (b, d, f). Os resultados apresentam a média \pm EPM de 3-6 animais por grupo e foram representados com * para $p < 0.05$, ** para $p < 0.01$ e *** para $p < 0.001$ em relação ao grupo não infectado ou quando comparados entre os grupos indicados (—); teste *One-Way* ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls.

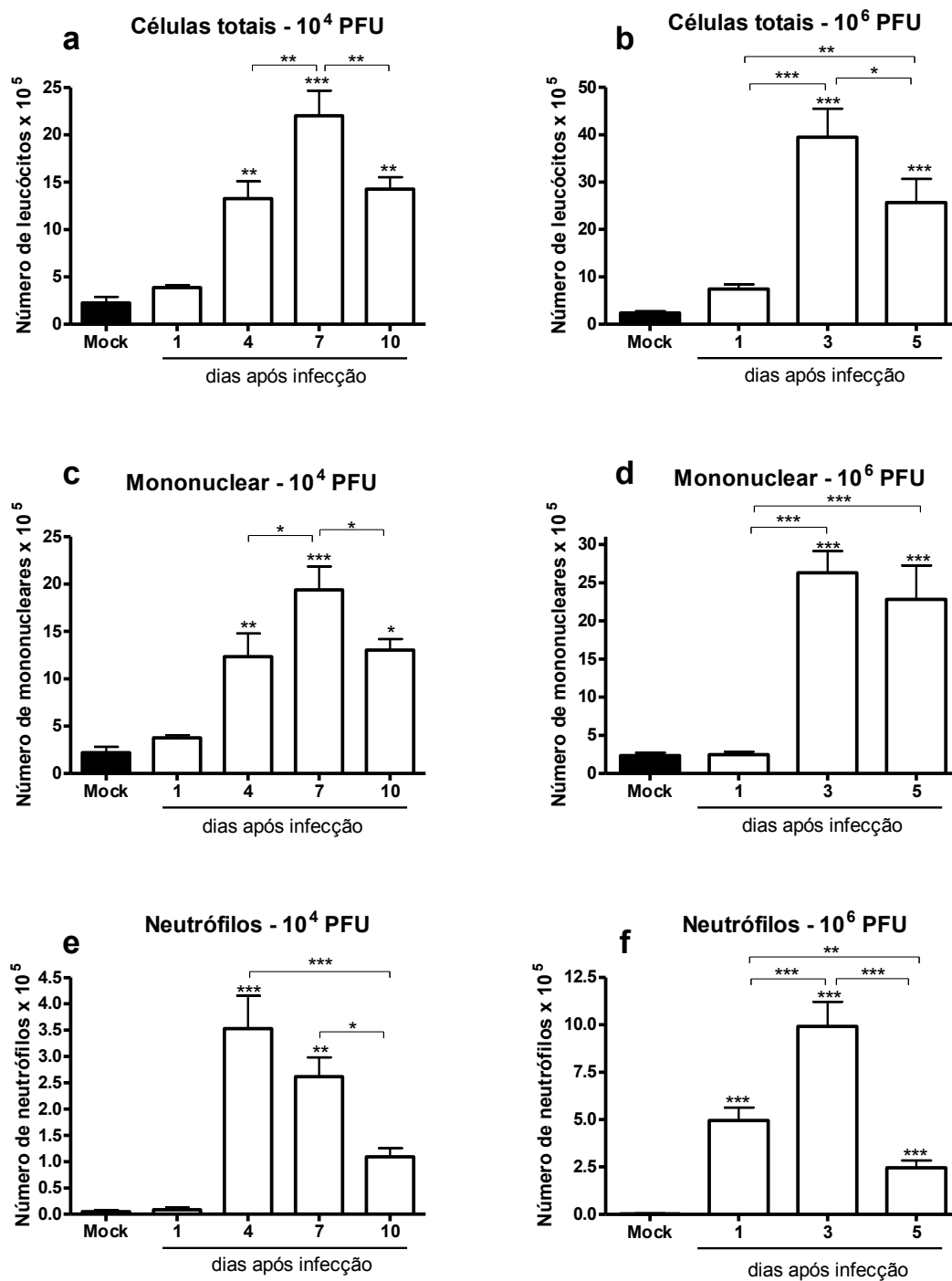


Figura 12: Recrutamento de leucócitos totais (a, b), células mononucleares (c, d) e neutrófilos (e,f) para o espaço alveolar observados após a infecção pelo vírus Influenza A/WSN/33 H1N1 nos inóculos de 10⁴ PFU (a, c, e) e 10⁶ PFU (b, d, f). Os resultados apresentam a média ± EPM de 4-10 animais por grupo e foram representados com * para p<0.05, ** para p<0.01 e *** para p<0.001 em relação ao grupo não infectado ou quando comparados entre os grupos indicados (—); teste *One-Way* ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls.

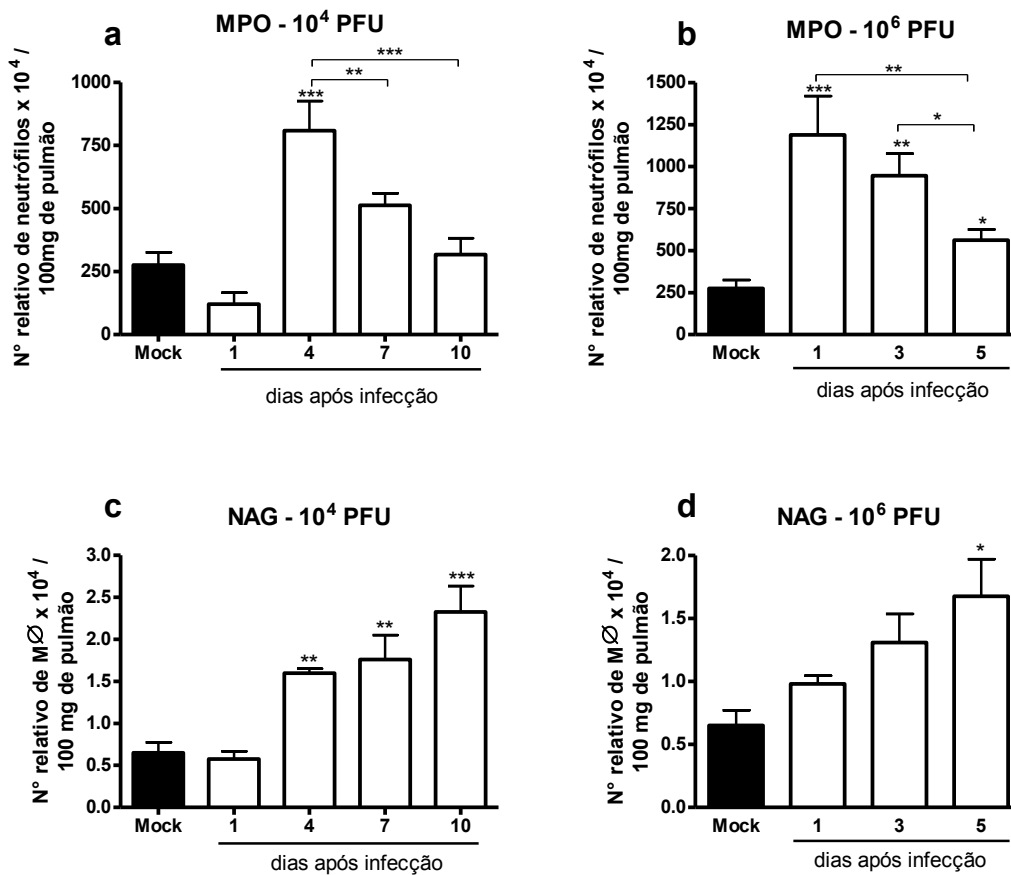


Figura 13: Medida indireta do recrutamento de neutrófilos (a, b) e macrófagos (c, d) para os pulmões após a infecção pelo vírus Influenza A/WSN/33 H1N1 nos inóculos de 10⁴ PFU (a, c, e) e 10⁶ PFU (b, d, f). Os resultados apresentam a média ± EPM de 4-9 animais por grupo e foram representados com * para p<0.05, ** para p<0.01 e *** para p<0.001 em relação ao grupo não infectado ou quando comparados entre os grupos indicados (---); teste *One-Way* ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls.

Na caracterização da resposta inflamatória em resposta ao vírus Influenza A/WSN/33 H1N1, foram medidos os níveis das duas principais quimiocinas quimioatrativas para neutrófilos – CXCL1/KC e CXCL2/MIP-2 – nos dois compartimentos para os quais os neutrófilos são recrutados: as vias aéreas (medida no BAL) e os pulmões. A quimiocina CCL2/MCP-1, relacionada na literatura como um dos marcadores pró-inflamatórios após infecções por Influenza (JULKUNEN et al., 2001) foi quantificada nos pulmões assim como a citocina pró-inflamatória TNF- α . A IL-6, também conhecida por sua atividade pró-inflamatória e por sua correlação à severidade e aos sintomas das gripes (LA GRUTA et al., 2007), foi quantificada no soro dos animais infectados e não infectados (Figuras 15).

Após a infecção com 10^4 PFU, os níveis da quimiocina CXCL1 tiveram pico no 4º dia tanto no BAL (Figura 14 a) quanto nos pulmões (Figura 14 b), reduzindo-se ao longo dos dias de infecção. Já a quimiocina CXCL2 apresentou um aumento mais precoce nos dois compartimentos pulmonares, já no primeiro dia, decaindo a partir do 10º dia no BAL (Figura 14 c) e a partir do 7º dia nos pulmões (Figura 14 d). A quimiocina atrativa para monócitos esteve aumentada a partir do 4º dia de infecção, com redução gradual a partir do 7º dia (Figura 14 e). Entretanto, a citocina TNF- α esteve aumentada apenas no início da infecção, do dia 1 ao dia 4 pós-infecção (Figura 14 f).

Quando a infecção foi feita com 10^6 PFU, as quimiocinas ligantes de CXCR2, CXCL1 (Figura 15 a, b) e CXCL2 (Figura 15 c, d) tiveram um aumento imediato, tanto no BAL quanto nos pulmões já no 1º dia, decrescendo progressivamente até atingirem níveis basais no 5º dia. Os níveis de CCL2 estiveram aumentados em todo o curso da infecção analisado (Figura 15 e). A citocina TNF- α esteve aumentada nos pulmões apenas no 1º dia de infecção (Figura 15 f), assim como a citocina IL-6 no soro (Figura 15 h). Nos pulmões, os níveis de IL-6 estiveram aumentados nos três dias avaliados, sendo que os maiores níveis foram detectados no 1º dia de infecção (Figura 15 g).

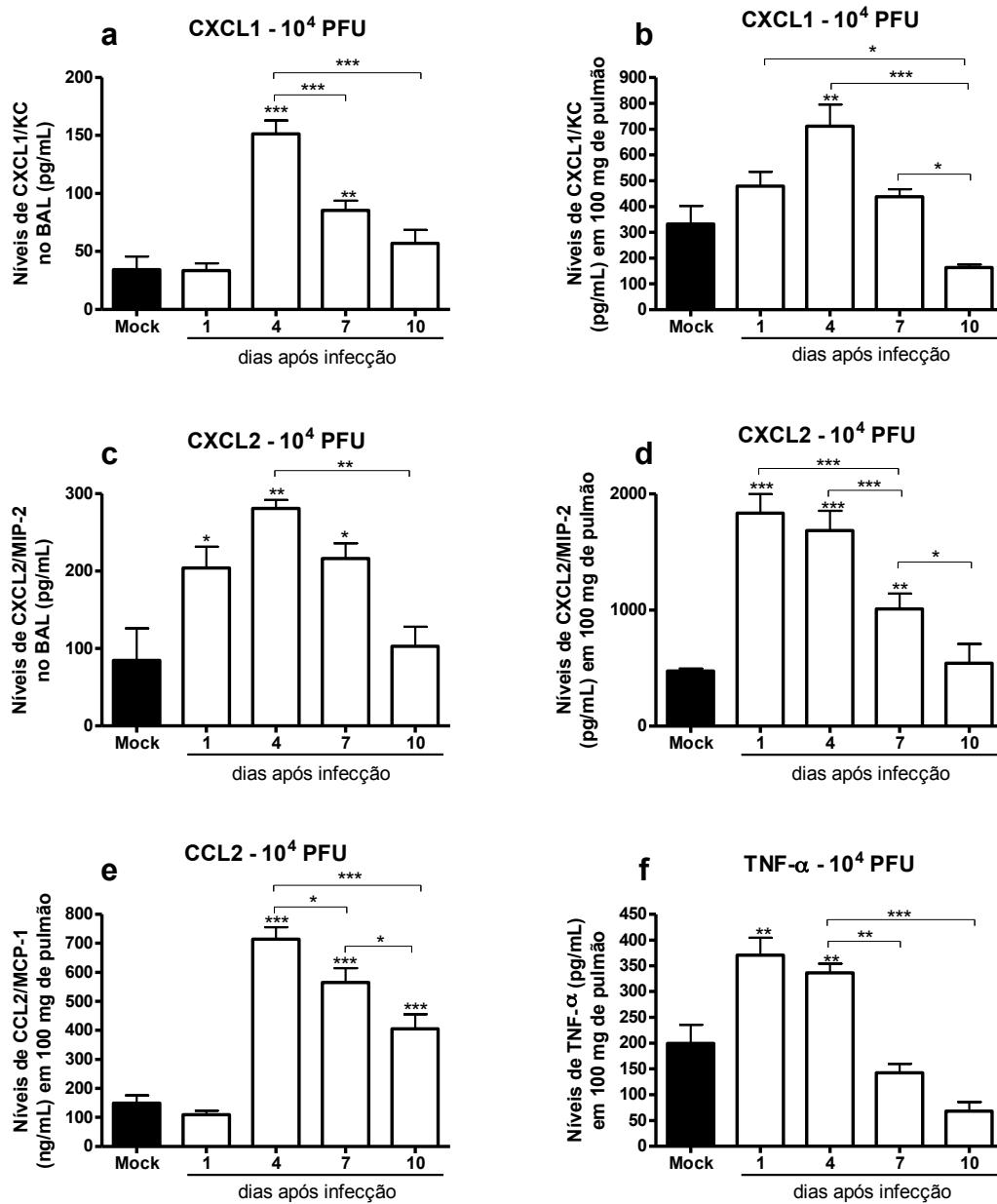
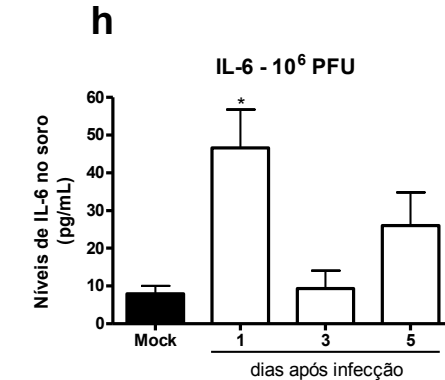
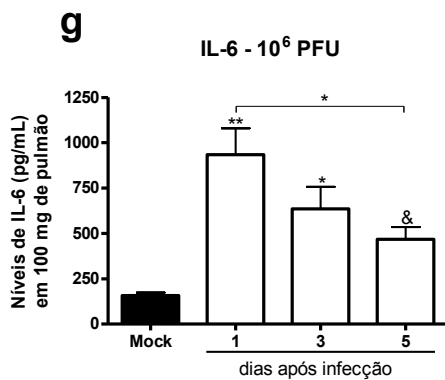
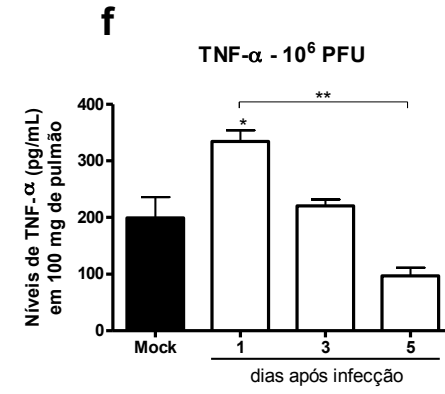
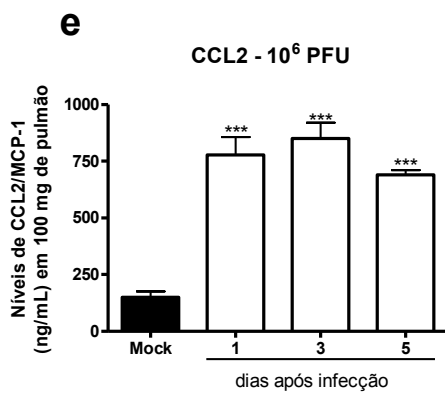
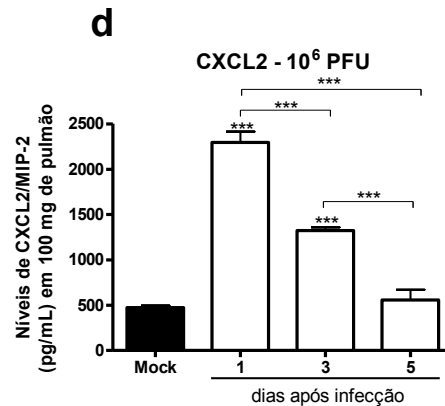
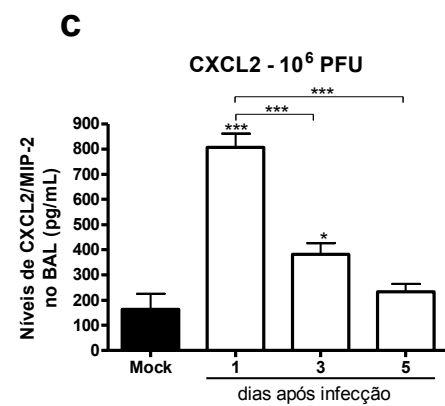
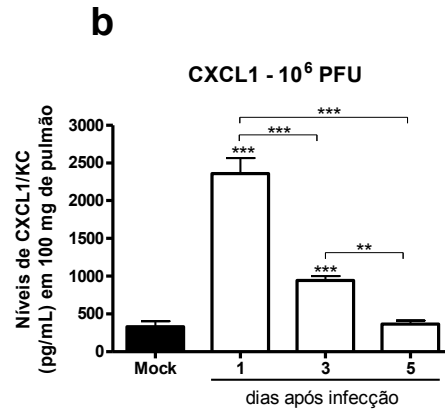
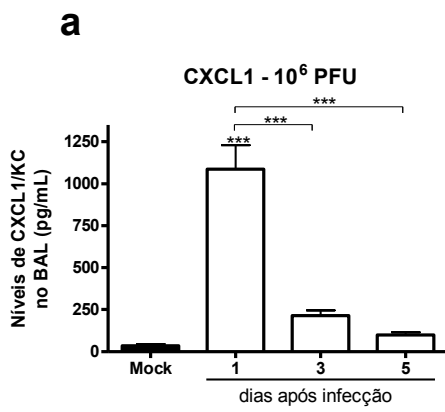


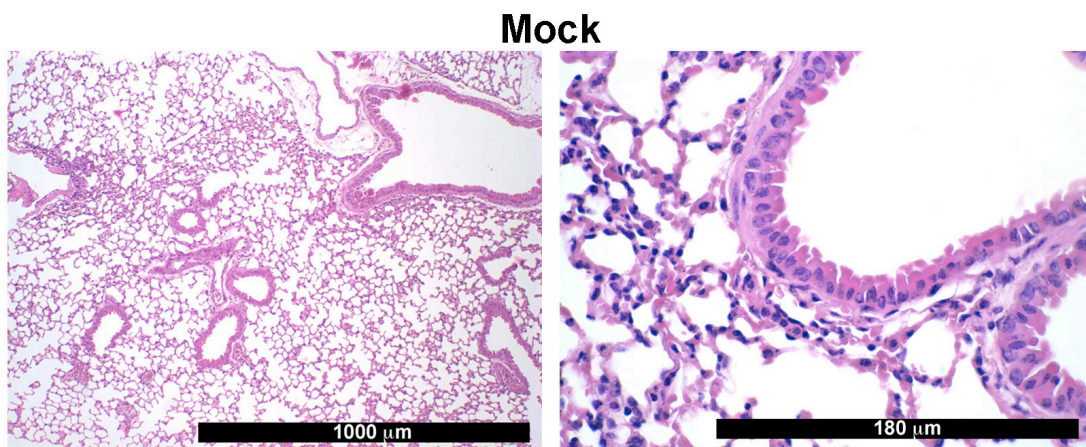
Figura 14: Níveis da quimiocina CXCL1 no BAL (a) e nos pulmões (b); da quimiocina CXCL2 no BAL (c) e nos pulmões (d); da quimiocina CCL2 nos pulmões (e) e da citocina TNF- α nos pulmões de animais infectados com 10⁴ PFU do vírus Influenza A/WSN/33 H1N1. Os resultados apresentam a média \pm EPM de 4-10 animais por grupo e foram representados com * para p<0.05, ** para p<0.01 e *** para p<0.001 em relação ao grupo não infectado ou quando comparados entre os grupos indicados (—); teste *One-Way* ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls.



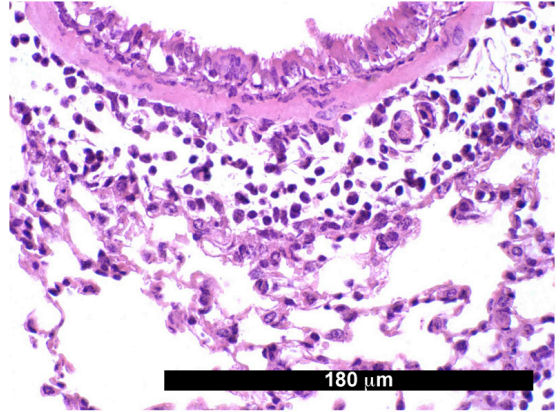
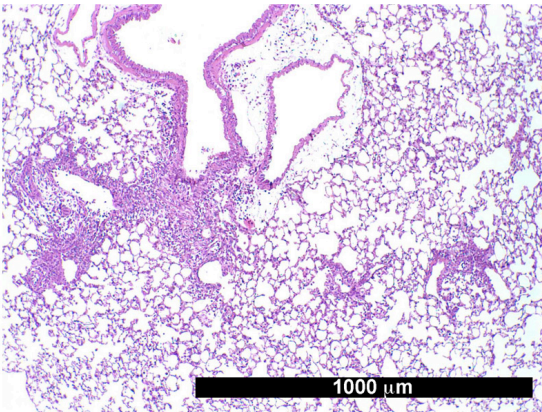
& = Teste t não-pareado vs Mock

Figura 15: Níveis da quimiocina CXCL1 no BAL (a) e nos pulmões (b); da quimiocina CXCL2 no BAL (c) e nos pulmões (d); da quimiocina CCL2 nos pulmões (e), da citocina TNF- α nos pulmões e da citocina IL-6 nos pulmões (g) e no soro (h) de animais infectados com 10^6 PFU do vírus Influenza A/WSN/33 H1N1. Os resultados apresentam a média \pm EPM de 4-10 animais por grupo e foram representados com * para $p < 0.05$, ** para $p < 0.01$ e *** para $p < 0.001$ em relação ao grupo não infectado ou quando comparados entre os grupos indicados (—); teste *One-Way* ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls. & representa $p < 0.05$ comparando-se com o grupo não infectado através de Teste t não-pareado, página anterior.

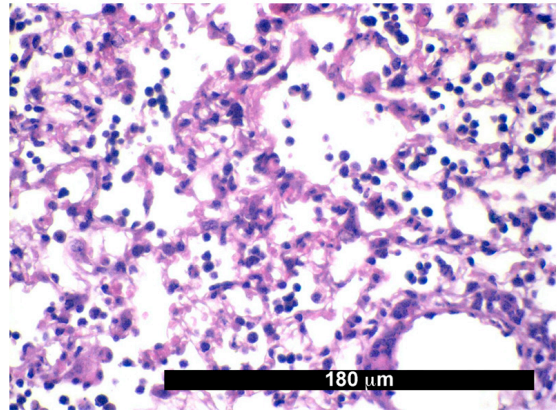
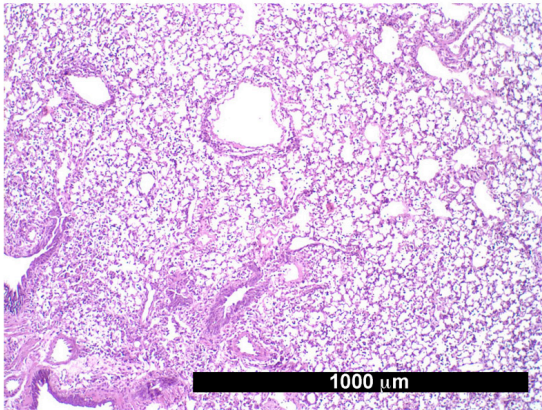
Foram feitas análises histopatológicas das lâminas de pulmões de camundongos infectados com 10^4 PFU do vírus Influenza A/WSN/33 H1N1 após 4 e 10 dias de infecção e de animais infectados com 10^6 PFU do mesmo vírus no terceiro e quinto dia de infecção. O inóculo de 10^4 PFU provocou pequenas alterações na estrutura do órgão com o decorrer da infecção: no quarto dia, pequenas áreas de infiltrado inflamatório concentrados na região próxima aos brônquios e bronquíolos, acometendo menos de 25% da estrutura pulmonar; no décimo dia de infecção, um discreto infiltrado inflamatório, ainda presente, encontrava-se disperso por todo o parênquima alveolar e o espessamento alveolar e edema estavam presentes em toda a área analisada. A infecção com o inóculo de 10^6 PFU provocou alterações mais intensas no órgão: no terceiro dia de infecção, um intenso infiltrado inflamatório peribronquial, peribronquiolar e perialveolar que acometia mais de 60% da estrutura do órgão, mas não havia sinais de hiperemia e edema; no quinto dia de infecção, mais de 80% dos alvéolos brônquios e bronquíolos apresentavam-se cercados de células inflamatórias e havia hiperemia, formação edema e produção de muco nos brônquios. Essas alterações podem ser observadas na figura 16, em que as lâminas foram fotografadas com aumentos de 100 e 600 vezes.



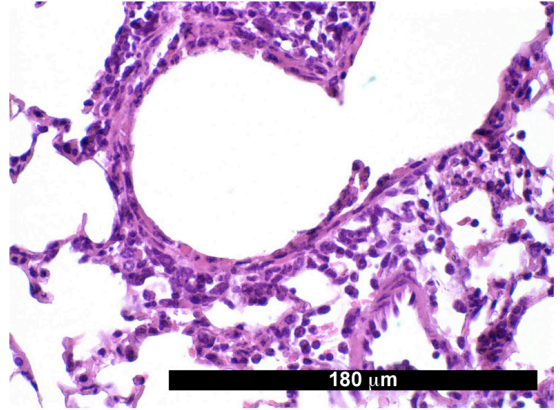
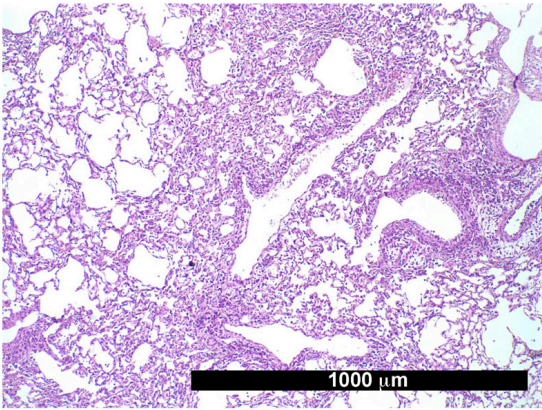
104 PFU - 4d



104 PFU - 10d



106 PFU - 3d



106 PFU - 5d

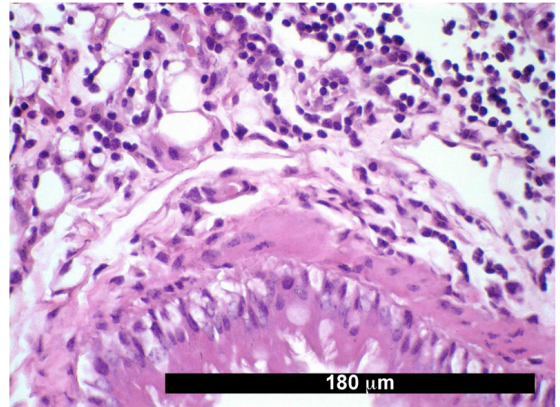
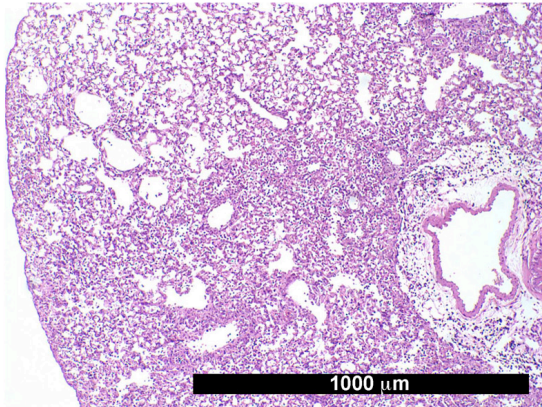


Figura 16: Cortes histológicos representativos de seções de pulmões de camundongos não infectados (Mock – página 82) e de camundongos infectados com 10^4 PFU do vírus Influenza A/WSN/33 H1N1 após 4 e 10 dias de infecção e de camundongos infectados com 10^6 PFU do vírus Influenza A/WSN/33 H1N1, após 3 e 5 dias de infecção. As barras representam 1000 μm quando o no aumento de 100 vezes (esquerda) e 180 μm no aumento de 600 vezes (direita), página 83.

4.2 – PAPEL DO RECEPTOR DE PAF NA INFECCÃO PELO VÍRUS INFLUENZA A/WSN/33 H1N1

Para investigar se o receptor de PAF, um mediador inflamatório fosfolipídico, possui algum papel durante a infecção pelo vírus Influenza A, camundongos selvagens (WT) e camundongos deficientes no PAFR (PAFR KO ou KO) foram infectados com o inóculo letal do vírus H1N1 WSN/33, 10^6 PFU e com o inóculo próximo da DL-50, de 10^4 PFU. A letalidade em decorrência da infecção foi observada, assim como o padrão inflamatório e de resposta imune ao vírus.

4.2.1 – Letalidade

Animais deficientes no receptor de PAF – PAFR KO, apresentaram maior sobrevivência em relação a animais selvagens – WT, após serem infectados pelo vírus Influenza A/WSN/33 H1N1. Após 21 dias de infecção com o inóculo de 10^4 PFU, 94% dos animais do grupo PAFR KO permaneceram vivos, enquanto 65% dos animais WT sobreviveram, representando uma diferença estatística significativa, com $p = 0.0373$. Além de apresentarem menor letalidade após a infecção com o inóculo de 10^4 PFU, os animais PAFR KO tiveram o início da letalidade atrasado em 5 dias em relação aos animais WT. Quando infectados com o inóculo de 10^6 PFU, todos os animais WT sucumbiram à infecção após 9 dias, e 23% dos animais PAFR KO ainda estavam vivos após 21 dias de infecção, $p = 0.05$ (Figura 17).

4.2.2 - Comparação da resposta inflamatória e do combate ao vírus

Foram escolhidos dois tempos, imediatamente anteriores ao início da letalidade, para a avaliação da resposta inflamatória decorrente da infecção pelo vírus Influenza A/WSN/33 H1N1 em camundongos WT e PAFR KO. Para o inóculo de 10^4 PFU, foi escolhido o 8º dia de infecção; já para o inóculo de 10^6 PFU, o 5º dia de infecção foi avaliado, devido à alta letalidade nos dias subsequentes.

O extravasamento protéico para as vias aéreas, medido através da dosagem de proteínas totais no lavado broncoalveolar, indicou um aumento da lesão tecidual em todos os grupos infectados, nos dois tempos avaliados (Figura 18). No 5º dia de infecção com o inóculo de 10^6 PFU, não houve diferença nos níveis de proteína no BAL entre os grupos infectados (Figura 18 a). No 8º dia de infecção, os animais PAFR KO apresentaram menores níveis de proteínas no BAL que o grupo WT (Figura 18 b).

Um aumento no recrutamento de leucócitos totais foi observado cinco dias após a infecção nos dois grupos infectados com 10^6 PFU, sendo que, os animais deficientes em PAFR tiveram um menor recrutamento celular (Figura 19 a). No 8º dia de infecção, os dois grupos infectados tiveram aumento no recrutamento leucocitário (Figura 19 b). O número de células mononucleares recrutadas para as vias aéreas esteve aumentado nos dois inóculos e tempos observados em decorrência da infecção (Figura 19 c, d), entretanto, os animais PAFR KO tiveram um menor recrutamento dessas células no 5º dia de infecção com o inóculo de 10^6 PFU. O número de neutrófilos aumentou em decorrência da infecção por 10^6 PFU no 5º dia, em ambos os grupos infectados, sendo que o recrutamento neutrofilico foi reduzido nos animais KO (Figura 19 e); no 8º dia de infecção, apenas os camundongos WT infectados com 10^4 PFU permaneceram com os níveis elevados de neutrófilos (Figura 19 f).

Os níveis de MPO nos pulmões de animais infectados com 10^6 PFU foram maiores no quinto dia de infecção nos grupos infectados (Figura 20 a). No oitavo dia de infecção com o inóculo menor do vírus os níveis de MPO mantiveram-se basais (Figura 20 b). Já os níveis de NAG, enzima presente em macrófagos, foram maiores nos dois tempos e inóculos de vírus avaliados, sem alteração entre animais WT e PAFR KO (Figura 20 d, e).

Foram medidos os níveis das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α (Tabela 2) e das quimiocinas CXCL1 e CXCL2 (Tabela 3) nos pulmões de animais não infectados e animais infectados, por 5 dias com 10^6 PFU e por 8 dias com 10^4 PFU do vírus H1N1. Os níveis de

TNF- α e CXCL2 nos tempos e inóculos avaliados não sofreram alterações em decorrência da infecção. Os níveis de IL-1 β estiveram igualmente aumentados no 8° dia de infecção com 10⁴ PFU nos dois grupos infectados (Figura 21 b); entretanto, no 5° dia de infecção com 10⁶ PFU, somente os camundongos PAFR KO apresentaram um aumento na produção dessa citocina (Figura 21 a). Os níveis de IL-6 foram maiores nos dois tempos avaliados em decorrência da infecção, sendo indistintos entre os grupos WT e PAFR KO (Figura 21 c, d). A quimiocina CXCL1/KC esteve igualmente aumentada nos dois grupos infectados com o maior inóculo do vírus H1N1 (Figura 21 e) e permaneceu em níveis basais no 8° dia de infecção com 10⁴ PFU (Figura 21 f).

Os cortes histológicos dos pulmões de animais infectados com 10⁶ PFU do vírus Influenza A/WSN/33 H1N1 foram analisados pelo professor Dr. Geovanni Dantas Cassali, do Departamento de Patologia (ICB/UFMG). As lâminas de animais WT infectados com 10⁶ PFU, após 5 dias de infecção revelaram um intenso infiltrado inflamatório misto peribronquial, peribronquiolar e perialveolar, hiperemia alveolar, exsudação leucocitária, edema e produção de muco em alguns brônquios. O perfil histopatológico dos animais PAFR KO infectados com 10⁶ PFU, após 5 dias de infecção mostrou um padrão de infiltrado inflamatório peribronquial e perivascular, com infiltrado alveolar mais discreto e comprometimento de menores áreas do parênquima pulmonar. A figura 22 mostra fotos representativas dos grupos Mock, WT 10⁶ PFU e PAFR KO 10⁶ PFU no aumento de 100 e 600 vezes. O padrão histológico do pulmão de um animal Mock mostrou a estrutura do órgão em condições fisiológicas; a foto representativa do grupo WT 10⁶ PFU mostra o acometimento de grande parte da estrutura pulmonar com a infiltração inflamatória e a produção de muco no brônquio após a infecção pelo vírus Influenza; a foto que representa o grupo PAFR KO 10⁶ PFU mostra a concentração dos infiltrados inflamatórios em áreas menores do pulmão.

O título viral nos pulmões dos dois grupos infectados com 10⁶ PFU e sacrificados no 5° dia de infecção foi semelhante e ficou na faixa de 10⁵ PFU (Figura 23 a). Por outro lado, os animais PAFR KO infectados com 10⁴ PFU apresentavam o título mais baixo, de 10⁴ PFU no 8° dia de infecção, enquanto os animais WT tiveram o título aumentado para 10⁵ PFU, indicando uma maior multiplicação dos vírus nos pulmões desses animais (Figura 23 b).

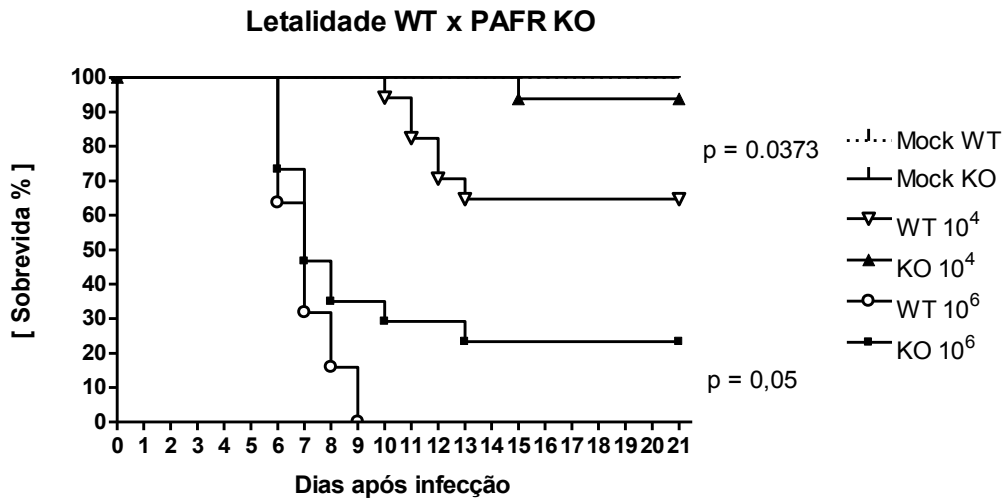


Figura 17: Letalidade provocada pelo vírus Influenza A/WSN/33 H1N1 em camundongos WT e PAFR KO infectados com 10^4 e 10^6 PFU, observada por 21 dias. Os dados representam 2 (10^4 PFU) e 3 (10^6 PFU) experimentos independentes somados, com n de 6 a 9 em cada grupo infectado e n de 4 nos grupos não infectados. O valor de p refere-se ao teste Logrank, comparando-se os dois grupos infectados com o mesmo inóculo.

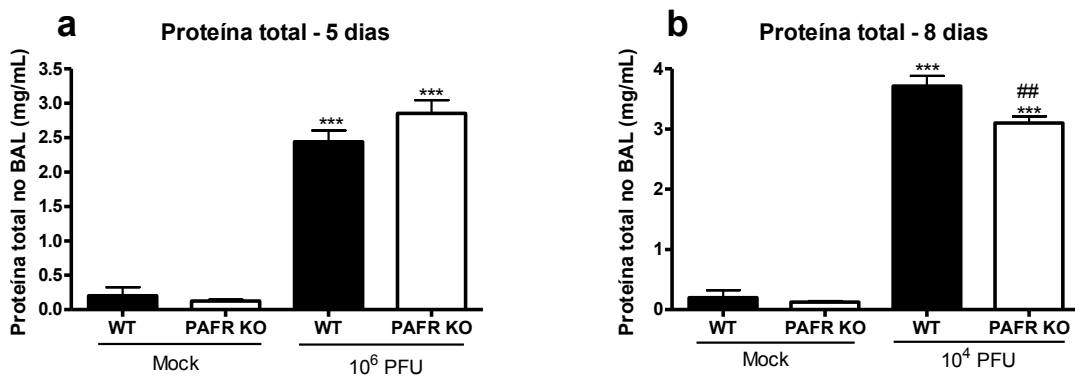


Figura 18: Acúmulo de proteínas totais no BAL 5 dias após infecção com 10^6 PFU do vírus Influenza A H1N1 (a) e após 8 dias de infecção com 10^4 PFU do mesmo vírus (b). Os resultados apresentam a média \pm EPM de 4-14 animais por grupo e foram representados com *** para $p < 0.001$ em relação aos grupos não infectados e ## para $p < 0.01$ quando comparados os dois grupos infectados; teste *One-Way* ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls.

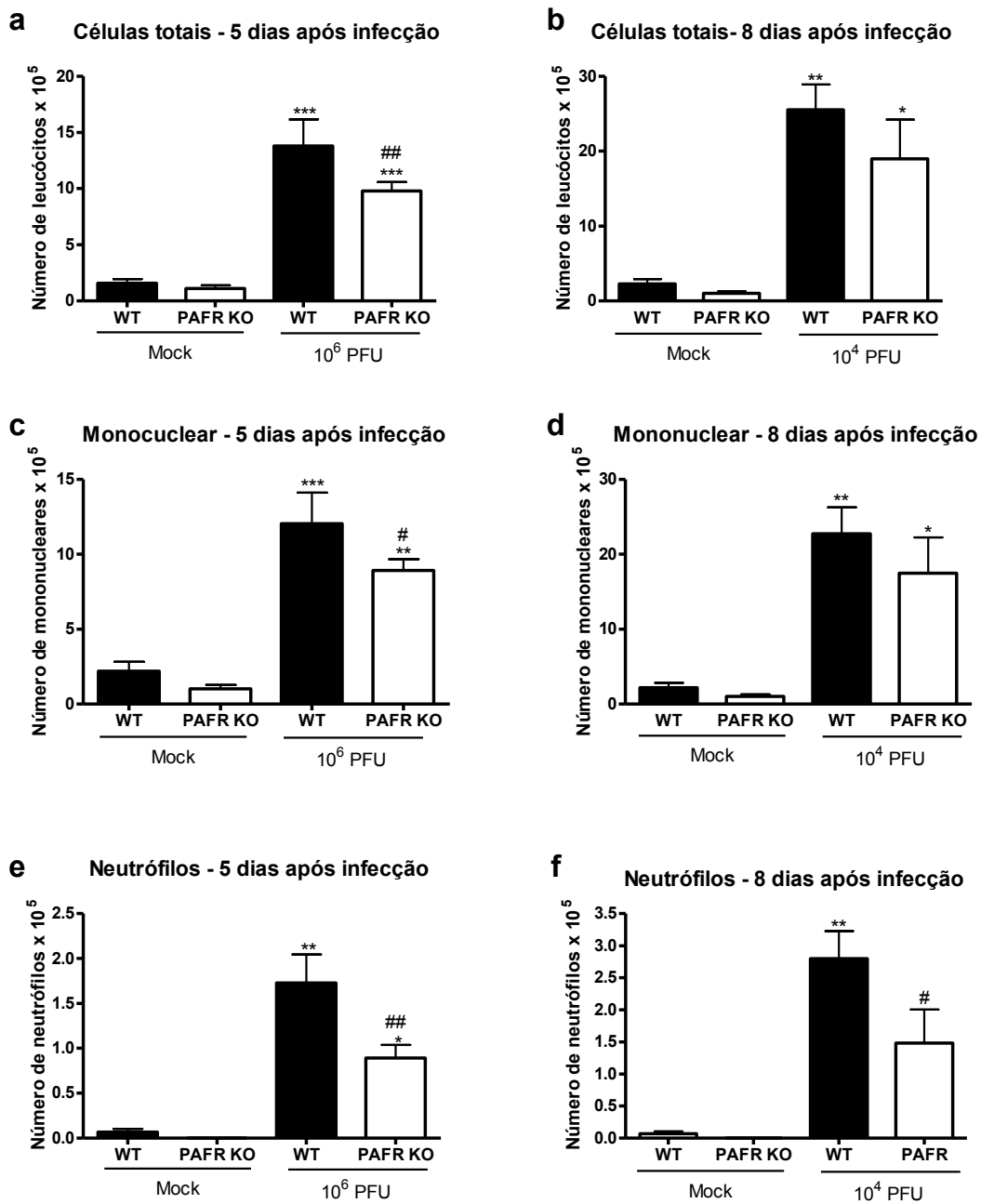


Figura 19: Recrutamento de leucócitos totais (a, b), células mononucleares (c, d) e neutrófilos (e, f) para o espaço alveolar observados após a infecção pelo vírus Influenza A/WSN/33 H1N1 em camundongos WT e PAFR KO no inóculo de 10⁶ PFU após 5 dias de infecção (a, c, e) e após 8 dias de infecção com o inóculo de 10⁴ PFU (b, d, f). Os resultados apresentam a média ± EPM de 4-12 animais por grupo (dois experimentos independentes) e foram representados com * para p<0.05, ** para p<0.01 e *** para p<0.001 em relação aos grupos não infectados e # para p<0.05 e ## para p<0.01 quando comparados os dois grupos infectados; teste *One-Way* ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls.

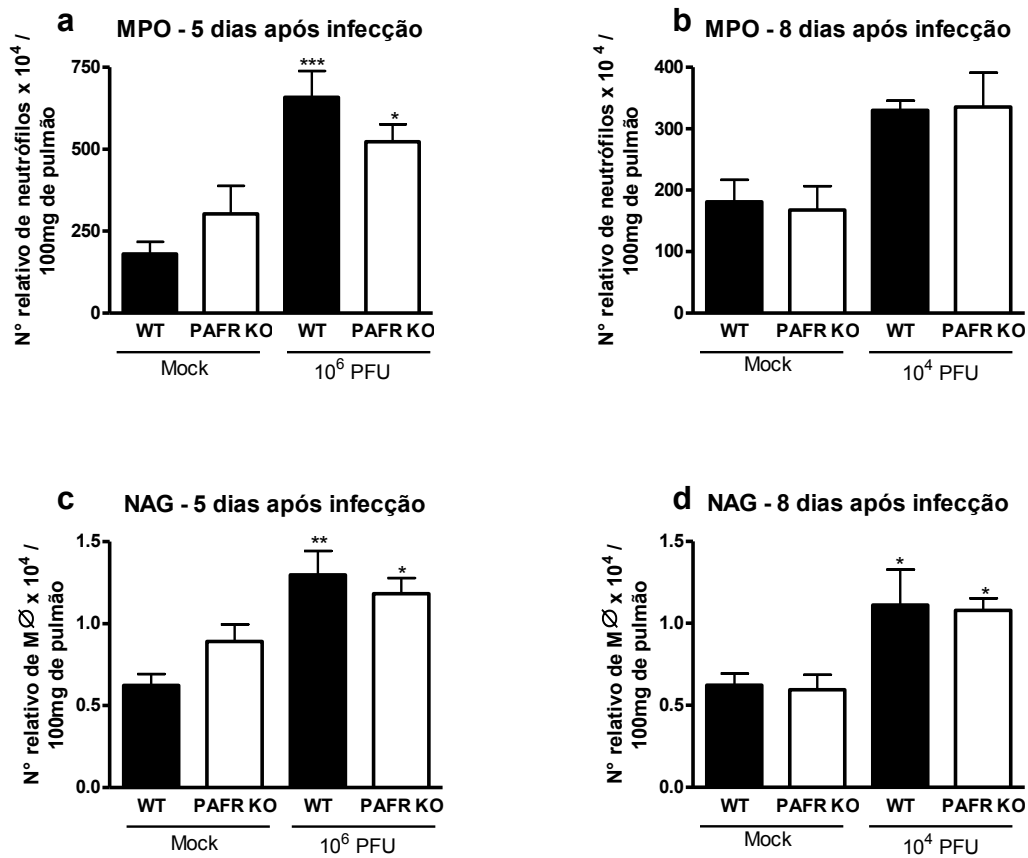


Figura 20: Níveis de Mieloperoxidase (a, b) e N-acetil-glicosaminidase (c, d) nos pulmões após 5 dias de infecção com 10⁶ PFU (a, c) e após 8 dias de infecção com 10⁴ PFU do vírus Influenza A H1N1 (b, d). Os resultados apresentam a média ± EPM de 4-14 animais por grupo (dois experimentos independentes) e foram representados com * para p<0.05, ** para p<0.01 e *** para p<0.001 em relação aos grupos não infectados; teste *One-Way* ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls.

Tabela 2: Níveis das citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α nos pulmões camundongos não infectados (Mock) ou infectados com 10⁶ PFU, no quinto dia de infecção; ou infectados com 10⁴ PFU, no oitavo dia de infecção pelo vírus Influenza A/WSN/33 H1N1.

Citocina	IL-1β (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	TNF-α (pg/mL)
WT Mock	247 \pm 119	181 \pm 10	233 \pm 33
KO Mock	214 \pm 22	129 \pm 29	211 \pm 65
WT 10⁶ 5 d	480 \pm 101	402 \pm 24 (***)	145 \pm 16
KO 10⁶ 5 d	915 \pm 113 (***) (##)	374 \pm 31 (***)	197 \pm 18
WT 10⁴ 8 d	491 \pm 35 (*)	320 \pm 41 (**)	135 \pm 12
KO 10⁴ 8 d	464 \pm 21 (**)	408 \pm 37 (***)	142 \pm 13

Os resultados apresentam a média \pm EPM de 3-7 animais por grupo e foram representados com * para p<0.05, ** para p<0.01 e *** para p<0.001 em relação aos grupos não infectados e ## para p<0.01 quando comparados os dois grupos infectados; teste *One-Way* ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls.

Tabela 3: Níveis das quimiocinas CXCL1 e CXCL2 nos pulmões camundongos não infectados (Mock) ou infectados com 10⁶ PFU, no quinto dia de infecção; ou infectados com 10⁴ PFU, no oitavo dia de infecção pelo vírus Influenza A/WSN/33 H1N1.

Quimiocina	CXCL1 (pg/mL)	CXCL2 (pg/mL)
WT Mock	277 \pm 37	472 \pm 67
KO Mock	236 \pm 60	730 \pm 106
WT 10⁶ 5 d	524 \pm 50 (**)	595 \pm 61
KO 10⁶ 5 d	613 \pm 103 (*)	829 \pm 102
WT 10⁴ 8 d	411 \pm 41	564 \pm 65
KO 10⁴ 8 d	383 \pm 71	668 \pm 100

Os resultados apresentam a média \pm EPM de 3-14 animais por grupo (dois experimentos independentes) e foram representados com * para p<0.05 e ** para p<0.01 em relação aos grupos não infectados; teste *One-Way* ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls.

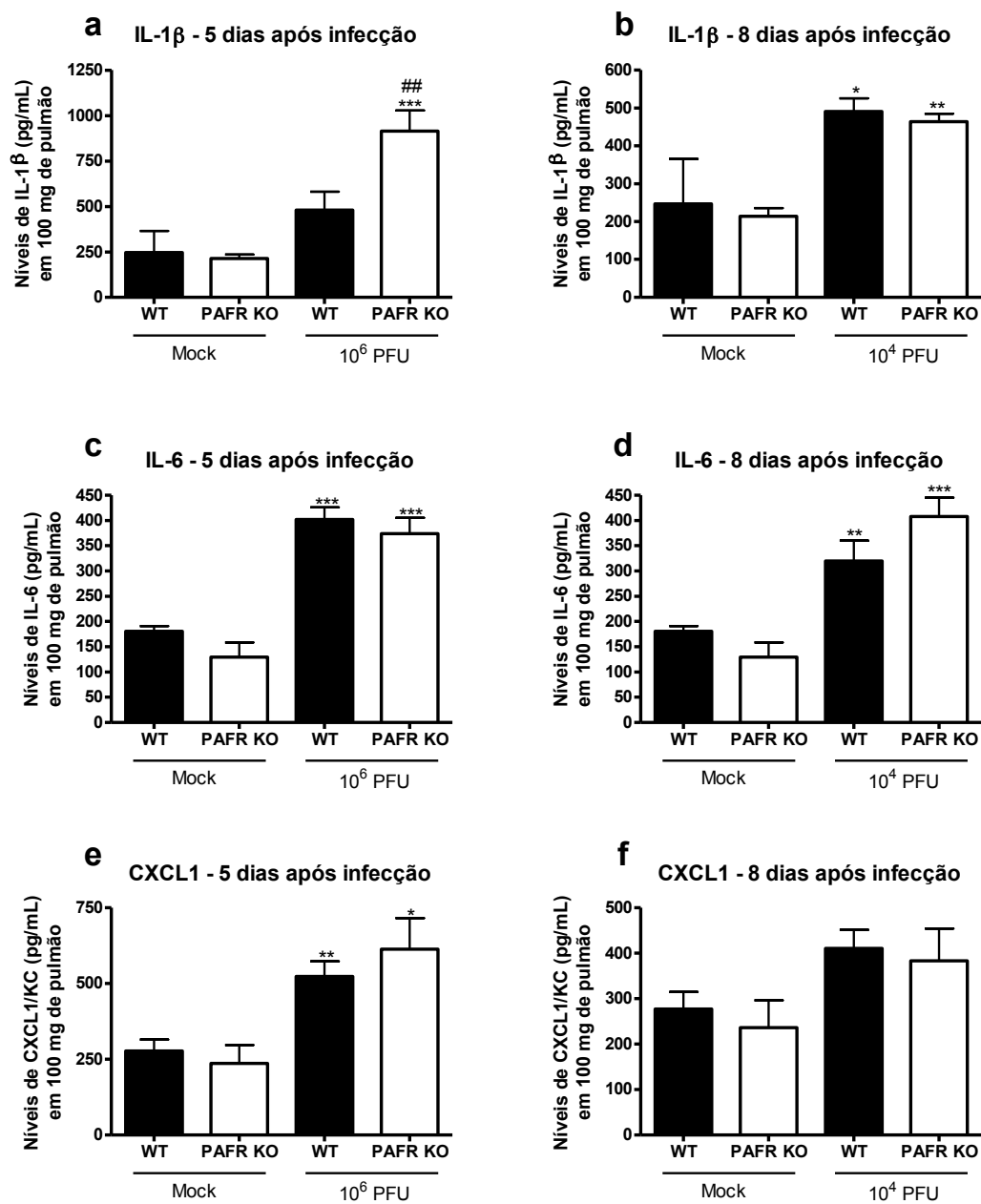


Figura 21: Níveis das citocinas IL-1 β (a, b), IL-6 (c, d) e da quimiocina CXCL1 (e, f) após 5 dias de infecção com 10⁶ PFU (a, c, e) e após 8 dias de infecção com 10⁴ PFU do vírus Influenza A H1N1 (b, d, f). Os resultados apresentam a média \pm EPM de 3-14 animais por grupo (dois experimentos independentes) e foram representados com * para $p < 0.05$, ** para $p < 0.01$ e *** para $p < 0.001$ em relação aos grupos não infectados e ## para $p < 0.01$ quando comparados os dois grupos infectados; teste *One-Way* ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls.

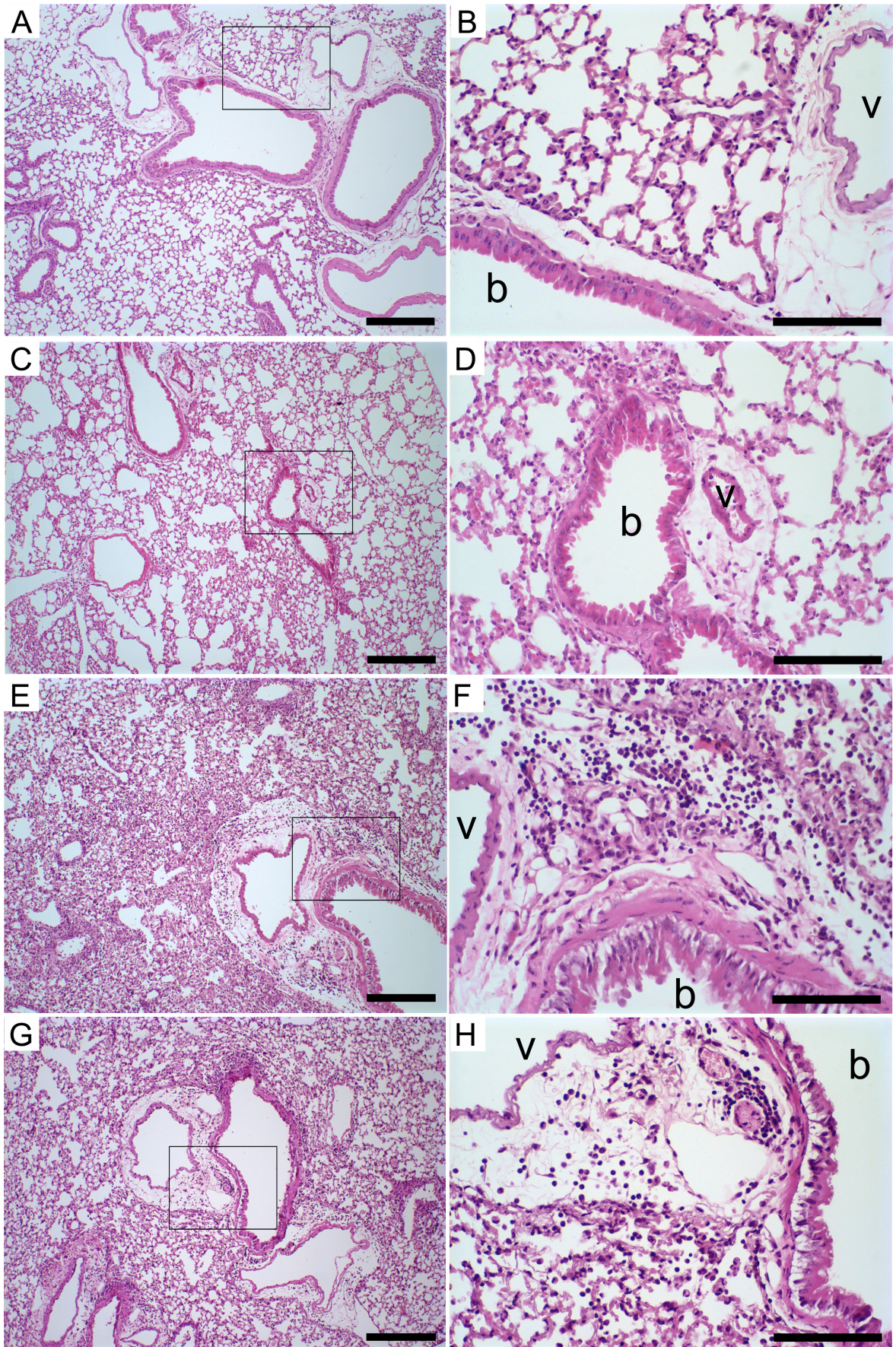


Figura 22: Cortes histológicos representativos de seções de pulmões de camundongos não infectados WT (A, B), PAFR KO (C, D) e de camundongos infectados WT (E, F) e PAFR KO (G, H) com 10^6 PFU do vírus Influenza A/WSN/33 H1N1, após 5 dias de infecção. As barras representam 25 μ m quando o no aumento de 100 vezes (esquerda) e 10 μ m no aumento de 400 vezes (direita), página anterior. As letras “v” apontam os vasos e “b” apontam os bronquíolos.

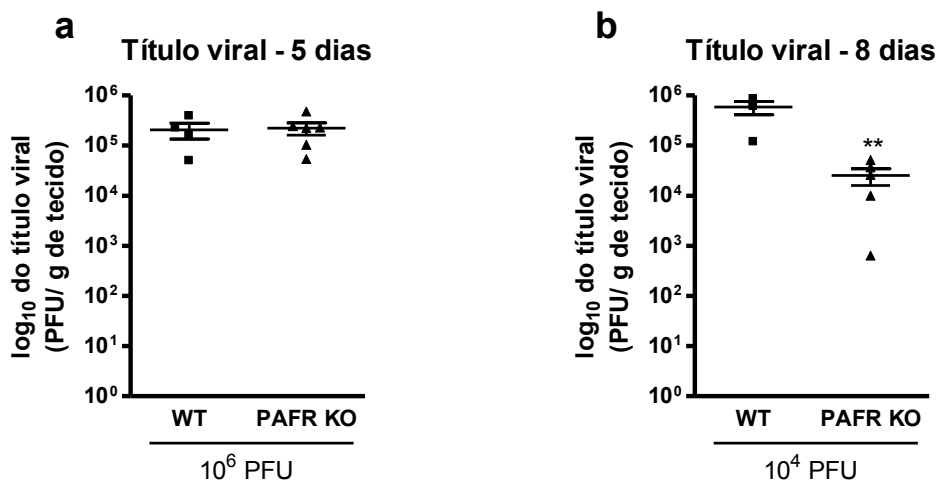


Figura 23: Título viral nos pulmões de animais infectados com 10^6 PFU do vírus Influenza A H1N1 após 5 dias de infecção (a) e nos pulmões de animais infectados com 10^4 PFU, após 8 dias de infecção (b). Os resultados apresentam a média \pm EPM de 4-6 animais por grupo e foram representados com ** para $p < 0.01$ quando comparados os dois grupos infectados; Teste t não pareado.

4.2.3 – Análise da sobrevivência celular

Sabendo-se que o vírus Influenza A é um potente estímulo pró-apoptótico (CALAMUSSI et al., 1999), buscou-se comparar a ativação da cascata de apoptose nos animais WT e PAFR KO infectados, em relação aos seus controles não infectados. Através do ensaio de Anexina V, utilizando as células recolhidas do lavado broncoalveolar.

O ensaio de Anexina V se baseia na ligação, de forma dependente de cálcio, dessa proteína à fosfatidilserina presente em membranas celulares. Um dos primeiros eventos da apoptose é a translocação da fosfatidilserina da camada interna para a camada externa da membrana celular. Assim, células marcadas com Anexina V e separadas por citometria de fluxo por tamanho e granulosidade são consideradas apoptóticas. Uma segunda marcação com Iodeto de Propídio (PI) é feita para eliminar as células necróticas, uma vez que essas internalizam PI, através de fendas nas membranas.

Utilizando o ensaio de Anexina V, células recolhidas através do lavado broncoalveolar foram marcadas e levadas ao citômetro de fluxo onde foram separadas e as fluorescências relativas à Anexina V e ao PI foram lidas. As análises foram feitas através da separação de leucócitos totais, linfócitos, macrófagos e granulócitos em *gates* de acordo com o tamanho e granulosidade das populações. Os leucócitos totais, ou seja, todas as células recolhidas no lavado broncoalveolar, apresentaram maior taxa de ligação à Anexina V nos grupos infectados em relação aos controles não infectados, no mesmo inóculo viral tempo de infecção do item anterior. No entanto, o grupo PAFR KO infectado apresentou menores números de leucócitos apoptóticos que os animais selvagens (Figura 25 a). Quanto aos neutrófilos, os grupos infectados apresentaram números aumentados em relação aos controles, mas semelhantes entre si de apoptose (Figura 25 b). Linfócitos (Figura 25 c) e macrófagos (Figura 25 d) tiveram aumento na apoptose em decorrência da infecção somente no grupo de animais WT, havendo um decréscimo nesses números nos animais PAFR KO infectados.

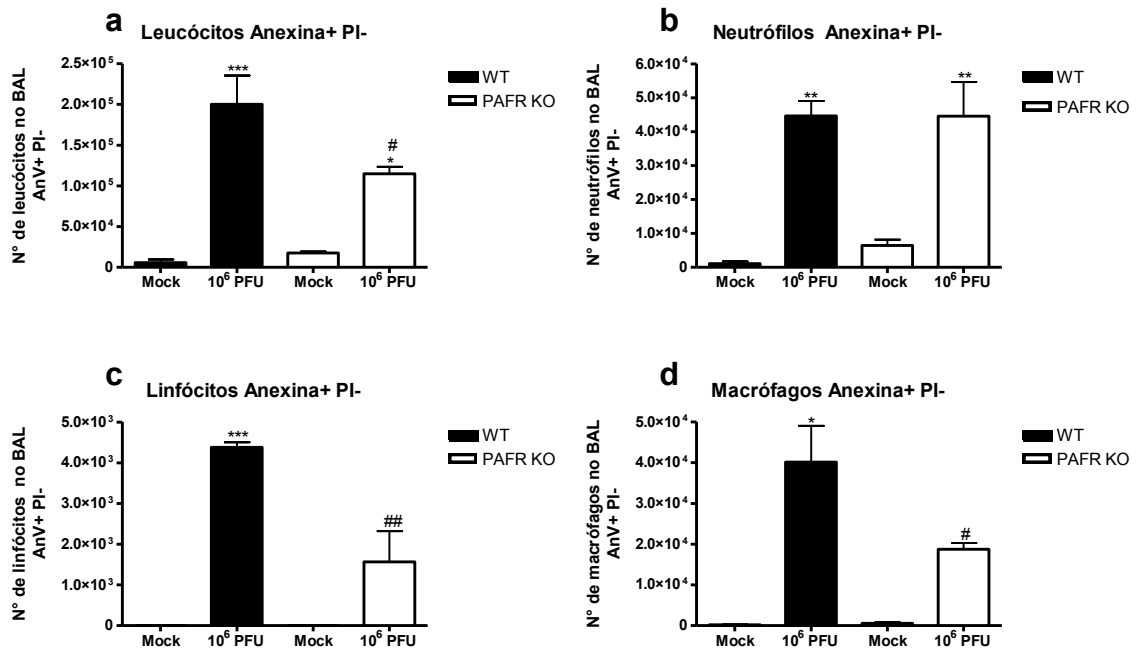


Figura 24: Número de leucócitos totais (a), neutrófilos (b), linfócitos (c) e macrófagos (d) apoptóticos (Anexina V + PI-) recolhidos das vias aéreas após 5 dias de infecção com o inóculo de 10⁶ PFU do vírus Influenza A/WSN/33 H1N1. Os resultados apresentam a média ± EPM de 3-4 animais por grupo e foram representados com * para p<0.05, ** para p<0.01 e *** para p<0.001 em relação aos grupos não infectados e # para p<0.05 e ## para p<0.01 quando comparados os dois grupos infectados; teste *One-Way* ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls.

4.2.4 - Análise do perfil celular por citometria de fluxo (FACS)

Após marcação com anticorpos específicos para diferentes populações leucocitárias, foi possível avaliar o perfil dessas células através da técnica de citometria de fluxo. No caso das células recolhidas do BAL, o valor de porcentagem foi multiplicado pelo número de células totais e dividido por 100, para a obtenção do número absoluto de células de cada sub-população leucocitária. Esse ajuste foi necessário em virtude do número variável de eventos adquiridos: 1264 ± 61 - WT Mock versus 33114 ± 5594 - WT 10^6 (***) ; 1071 ± 71 - PAFR KO Mock versus 27938 ± 5610 - PAFR KO 10^6 (**), devido à baixa taxa de recrutamento basal de leucócitos para o espaço alveolar.

As populações de células T CD4+, T CD8+, células NK e NKT foram recrutadas para o espaço alveolar em decorrência da infecção, como pode ser notado pelo aumento dessas populações após 5 dias de infecção nos grupos infectados em relação aos seus controles Mock (Figura 26 a, b, c, d, respectivamente); mas não houve diferença no recrutamento dessas células para o espaço alveolar entre os grupos WT e PAFR KO infectados. As populações de macrófagos F4/80+ (Figura 26 e) e F4/80+ CCR5+ (Figura 26 f) no BAL tiveram um aumento em decorrência da infecção, porém esse aumento foi reduzido nos animais PAFR KO. De maneira semelhante, a população de granulócitos, GR1+ aumentou em ambos os grupos infectados e uma redução no grupo de animais deficientes no receptor de PAF foi encontrada (Figura 26 g). Dentre os granulócitos, aqueles que expressam GR1 e CXCR2, tiveram maior recrutamento com a infecção viral e, nesse caso, não houve diferença entre os grupos infectados (Figura 26 h).

A análise das populações leucocitárias nos pulmões revelou um padrão diferente daquele encontrado nas células do BAL (Figura 27). Animais WT infectados tiveram maior recrutamento de células T CD4+; esse aumento foi abolido em animais PAFR KO (Figura 27 a). A porcentagem de células T CD8+ nos pulmões não sofreu mudanças em decorrência da infecção (Figura 27 b). Células NK (Figura 27 c) e NKT (Figura 27 d) aumentaram em decorrência da infecção e esse aumento foi maior nos animais deficientes no receptor de PAF. As populações de macrófagos F4/80+ (Figura 27 e) e F4/80+ CCR5+ (Figura 27 f) aumentaram devido à infecção, mas não houve diferença entre os grupos infectados. Por fim,

os granulócitos GR1+, em níveis elevados com a infecção, apresentaram um aumento acentuado no grupo PAFR KO (Figura 27 g), enquanto a expressão de CXCR2 nos granulócitos GR1+ foi semelhante nos grupos infectados 5 dias pós infecção (Figura 27 h).

4.2.4.1 - Análise de citocinas e quimiocinas relacionadas à atividade de células NK

Após a análise dos dados de citometria de fluxo que demonstraram um aumento da população de células NK e NKT nos pulmões de camundongos PAFR KO infectados, buscou-se investigar como estariam os níveis das citocinas relacionadas à atividade dessas células ao longo da infecção e se haveria alguma diferença na produção dessas citocinas entre os animais WT e PAFR KO infectados ou não com o inóculo de 10^6 PFU e sacrificados após 5 dias de infecção. Para isso, os níveis de IL-2, IL-12, CCL5/RANTES e IFN- γ foram quantificadas pelo método de ELISA nos pulmões. Os tecidos estocados dos experimentos de cinética de infecção pelo inóculo de 10^6 PFU foram usados para essa quantificação. Foi observado que a citocina IL-2 foi mantida em níveis basais apenas no primeiro dia de infecção e nos tempos posteriores, há um decréscimo na sua produção (Figura 28 a). IL-12/IL-23 P40 teve um aumento progressivo que culminou no 5º dia de infecção (Figura 28 b). Em todos os dias avaliados, a quimiocina CCL5 esteve elevada em relação aos níveis de animais não infectados e o pico de sua produção foi encontrado no 3º dia pós-infecção (Figura 28 c). Os níveis de IFN- γ aumentaram em decorrência da infecção apenas no quinto dia avaliado (Figura 28 d).

Na comparação dos níveis das mesmas citocinas entre os grupos WT e PAFR KO infectados ou não, observou-se que os níveis de IL-2 reduzem em decorrência da infecção nos dois grupos (Figura 29 a). Por outro lado, IL-12/IL-23 P40 esteve elevada no grupo de animais WT infectados, havendo uma redução no grupo de animais deficientes no receptor de PAF em relação ao grupo WT infectado (Figura 29 b). A quimiocina CCL5 foi encontrada elevada nos dois grupos infectados, porém, houve uma redução no grupo de camundongos PAFR KO (Figura 29 c). A produção de IFN- γ , aumentada em decorrência da infecção nos dois grupos avaliados, foi menor no grupo de animais deficientes no receptor de PAF (Figura 29 d).

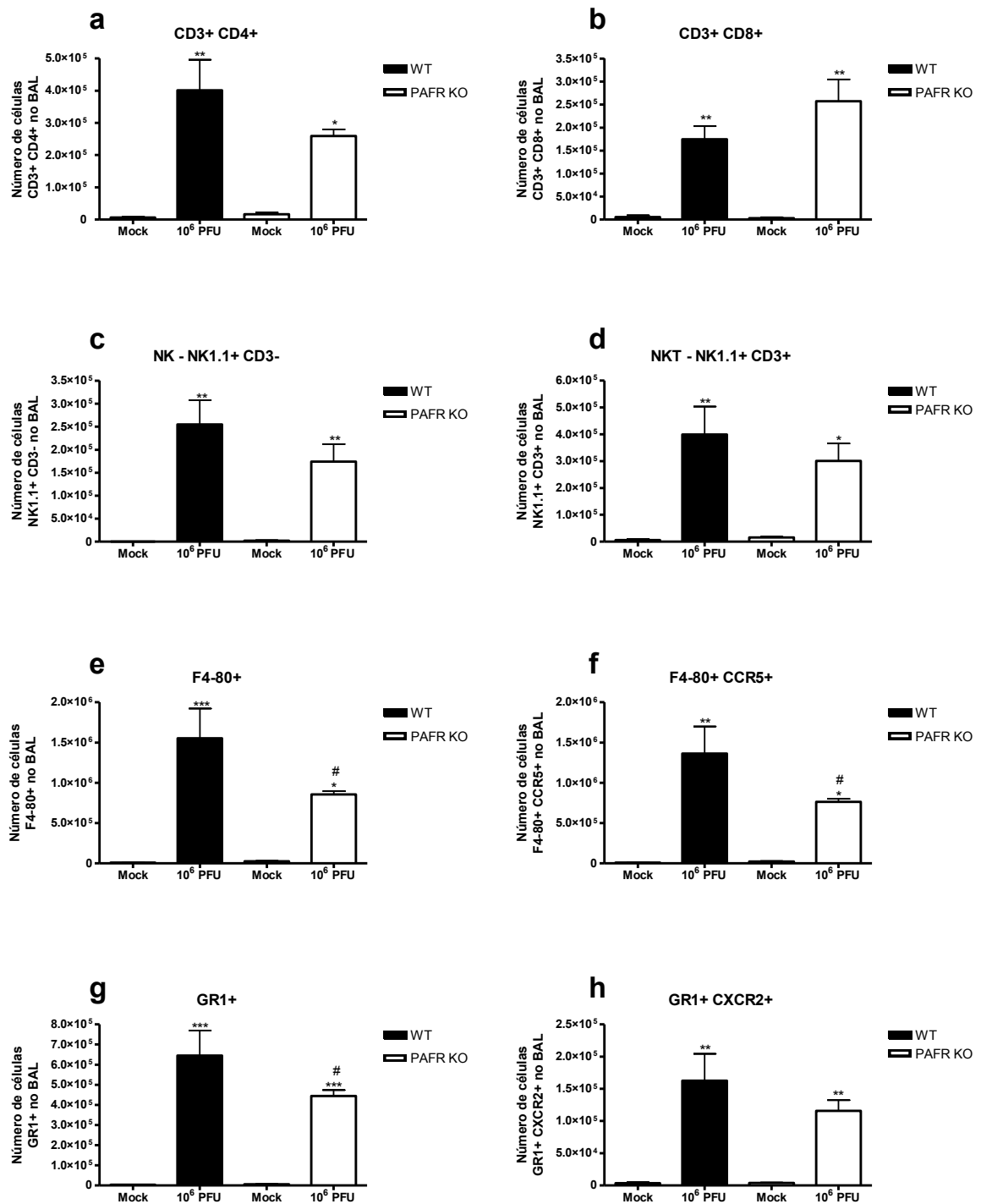


Figura 25: Número absoluto de células do espaço alveolar de animais WT e PAFR KO não infectados ou infectados com 10⁶ PFU do vírus Influenza A/WSN/33 H1N1, após 5 dias de infecção – linfócitos CD3+ CD4+ (a), linfócitos CD3+ CD8+ (b), células NK NK1.1+ CD3- (c), células NKT NK1.1+ CD3+ (d), macrófagos F4/80+ (e) e F4/80+ CCR5+ (f), granulócitos GR1+ (g) e neutrófilos GR1+ CXCR2+ (h). Os resultados apresentam a média ± EPM de 4-6 animais por grupo e foram representados com * para p<0.05, ** para p<0.01 e *** para p<0.001 em relação aos grupos não infectados e # para p<0.05 quando comparados os dois grupos infectados; teste *One-Way* ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls.

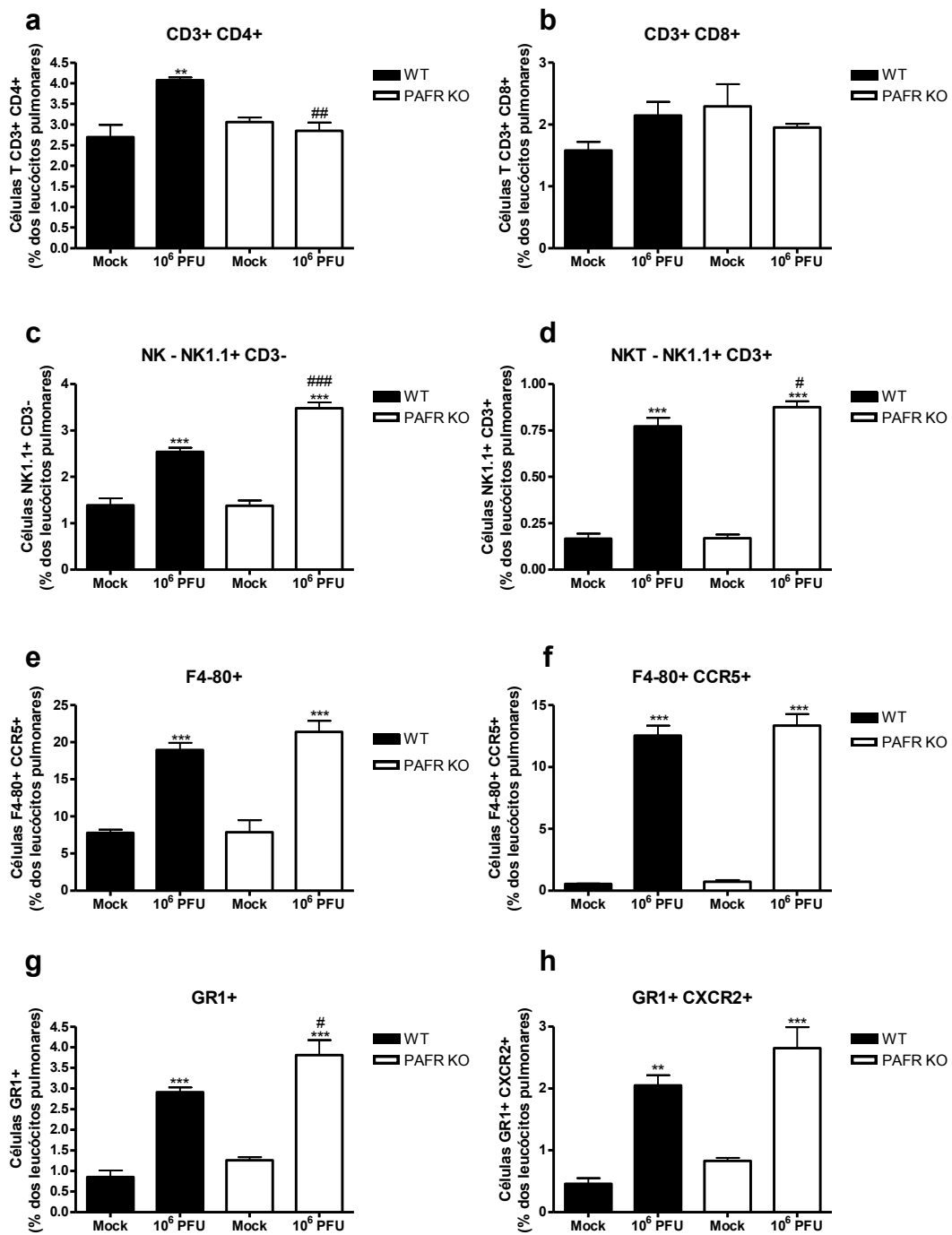


Figura 26: Populações de células extraídas dos pulmões de animais WT e PAFR KO não infectados ou infectados com 10^6 PFU do vírus Influenza A/WSN/33 H1N1, após 5 dias de infecção – linfócitos CD3+ CD4+ (a), linfócitos CD3+ CD8+ (b), células NK NK1.1+ CD3- (c), células NKT NK1.1+ CD3+ (d), macrófagos F4/80+ (e) e F4/80+ CCR5+ (f), granulócitos GR1+ (g) e neutrófilos GR1+ CXCR2+ (h). Os resultados apresentam a média \pm EPM de 3-6 animais por grupo e foram representados com ** para $p < 0.01$ e *** para $p < 0.001$ em relação aos grupos não infectados e # para $p < 0.05$, ## para $p < 0.01$ e ### para $p < 0.001$ quando comparados os dois grupos infectados; teste *One-Way* ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls.

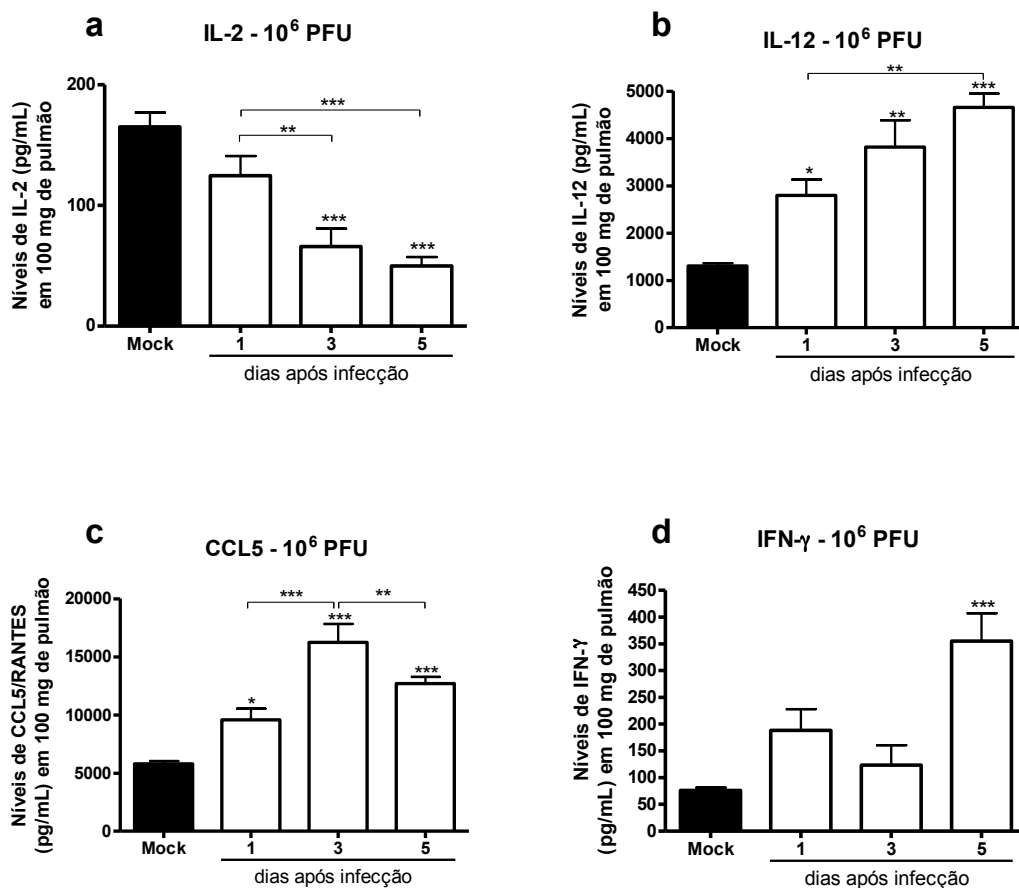


Figura 27: Níveis de IL-2 (a), IL-12/IL-23 P40 (b), CCL5 (c) e IFN- γ (d) nos pulmões de camundongos não infectados ou após 1, 3 e 5 dias de infecção com 10^6 PFU do vírus Influenza A/WSN/33 H1N1. Os resultados apresentam a média \pm EPM de 3-9 animais por grupo e foram representados com * para $p < 0.05$, ** para $p < 0.01$ e *** para $p < 0.001$ em relação aos grupos não infectados ou quando comparados entre os grupos indicados (—); teste *One-Way* ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls.

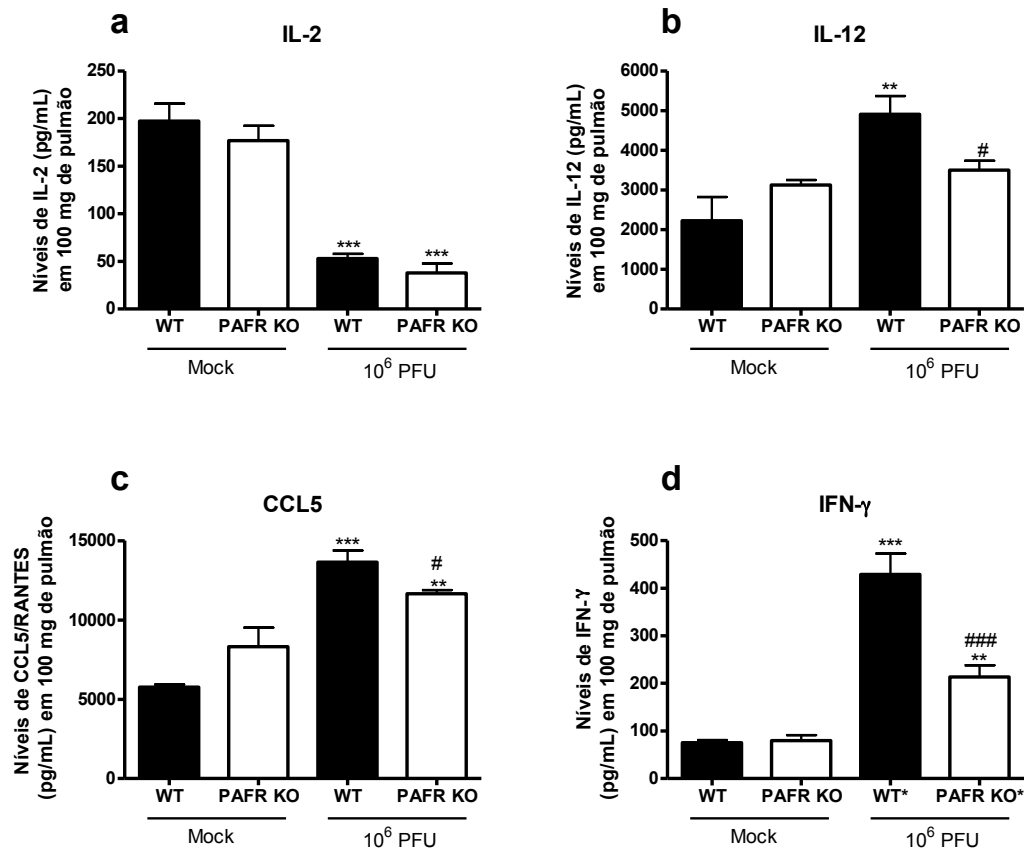


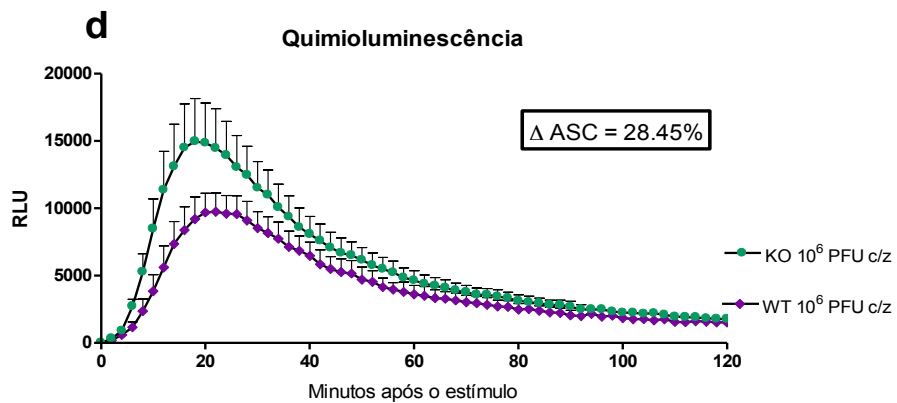
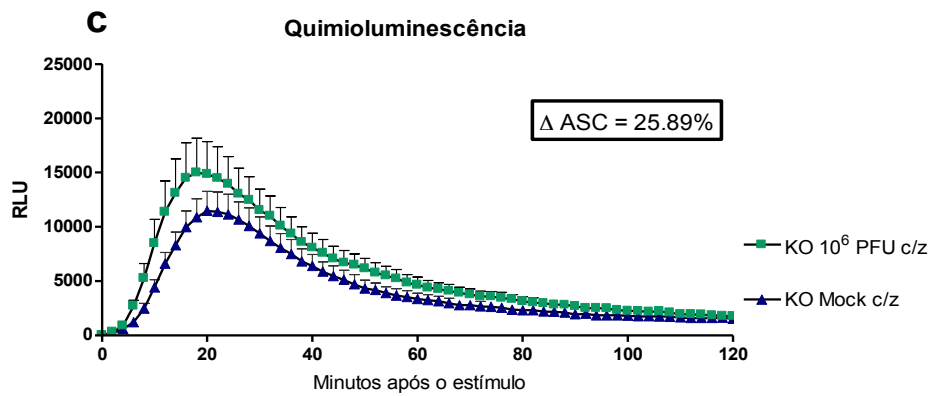
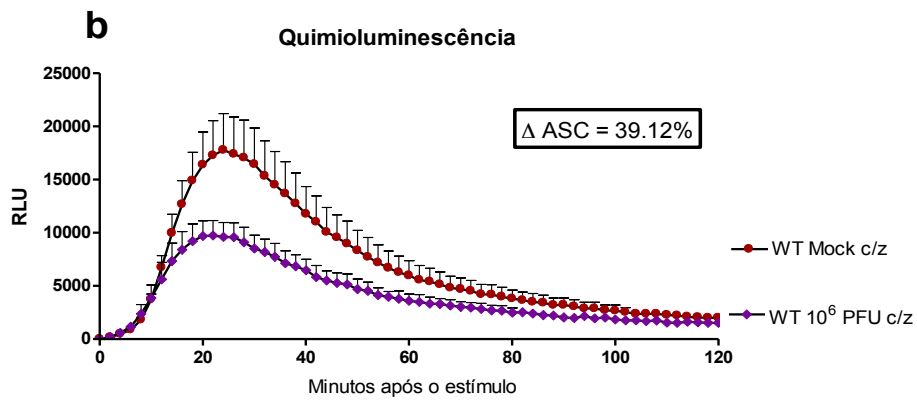
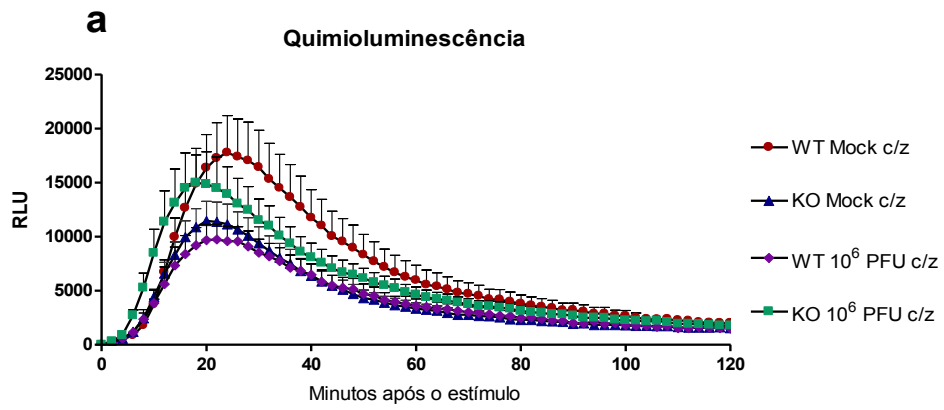
Figura 28: Níveis de IL-2 (a), IL-12/IL-23 P40 (b), CCL5 (c) e IFN- γ (d) nos pulmões de camundongos WT e PAFR KO não infectados ou após 5 dias de infecção com 10^6 PFU do vírus Influenza A/WSN/33 H1N1. Os resultados apresentam a média \pm EPM de 3-7 animais por grupo e foram representados com ** para $p < 0.01$ e *** para $p < 0.001$ em relação aos grupos não infectados e # para $p < 0.05$ quando comparados os dois grupos infectados; teste *One-Way* ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls.

4.2.5 – Perfil de ativação celular

Para avaliar a resposta dos fagócitos do pulmão expostos ao Zimosan, um estimulador de liberação de espécies reativas de oxigênio, células pulmonares de camundongos WT e PAFR KO não infectados ou infectados com 10^6 PFU do vírus Influenza A/WSN/33 H1N1 foram isoladas e estimuladas com Zimosan, em presença de luminol. Dessa maneira, a produção de espécies reativas de oxigênio é medida por 120 minutos como RLU – unidades relativas de luminescência.

O estímulo com Zimosan produziu as curvas de ativação mostradas na figura 30 a, nos quatro grupos avaliados. A adição de luminol sem a presença de Zimosan não foi capaz de ativar a produção de luminescência em nenhum grupo (dado não apresentado). A ativação das células isoladas de camundongos WT Mock, medida pela diferença dos valores obtidos da área sobre a curva, foi 39.12% maior que a ativação registrada de células de animais WT infectados (Figura 30 b), enquanto no grupo de animais PAFR KO, a maior ativação (25.89%) ocorreu nas células de animais infectados (Figura 30 c). A diferença na ativação de células entre grupos infectados foi de 28.45%, sendo maior no grupo PAFR KO (Figura 30 d).

Figura 29: Padrões de quimioluminescência dependente de luminol induzida por Zimosan em células pulmonares de camundongos WT e PAFR KO, não infectados ou infectados com 10^6 PFU do vírus Influenza A/WSN/33 H1N1. Os dados foram expressos como a média \pm EPM de 3-5 animais por grupo e a análise da variação da área total sobre a curva foi feita por regra de três entre os grupos avaliados; página seguinte.



4.2.6 - Reinfecção

A infecção em camundongos deficientes no receptor de PAF conferiu proteção à letalidade e essa proteção esteve relacionada a um menor recrutamento de células do sistema imune inato. Logo, teria essa proteção alguma interferência na montagem da resposta imune adquirida?

A infecção de animais selvagens e deficientes no receptor de PAF utilizando um inóculo sub-letal do vírus Influenza A/WSN/33 H1N1, de 10^3 PFU foi capaz de induzir uma imunidade protetora em ambos os grupos, uma vez que, quando infectados novamente com o inóculo letal de 10^6 PFU, esses animais não ficaram doentes nem sucumbiram à infecção (dados não mostrados).

4.2.7 - Tratamento com o antagonista do receptor de PAF, PCA 4248

O tratamento com o antagonista do receptor de PAF, PCA 4248, do terceiro ao décimo dia de infecção, desencadeou uma proteção contra a infecção pelo vírus Influenza A/WSN/33 H1N1 semelhante à encontrada em animais deficientes no receptor de PAF. Quando infectados com o inóculo de 10^4 PFU, 52% dos animais do grupo veículo sobreviveram, enquanto 87.5% dos animais tratados com PCA 4248 permaneceram vivos ao final do experimento. Além disso, houve um atraso de 10 dias na letalidade do grupo tratado com PCA. O inóculo de 10^6 PFU provocou a morte de todos os animais do grupo veículo, enquanto o grupo tratado com PCA apresentou sobrevivência de 37.5% (Figura 31 a).

Quanto à perda de peso, não houve diferença entre os grupos infectados com 10^6 PFU durante os 8 dias em que os grupos coexistiram (dado não apresentado). Entretanto, o tratamento com PCA teve efeito na recuperação de peso do nono ao décimo primeiro dia de infecção com 10^4 PFU, quando o grupo tratado apresentou diferença de peso de aproximadamente 10% em relação ao grupo veículo (Figura 31 b).

O recrutamento de leucócitos totais para o espaço alveolar esteve aumentado no quinto dia de infecção com 10^6 PFU em ambos os grupos, no entanto, o grupo que recebeu o

tratamento com o antagonista do receptor de PAFR, apresentou uma redução nesse recrutamento (Figura 32 a). O mesmo padrão, de aumento com a infecção, mas redução no grupo PCA, foi observado quanto ao recrutamento de mononucleares (Figura 32 b). O número de neutrófilos recolhidos no BAL, aumentado no grupo veículo, não teve elevação significativa no grupo tratado com PCA 4248 (Figura 32 c). Os níveis de MPO nos pulmões estiveram igualmente aumentados nos grupos infectados tratados com veículo e com PCA 4248 (Figura 32 d). Já o extravasamento protéico para o espaço alveolar, aumentado com a infecção, foi menor no grupo PCA (Figura 32 e). O título viral no 5º dia de infecção no grupo veículo foi de, aproximadamente, 10^7 PFU, enquanto no grupo tratado com PCA 4248 o título ficou próximo de 10^5 PFU, embora a análise estatística não aponte diferença entre os grupos.

A produção das citocinas IL-1 β e IL-6 nos pulmões, e da quimiocina CCL2 nos pulmões e no BAL, e de CCL3 e CCL5 nos pulmões foi aumentada após 5 dias de infecção, sem alterações entre os grupos (Tabelas 4 e 5, Figura 33). Os níveis de CXCL2 nos pulmões e no BAL e de CCL3 e de CCL5 no BAL não sofreram alterações em decorrência da infecção (Tabela 5). A produção de TNF- α nos pulmões esteve aumentada somente no grupo tratado com PCA 4248 (Tabela 4, Figura 33 b), enquanto que a produção sistêmica de IL-6 no soro, aumentada no grupo veículo, ficou reduzida aos níveis basais no grupo PCA (Tabela 4, Figura 33 d).

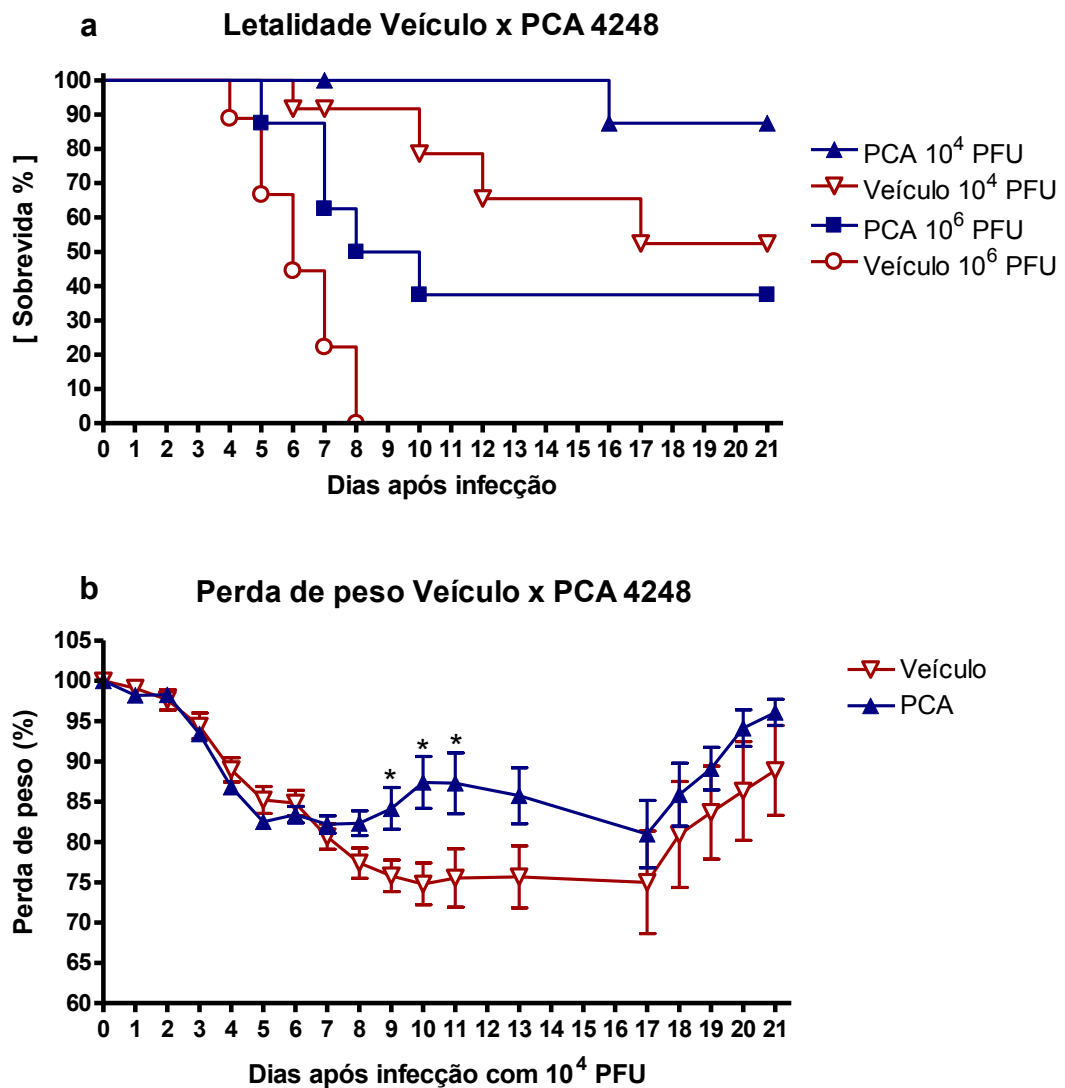


Figura 30: Letalidade associada à infecção por dois inóculos do vírus Influenza A/WSN/33 H1N1, 10^4 e 10^6 PFU, em animais tratados com o antagonista do receptor de PAF, PCA 4248, ou tratados com veículo; os dados representam 8-9 em cada grupo infectado (a). Perda de peso após a infecção com 10^4 PFU de animais tratados com PCA ou com veículo (b); os dados foram expressos como a média \pm EPM de 8 animais por grupo. A análise da diferença de perda de peso foi feita por dia de infecção utilizando Teste t não-pareado e diferenças com $p < 0.05$ foram representadas com *.

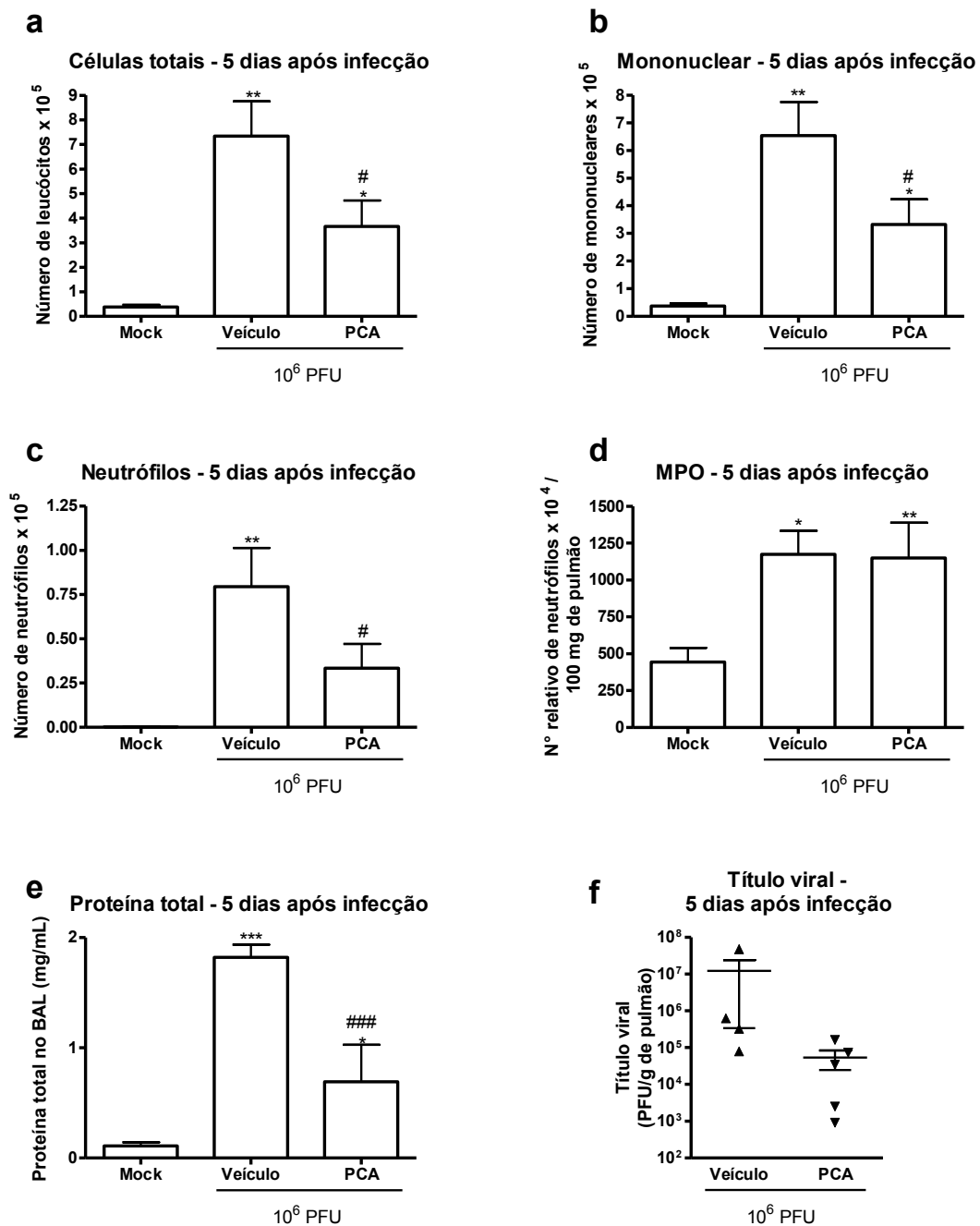


Figura 31: Recrutamento de leucócitos totais (a), de mononucleares (b) e de neutrófilos (c) para o BAL; recrutamento de neutrófilos para os pulmões (d); níveis de proteínas totais no BAL (e); título viral nos pulmões (f) de animais infectados com 10⁶ PFU, tratados com PCA ou com veículo e sacrificados após 5 dias de infecção. Os resultados apresentam a média ± EPM de 4-8 animais por grupo e foram representados com * para p<0.05, ** para p<0.01 e *** para p<0.001 em relação ao grupo não infectado e # para p<0.05 e ### para p<0.001 quando comparados os dois grupos infectados; teste *One-Way* ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls.

Tabela 4: Níveis das citocinas IL-1 β , TNF- α e IL-6 nos pulmões e de IL-6 no soro de camundongos não infectados (Mock) ou infectados com 10⁶ PFU do vírus Influenza A/WSN/33 H1N1 e tratados com PCA 4248 ou com veículo.

Citocina	Local	Mock	Veículo	PCA
IL-1 β (pg/mL)	Pulmões	540 \pm 31	927 \pm 116 (*)	973 \pm 143 (*)
TNF- α (pg/mL)	Pulmões	339 \pm 24	406 \pm 131	674 \pm 134 (*)
IL-6 (pg/mL)	Pulmões	180 \pm 10	802 \pm 91 (***)	755 \pm 89 (***)
IL-6 (pg/mL)	Soro	5.1 \pm 3.0	49.0 \pm 13.7 (**)	21.6 \pm 6.8 (#)

Os resultados apresentam a média \pm EPM de 3-11 animais por grupo e foram representados com * para p<0.05, ** para p<0.01 e *** para p<0.001 em relação ao grupo não infectado e # para p<0.05 quando comparados os dois grupos infectados; teste *One-Way* ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls.

Tabela 5: Níveis das quimiocinas CXCL1, CCL2, CCL3 e CCL5 nos pulmões e no BAL de camundongos não infectados (Mock) ou infectados com 10⁶ PFU do vírus Influenza A/WSN/33 H1N1 e tratados com PCA 4248 ou com veículo.

Quimiocina	Local	Mock	Veículo	PCA
CXCL1 (pg/mL)	Pulmões	430 \pm 8	631 \pm 80	541 \pm 81
CXCL1 (pg/mL)	BAL	67 \pm 38	191 \pm 64	259 \pm 71
CCL2 (ng/mL)	Pulmões	162 \pm 45	427 \pm 27 (**)	416 \pm 35 (***)
CCL2 (ng/mL)	BAL	0 \pm 0	89 \pm 19 (*)	57 \pm 21 (*)
CCL3 (pg/mL)	Pulmões	326 \pm 39	1738 \pm 143 (**)	1418 \pm 270 (**)
CCL3 (pg/mL)	BAL	18 \pm 8	47 \pm 6	50 \pm 15
CCL5 (pg/mL)	Pulmões	2750 \pm 17	6584 \pm 633 (*)	5819 \pm 989 (*)
CCL5 (pg/mL)	BAL	116 \pm 19	263 \pm 62	272 \pm 65

Os resultados apresentam a média \pm EPM de 4-6 animais por grupo e foram representados com * para p<0.05, ** para p<0.01 e *** para p<0.001 em relação ao grupo não infectado; teste *One-Way* ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls.

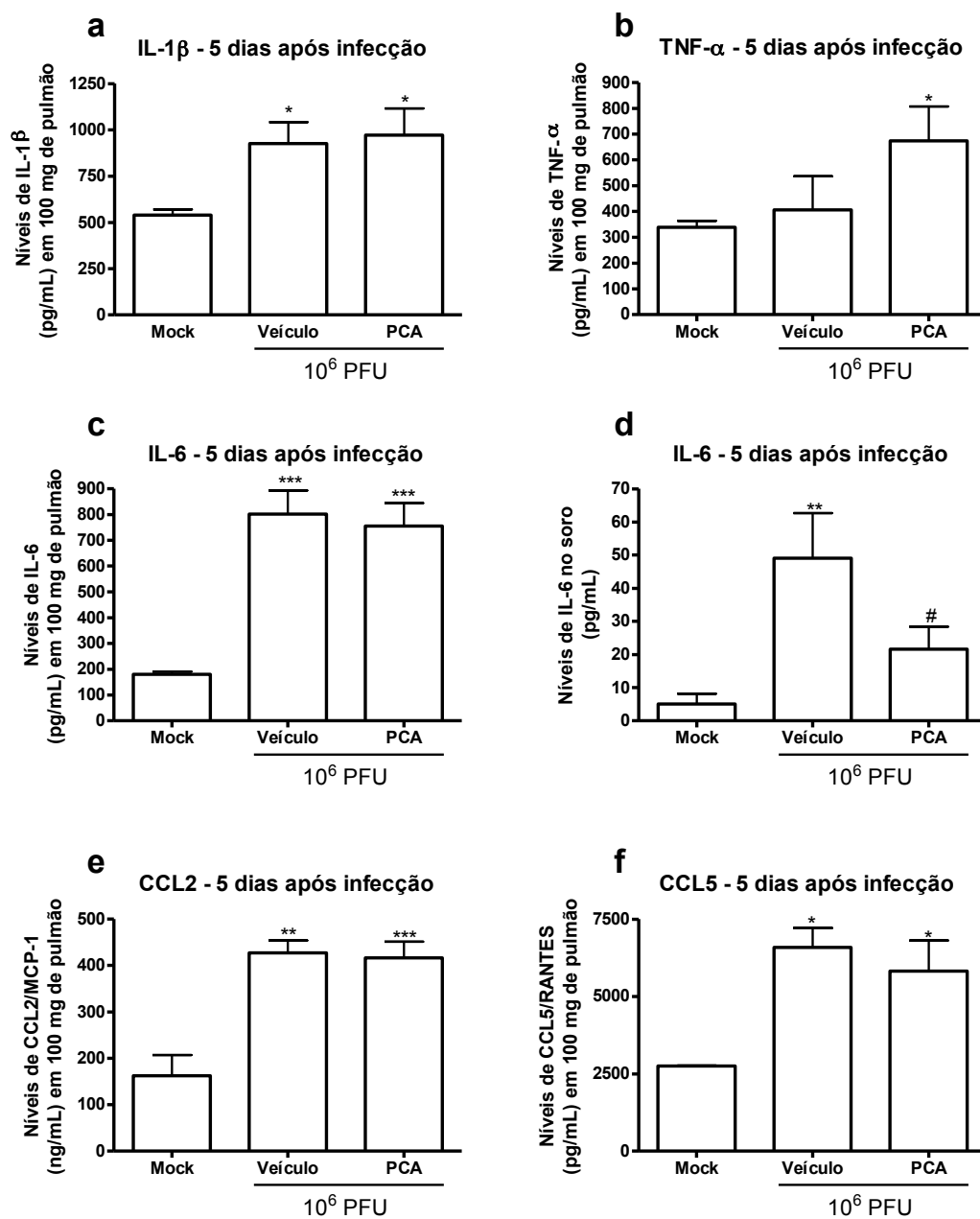


Figura 32: Níveis das citocinas IL-1 β (a), TNF- α (b) e IL-6 (c) nos pulmões, de IL-6 no soro (d) e das quimiocinas CCL2 (e) e CCL5 (f) nos pulmões de animais não infectados ou infectados com 10^6 PFU tratados com veículo ou com o antagonista de PAFR, PCA 4248, após 5 dias de infecção. Os resultados apresentam a média \pm EPM de 3-11 animais por grupo e foram representados com * para $p < 0.05$, ** para $p < 0.01$ e *** para $p < 0.001$ em relação ao grupo não infectado e # para $p < 0.05$ quando comparados os dois grupos infectados; teste *One-Way* ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls.

4.2.7.1 – Combinação com o inibidor de Neuraminidase Fosfato de Oseltamivir (Tamiflu®)

O tratamento combinado do antagonista de PAFR, PCA 4248 com o inibidor de Neuraminidase Tamiflu® demonstrou uma tendência de aumento na sobrevivência dos animais infectados com 10^6 PFU do vírus Influenza A/WSN/33 H1N1, uma vez que o grupo teve 47% de sobrevivência contra 25% do grupo tratado somente com PCA 4248, embora não seja estatística. A dose de Tamiflu utilizada, de 1mg/kg, não foi suficiente para proteger o grupo Tamiflu da letalidade associada à infecção, uma vez que todos os animais morreram de maneira semelhante ao grupo veículo (Figura 34).

Ambos os grupos tratados com PCA apresentaram um menor recrutamento de leucócitos totais (Figura 35 a), mononucleares (Figura 35 b) e neutrófilos (Figura 35 c) para o espaço alveolar em relação ao grupo veículo, no quinto dia de infecção. O número de neutrófilos nos pulmões esteve igualmente aumentado em relação ao grupo não infectado nos grupos veículo, Tamiflu e PCA (Figura 35 d). O título viral nos pulmões do grupo veículo foi de 10^7 PFU no tempo avaliado, enquanto o título dos grupos tratados com PCA ficou próximo de 10^5 PFU e do grupo tratado somente com Tamiflu, ficou em torno de 10^4 PFU (Figura 35 e).

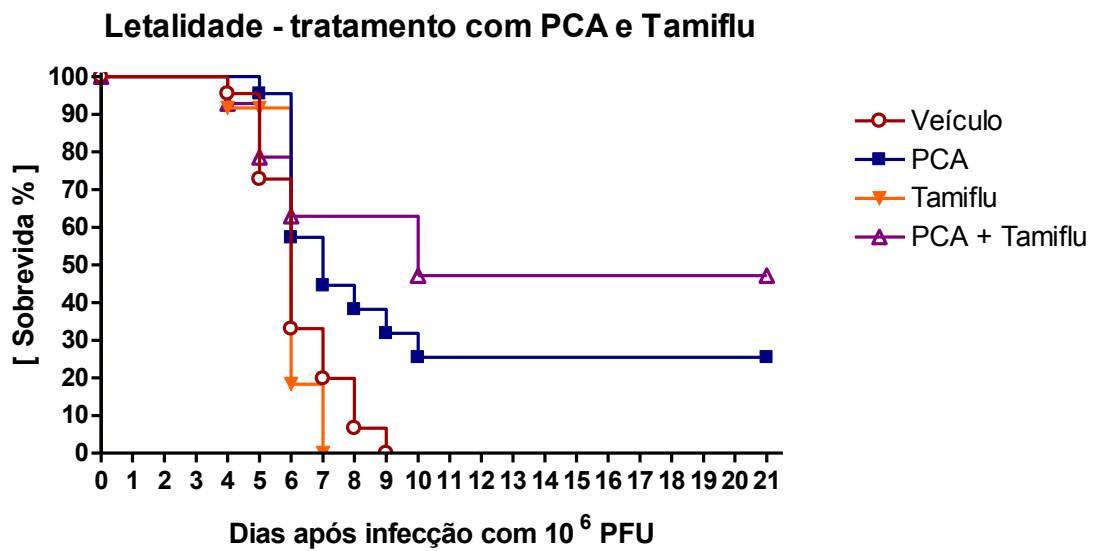


Figura 33: Letalidade de 12-22 camundongos infectados com 10^6 PFU tratados com veículo, PCA 4248 (dois experimentos independentes), com o antiviral Tamiflu ou com a combinação de PCA e Tamiflu. Através do teste de Logrank, o valor de p comparando-se o grupo Veículo com o grupo Tamiflu é 0.9751; entre Veículo e PCA é de 0.0062 e entre Veículo e PCA+Tamiflu é de 0.0203.

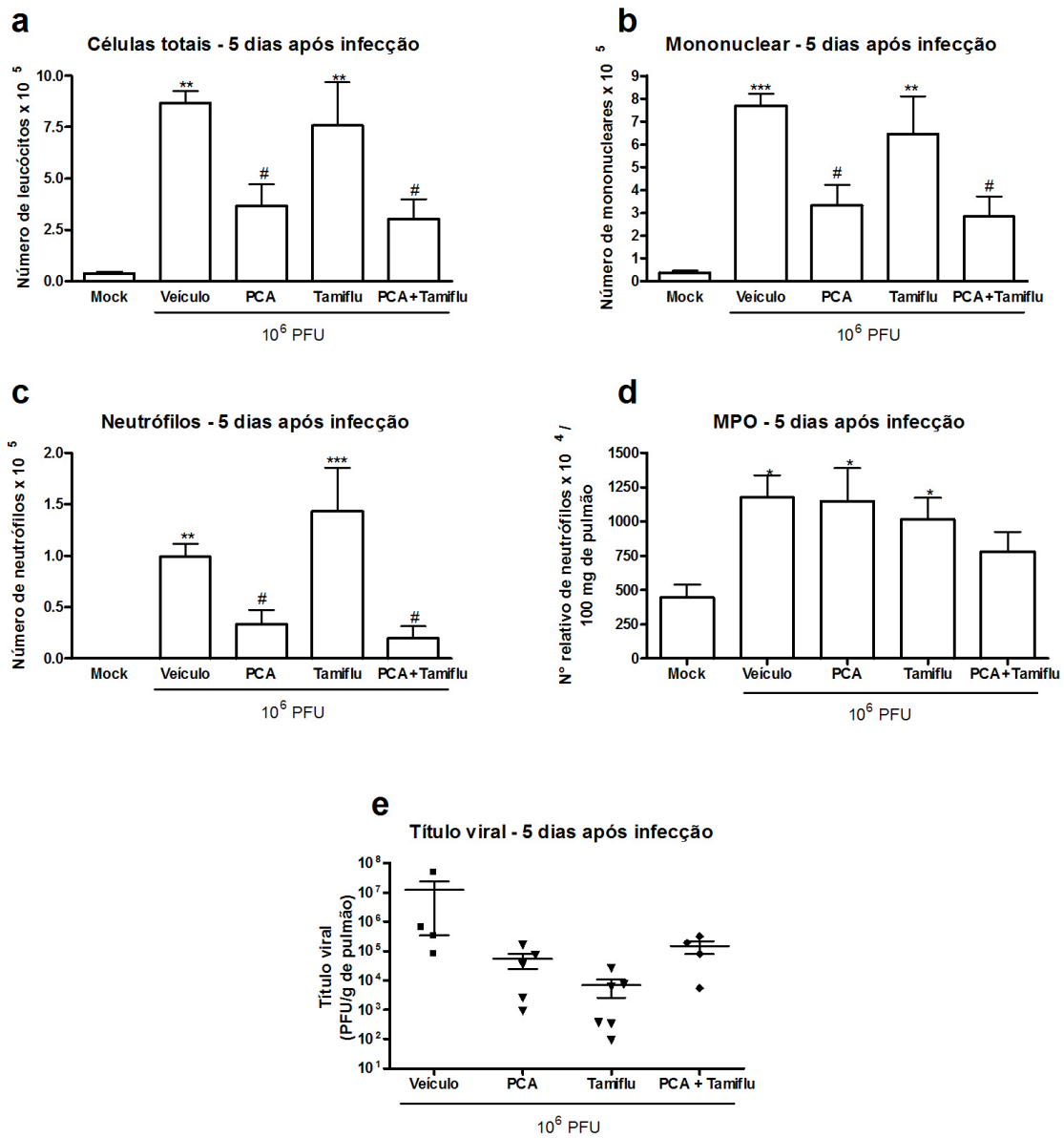


Figura 34: Recrutamento de leucócitos totais (a), de mononucleares (b) e de neutrófilos (c) para o BAL; recrutamento de neutrófilos para os pulmões (d) e título viral nos pulmões (e) após 5 dias de infecção com 10^6 PFU em animais tratados com PCA, Tamiflu ou PCA e Tamiflu ou com veículo. Os resultados apresentam a média \pm EPM de 4-7 animais por grupo e foram representados com * para $p < 0.05$, ** para $p < 0.01$ e *** para $p < 0.001$ em relação ao grupo não infectado e # para $p < 0.05$ quando comparados os com o grupo veículo; teste *One-Way* ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls.

4.3 – MODELO EXPERIMENTAL DE INFECÇÃO PELO VÍRUS INFLUENZA A EQUINE/CORDOBA/18/1985 - YAMAGATA/32/1989 H3N1

Visando comparar a magnitude da resposta inflamatória de dois subtipos de vírus Influenza A, o vírus adaptado a camundongos, H1N1 A/WSN/33 e o vírus H3N1 Equine/Cordoba/18/1985 - Yamagata/32/1989 utilizado para infecções *in vitro*, após duas passagens em camundongos, foram utilizados para infecções *in vivo* em camundongos C57 BL6/J.

4.3.1 – Determinação do inóculo letal

Com apenas duas passagens em camundongos, o vírus Influenza A Equine/Cordoba/18/1985 - Yamagata/32/1989 H3N1 foi capaz de causar doença apenas nos dois inóculos mais altos, de 10^5 e 10^6 PFU, verificada pela perda de peso e sinais tais como piloereção e diminuição de atividade (Figura 36 a). A perda de peso máxima observada após a infecção com o maior inóculo foi com 3 dias de infecção, quando os animais haviam perdido, em média 17.3% do peso inicial, e após esse período houve uma recuperação gradual do peso. O inóculo de 10^5 PFU provocou perda de peso máxima no 4º dia de infecção, com média de 8%, seguida de uma recuperação contínua. O inóculo de 10^6 PFU provocou 25% de letalidade (Figura 36 b). Nos demais inóculos, não foi observada perda de peso associada à infecção.

4.3.2 – Comparação da resposta inflamatória

No quinto dia de infecção com o inóculo de 10^6 PFU dos vírus H3N1 e H1N1 foram observadas diferenças significativas quanto à resposta inflamatória a esses dois subtipos de vírus. Primeiramente, a infecção de 10^6 PFU pelo vírus Influenza A/WSN/33 H1N1 foi bem mais letal, levando a uma perda de peso pronunciada, mais que duas vezes maior do que a provocada pelo vírus Influenza A H3N1 (Figura 37 a). Como visto durante a cinética de infecção pelo vírus H1N1, o aumento dos níveis de hematócrito e de proteínas totais no BAL

correlacionou-se diretamente à perda de peso observada (Figura 11). Da mesma maneira, a comparação dos níveis de hematócrito e de proteínas totais no BAL entre os dois subtipos de vírus mostrou resultados semelhantes à perda de peso no período de infecção avaliado, ou seja, aumentos decorrentes da infecção, porém menores nos animais infectados com o vírus H3N1 em relação aos infectados com H1N1 (Figura 37 b, c). O número de células totais e de mononucleares recrutados para o espaço alveolar aumentou em ambas as infecções, mas foi menor em H3N1 quando comparado com H1N1 (Figura 37 d, e). Por outro lado, o número de neutrófilos recrutados para o espaço alveolar e para os pulmões, aumentado perante as infecções, foi maior em animais infectados com o vírus menos letal, H3N1 (Figura 37 f, g).

4.3.3 - Infecção em camundongos deficientes no receptor de PAF

Uma vez encontrada uma proteção em camundongos deficientes no receptor de PAF ou tratados com o antagonista do mesmo receptor quando infectados com o vírus Influenza A/WSN/33 H1N1, buscou-se saber se a mesma proteção seria alcançada ao ser utilizado um segundo tipo de vírus Influenza A para a infecção. A partir da infecção com o maior inóculo do vírus H3N1 – de 10^6 PFU – em animais selvagens (WT) e deficientes no receptor de PAF (PAFR KO), foi possível observar que os dois grupos se comportam de maneira diferente durante a infecção. Os animais PAFR KO se recuperaram mais rapidamente da perda de peso associada à infecção e no 11º dia de infecção já apresentavam ganho de peso em relação aos animais selvagens ($0.6 \pm 1.4\%$ versus $14.1 \pm 5.8\%$, $p=0.0392$), recuperação que se seguiu no 13º e 14º dias de infecção (Figura 38 a). Em relação à letalidade, nenhum animal PAFR KO sucumbiu à infecção, enquanto 25% dos WT morreram após 15 dias de infecção (Figura 38 b).

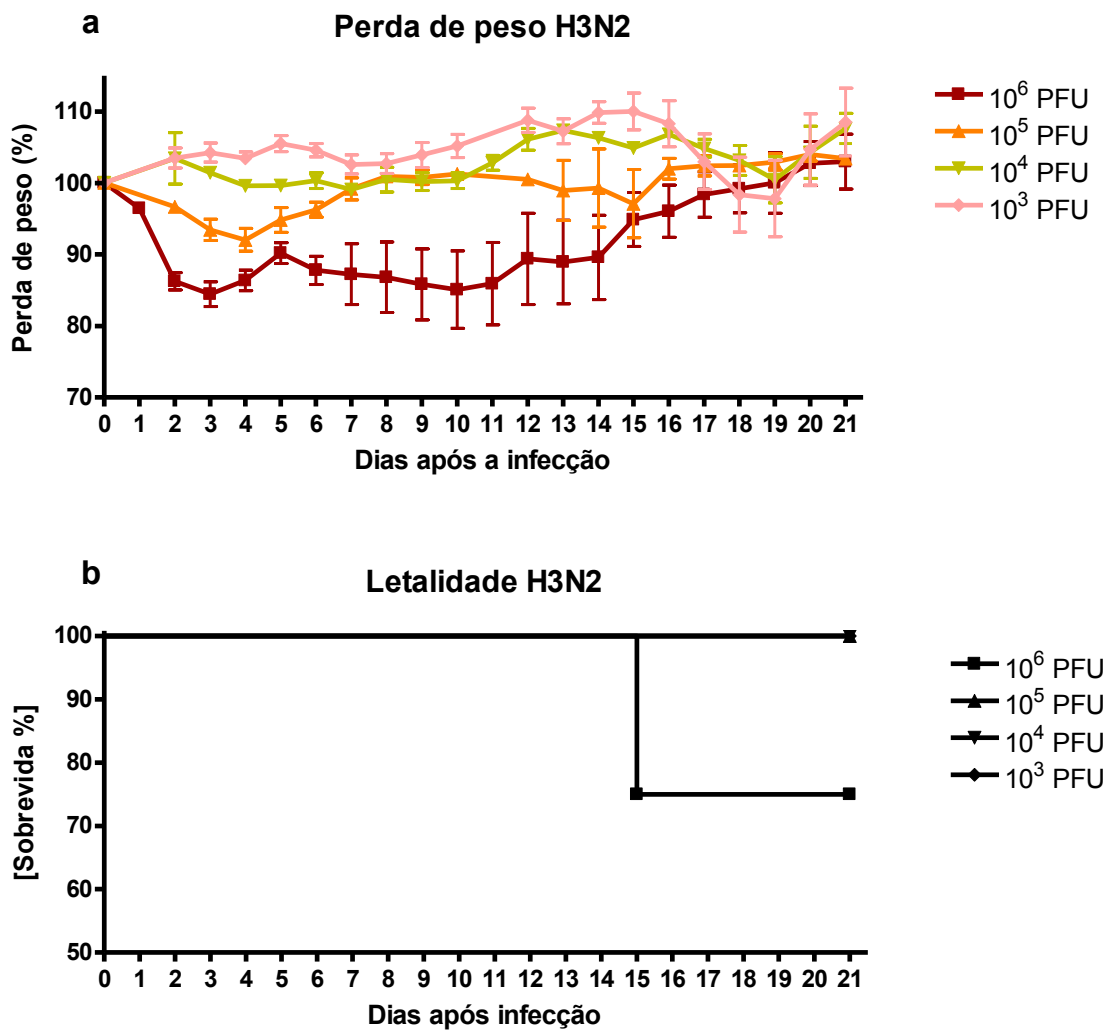


Figura 35: Perda de peso (a) e letalidade (b) associadas à infecção pelo vírus Influenza A Equine/Cordoba/18/1985 - Yamagata/32/1989 H3N1 nos inóculos de 10^3 , 10^4 , 10^5 e 10^6 PFU. Os dados representam 3 a 4 indivíduos e são expressos como média \pm EPM para perda de peso.

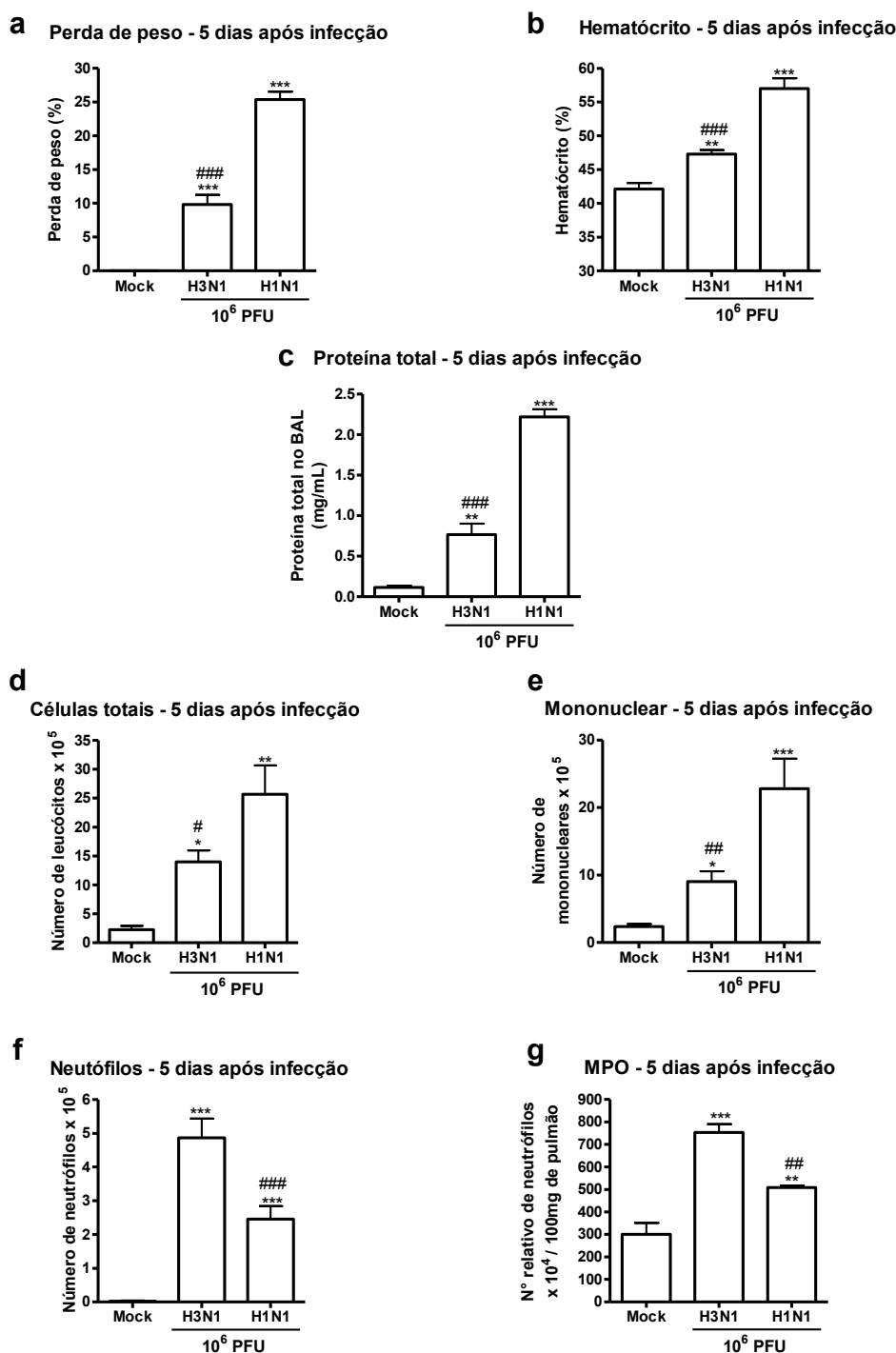


Figura 36: Perda de peso (a), níveis de hematócrito (b), níveis de proteínas totais no lavado broncoalveolar (c), recrutamento de leucócitos totais (d), células mononucleares (e) e neutrófilos (f) para o espaço alveolar e de neutrófilos para os pulmões (g) observados após a 5 dias de infecção pelos vírus Influenza A/WSN/33 H1N1 e H3N1 Beijing/353/89 no inóculo de 10^6 PFU. Os resultados apresentam a média \pm EPM de 3-10 animais por grupo e foram representados com * para $p < 0.05$, ** para $p < 0.01$ e *** para $p < 0.001$ em relação ao grupo não infectado e # para $p < 0.05$, ## para $p < 0.01$ e ### para $p < 0.001$ quando comparados os grupos infectados; teste *One-Way* ANOVA, pós-teste de Newman-Keuls.

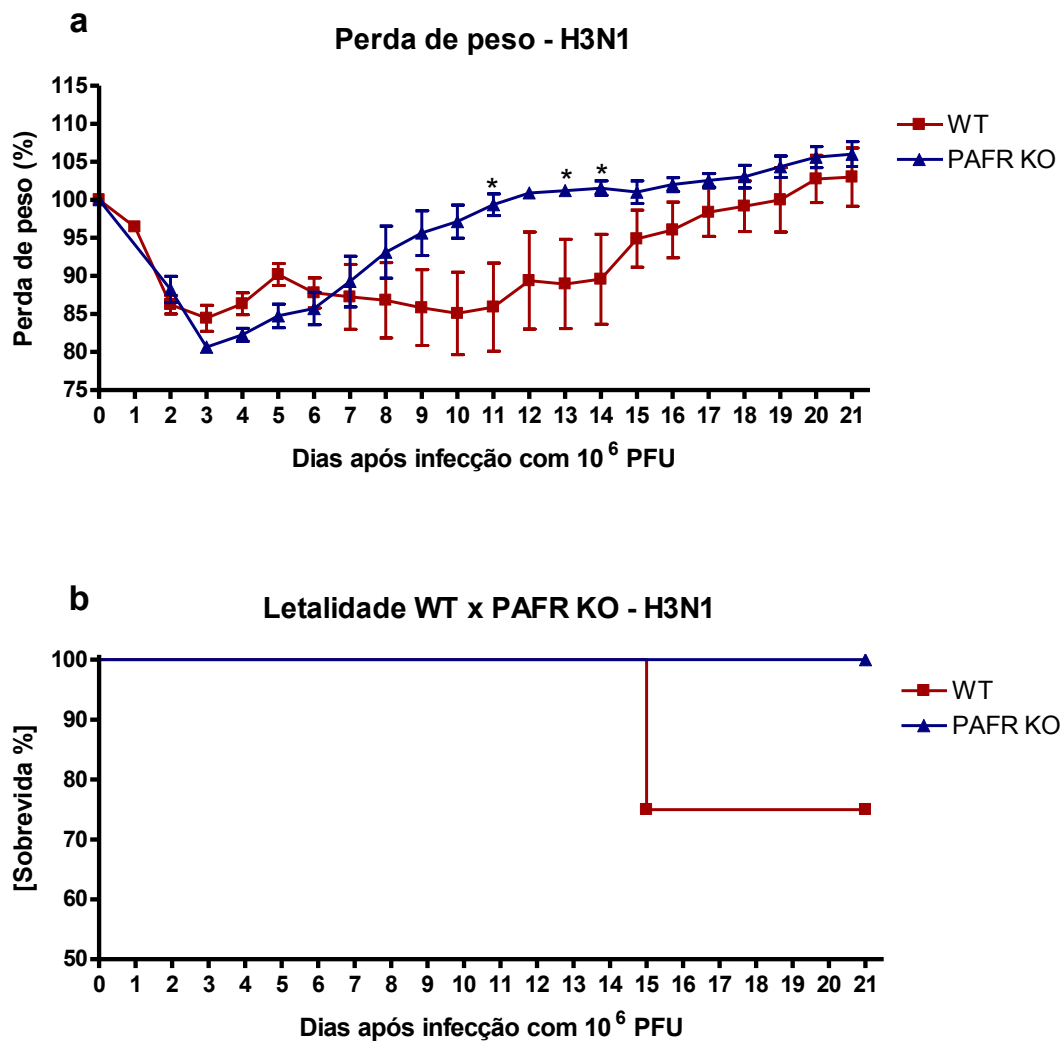


Figura 37: Perda de peso (a) e letalidade (b) causadas pela infecção por 10^6 PFU do vírus H3N1 em camundongos selvagens (WT) e deficientes no receptor de PAF (PAFR KO). Os dados de perda de peso foram expressos como a média \pm EPM de 4 a 5 animais por grupo. A análise da diferença de perda de peso foi feita por dia de infecção utilizando Teste t não-pareado e diferenças com $p < 0.05$ foram representadas com *.

5 - Discussão

5.1 – DISCUSSÃO

Dentre as superfícies mucosas do nosso organismo, o pulmão destaca-se por estar em contato direto e constante com partículas, antígenos e microorganismos do ambiente, uma vez que, a cada minuto, cerca de 10 litros de ar passam pelas vias aéreas. Todavia, a evolução proporcionou ao pulmão diversos mecanismos de defesa que garantem a este órgão um estado quiescente em condições fisiológicas. Em resposta a infecções, as ações coordenadas de reconhecimento e produção de citocinas e mediadores inflamatórios por células do sistema imune inato geram uma resposta imune adaptativa capaz de combater o patógeno invasor e retornar à homeostase. No entanto, a ativação excessiva do sistema imune ou uma resolução ineficaz podem acarretar em dano tecidual irreversível e morte do organismo infectado (STRIETER *et al.*, 2002; KOHLMEIER e WOODLAND, 2008). No que diz respeito à infecção pelos vírus Influenza, foi demonstrado que o curso da infecção por vírus letais está diretamente correlacionado à magnitude da resposta inflamatória inicial. Ou seja, vírus altamente patogênicos estimulam um recrutamento mais acentuado de neutrófilos e macrófagos (PERRONE *et al.*, 2008).

O modelo de infecção utilizado no presente estudo buscou retratar as manifestações patológicas de casos graves de Influenza sazonal e pneumonia viral. Com esse objetivo, foram avaliados os inóculos capazes de causar 100% e 50% de letalidade. Os resultados mostraram que o desenvolvimento dos sinais associados à doença é progressivo e inóculo-dependente. De acordo com os nossos resultados, a recente revisão de Barnard, 2009, discute sobre a correlação entre a carga viral inoculada e a severidade da doença, medida por parâmetros como perda de peso, título viral e escores histopatológicos em modelos de infecção grave em camundongos. Adicionalmente, os níveis de hematócrito e a concentração de proteínas no lavado broncoalveolar correlacionaram-se diretamente com a perda de peso. O aumento da concentração de proteínas nas vias aéreas reflete o edema e o extravasamento protéico que se seguem ao evento inflamatório associados à infecção pelo vírus Influenza (LIN *et al.*, 2008). A perda de plasma sanguíneo, levando ao aumento dos níveis de hematócrito, já foi usada como parâmetro da infecção em humanos (GILBERT *et al.*, 1985), mas não é descrita na literatura em modelos animais de infecções pelo vírus Influenza. Dessa maneira, pode-se dizer

que um novo parâmetro para avaliar a infecção pelo vírus Influenza foi estabelecido. Assim como descrito na literatura (BARNARD, 2009), mudanças histológicas na estrutura pulmonar puderam ser observadas após a infecção, sendo que, o inóculo letal provocou um maior grau e um padrão mais extenso de infiltração inflamatória, com áreas de edema e produção de muco.

A quantificação de leucócitos no espaço alveolar e no parênquima pulmonar revelou que o recrutamento neutrofílico para as vias aéreas é máximo em tempos precoces, entre três e quatro dias de infecção; a persistência dessas células nos pulmões dos animais infectados com o maior inóculo do vírus H1N1 pode explicar a maior mortalidade em resposta a esse inóculo. O aumento dos níveis da enzima N-acetil-glicosaminidase observado é subsequente ao aumento nos níveis de mieloperoxidase, levando a crer que os macrófagos são recrutados para os pulmões posteriormente aos neutrófilos e provavelmente exercem uma função de *clearance* de neutrófilos mortos para a resolução da fase inflamatória. As citocinas IL-6 e TNF- α e as quimiocinas CXCL1 e CXCL2, sabidamente reguladas positivamente durante a infecção pelos vírus Influenza (JULKUNEN *et al.*, 2001), estiveram aumentadas somente no início da infecção, retornando a níveis basais com o progresso da doença, enquanto os níveis de CCL2 se mantiveram elevados nos tempos avaliados. O papel da quimiocina CCL2 na infecção pelo vírus Influenza ainda é controverso na literatura. Estudos com animais deficientes em CCL2 mostraram que esses animais apresentam maior perda de peso e maiores títulos virais pós-Influenza, o que foi correlacionado pelos autores ao menor recrutamento de macrófagos e neutrófilos para os pulmões e maiores níveis de citocinas pró-inflamatórias (DESSING *et al.*, 2007). Em contraste, o trabalho de Lin e colaboradores de 2008 mostrou que a ausência do receptor de CCL2, CCR2, protege contra a infecção experimental por Influenza em camundongos. Enquanto o primeiro trabalho enaltece o papel de CCL2 na montagem de uma resposta imune protetora contra a infecção, o segundo demonstra que os monócitos inflamatórios CCR2+ predominam nos pulmões e são a causa da patologia observada. O estudo de Lin, ainda, não descarta o papel dos neutrófilos na patogênese associada à infecção em tempos mais precoces do que o 6º dia de infecção avaliado. Possivelmente o papel de CCL2 no modelo do presente trabalho aproxima-se mais ao artigo publicado por Lin e colaboradores, uma vez que o inóculo menor, e menos letal do vírus Influenza A/WSN/33 H1N1 leva a níveis decrescentes de CCL2 com o curso da infecção, que é resolvida em 55% dos animais que sobrevivem; no inóculo letal, por outro lado, estes níveis de CCL2 encontram-se igualmente elevados em todos os tempos avaliados.

Na tentativa de estabelecer um segundo modelo de infecção por outro subtipo de vírus Influenza A, foram realizadas três passagens pulmonares do vírus H3N1 Equine/Cordoba/18/1985 - Yamagata/32/1989 para torná-lo adaptado a camundongos. Passagens pulmonares múltiplas podem tornar qualquer vírus Influenza A ou B infectivo para camundongos, provavelmente devido a mutações sofridas no gene da Hemaglutinina que passam a se ligar a moléculas de ácido siálico na superfície das células murinas (BARNARD, 2009). Após a adaptação, o vírus H3N1 foi capaz de causar doença em camundongos, quando inóculos mais altos foram administrados. Entretanto, a doença manifestou-se de forma mais branda, com reduzida perda de peso e recuperação gradual na maioria dos indivíduos infectados. Ao serem comparadas as respostas inflamatórias no quinto dia de infecção com as respostas causadas pelo maior inóculo do vírus adaptado a camundongos – A/WSN/33 H1N1 – e do vírus recém adaptado - Equine/Cordoba/18/1985 - Yamagata/32/1989 H3N1, diferenças marcantes foram encontradas. Se, por um lado, o vírus H1N1 provocou aumento acentuado dos principais parâmetros correlacionados com a gravidade da doença: perda de peso, níveis de hematócrito e de proteínas totais no BAL e recrutamento de leucócitos totais para as vias aeras; por outro lado, o recrutamento neutrofílico para o parênquima pulmonar e para as vias aéreas foi maior no grupo de animais infectados com o vírus do subtipo H3N1. O último resultado pareceu, a princípio, contrário às expectativas e à literatura, que retrata maiores níveis de neutrófilos recrutados em resposta a vírus mais patogênicos (PERRONE *et al.*, 2008). Todavia, analisando a cinética de recrutamento de neutrófilos após a infecção pelo inóculo letal do vírus H1N1, encontramos níveis bem maiores de MPO e de números de neutrófilos no BAL em tempos mais precoces da infecção. A comparação de tempos precedentes ao quinto dia de infecção poderia comprovar se, de fato, o vírus H3N1 induziria a uma menor resposta neutrofílica em momentos iniciais da doença.

Apesar de ser descrita e ter sido vista no nosso estudo uma correlação direta entre patogênese e infiltrado de células inflamatórias após a infecção pelo vírus Influenza A/WSN/33 H1N1, a ablação neutrofílica não confere proteção a camundongos infectados experimentalmente. Logo, essas células possuem um papel importante no controle inicial ao vírus, uma vez que animais depletados de neutrófilos apresentam maiores títulos virais no início da infecção (TUMPEY *et al.*, 2005; FUJISAWA, 2008). Uma vez que os neutrófilos são importantes na defesa contra o vírus Influenza no início da infecção, mas, por outro lado levam à lesão pulmonar em casos mais graves da infecção (PERRONE *et al.*, 2008), nosso

estudo buscou um alvo que reduzisse o recrutamento dessas células sem resultar na ausência destas no momento da infecção. O alvo escolhido foi o receptor do Fator de Ativação Plaquetária. A existência de camundongos geneticamente modificados que não expressam o receptor de PAF e a disponibilidade de moléculas que antagonizam o mesmo receptor permitem a identificação de funções patofisiológicas do receptor (ISHII e SHIMIZU, 2000). Valendo-se dessas duas estratégias, buscamos identificar o papel do receptor deste mediador fosfolipídico, importante para o recrutamento e ativação de neutrófilos, durante a infecção experimental pelos vírus Influenza A. Camundongos deficientes no receptor de PAF infectados com dois inóculos do vírus Influenza A/WSN/33 H1N1, bem como com o inóculo mais alto do vírus Equine/Cordoba/18/1985 - Yamagata/32/1989 H3N1 foram protegidos da letalidade e perda de peso em relação aos animais selvagens. De maneira semelhante, o tratamento com o antagonista do receptor de PAF, PCA 4248, feito de maneira terapêutica, após o início da perda de peso e durante o pico no recrutamento neutrofílico, protegeu os animais contra a infecção por dois inóculos do vírus Influenza A/WSN/33 H1N1.

De posse de resultados bastante significativos de proteção contra a infecção experimental pelos vírus Influenza A na ausência ou com o bloqueio do PAFR, buscamos entender qual aspecto da patogênese estaria sendo influenciado nesses animais. Os tempos de infecção escolhidos para a investigação dos mecanismos envolvidos na proteção foram dias próximos ao início da letalidade causada pelo vírus, para que tivéssemos um panorama das respostas que levam o indivíduo a sucumbir à infecção. As primeiras alterações observadas nos grupos de estudo – PAFR KO e tratados com PCA 4248 – foram reduzidos números de leucócitos totais, mononucleares e neutrófilos e menor extravasamento protéico no espaço alveolar. O extravasamento protéico, um marcador de edema pulmonar, é resultante do aumento da permeabilidade vascular que, como consequência, aumenta a barreira de difusão de oxigênio acentuando a falência respiratória. O fosfolipídio PAF é conhecido como potente indutor de edema pulmonar, sendo inclusive fonte de indução da patologia em modelo experimental (ZIMMERMAN e MCINTYRE, 2005). As análises histopatológicas corroboraram com as observações iniciais e mostraram uma infiltração inflamatória menos difusa, menor hiperemia e edema. Com base nos nossos resultados e na literatura, podemos então, concluir que a ausência de sinalização de PAF na infecção pelo vírus Influenza reduz o recrutamento de leucócitos para as vias aéreas e reduz o edema pulmonar, acarretando em menor lesão no órgão e, portanto, menor letalidade.

As citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias que estão reguladas positivamente em infecções pelo vírus Influenza fazem parte da resposta aguda ao vírus. No nosso modelo, o aumento na produção de TNF- α , CXCL1 e CXCL2 restringiu-se aos primeiros dias da infecção. Dado o tempo de infecção analisado, não foram encontradas diferenças nos níveis dessas citocinas entre os grupos infectados WT e PAFR e entre os grupos tratados com PCA ou com veículo. No entanto, outras citocinas pró-inflamatórias mostraram-se alteradas. Os níveis de IL-6, aumentados em todos os grupos infectados nos pulmões, estavam reduzidos no soro de animais tratados com PCA. Infecções experimentais em humanos revelaram que o aumento sistêmico de IL-6 e IFN- α em decorrência da infecção por Influenza A está diretamente correlacionado à severidade dos sintomas da gripe (HAYDEN *et al.*, 1998). Portanto, a redução nos níveis de IL-6 ajuda a justificar a proteção em animais tratados com o antagonista de PAFR à morbidade associada infecção. A outra citocina encontrada em níveis diferentes entre os grupos infectados foi a IL-1 β , aumentada em cinco dias de infecção no grupo de animais deficientes em PAFR. Estudos com animais deficientes no receptor das citocinas IL-1 β e IL-1 α , o IL-R1 infectados pelo vírus Influenza mostraram que esses animais apresentam maior letalidade e por outro lado, menores danos patológicos. A conclusão do trabalho é a de que as citocinas IL-1 β e IL-1 α seriam responsáveis pelo recrutamento de neutrófilos que ajudam a combater a infecção viral acarretando em proteção contra a letalidade (SHMITZ *et al.*, 2005). A proteção à letalidade associada à gripe em camundongos PAFR KO pode ser, então, reforçada pela produção acentuada de IL-1 β .

A apoptose é um mecanismo de morte celular programada utilizado em diversos processos fisiológicos, mas que possui um importante papel durante o encerramento da fase inflamatória, quando as células do sistema imune inato morrem e dão lugar às células do sistema imune adaptativo (HALLETT *et al.*, 2008). O vírus Influenza é um potente estímulo apoptótico para células epiteliais (LAM *et al.*, 2008) e para neutrófilos (CALAMUSSI *et al.*, 1999) que gera conseqüências distintas nos dois tipos celulares. A indução da apoptose de células epiteliais nas vias aéreas durante o início da infecção leva à liberação de mediadores inflamatórios e correlaciona-se com infecções mais graves (LAM *et al.*, 2008). Os efeitos pró-apoptóticos sobre neutrófilos induzidos pelo vírus Influenza reduzem os níveis dessa célula inflamatória e tornam o organismo infectado mais susceptível a infecções bacterianas secundárias (CALAMUSSI *et al.*, 1999). O presente estudo confirmou que ocorre uma indução da apoptose de células das vias aéreas pelo vírus Influenza A. De fato, além de ativar

neutrófilos, PAF contribui para a sobrevivência dessas células exercendo efeitos anti-apoptóticos nessas células (KHREISS *et al.*, 2004). O ensaio de Anexina V permitiu a identificação de diferentes populações leucocitárias no espaço alveolar de acordo com o tamanho e granulosidade das mesmas. Através deste ensaio, viu-se que a incorporação de Anexina-V por granulócitos recolhidos do BAL de grupos infectados foi aumentada em decorrência da infecção e semelhante entre os grupos infectados WT e PAFR KO, o que reflete grau similar de apoptose de neutrófilos das vias aéreas. Por outro lado, os leucócitos totais, linfócitos e macrófagos recolhidos do BAL de animais PAFR KO infectados apresentaram menor taxa de apoptose. A sobrevivência das populações de linfócitos e macrófagos pode ser importante para a montagem da fase imune adaptativa posterior à fase inflamatória, que contribui para a proteção e o combate ao vírus. Além disso, a persistência da população de macrófagos nas vias aéreas pode representar importante ferramenta de limpeza das demais células, principalmente neutrófilos, que entraram em apoptose.

A redução da ativação neutrofilica a um segundo estímulo após a infecção pelo vírus Influenza é uma das causas da ocorrência de infecções bacterianas secundárias após a gripe (ABRAMSON *et al.*, 1982). O ensaio de quimioluminescência induzida por Zimosan confirmou a ocorrência desse fenômeno nas células extraídas dos pulmões de animais WT infectados. O segundo estímulo, no caso o Zimosan, produziu valores de luminescência 39% inferiores aos produzidos pelas células de animais WT não infectados. O mesmo efeito não foi observado nas células de animais PAFR KO infectados, que, pelo contrário, apresentaram 25% mais ativação que as células de animais não infectados. E, ainda a ativação das células pulmonares dos grupos infectados a um segundo estímulo foi 28% maior no grupo de animais PAFR KO. Como o ensaio foi realizado com células pulmonares totais, os efeitos de ativação devem ser atribuídos tanto aos neutrófilos quanto aos macrófagos. De fato, a conhecida desativação após a infecção pelo vírus Influenza observada em neutrófilos, também afeta os macrófagos (HARTSHORN *et al.*, 1995). Sendo assim, pode-se sugerir que os fagócitos dos animais deficientes no receptor de PAF teriam uma menor ativação pelo vírus Influenza e, conseqüentemente, sofreriam menores efeitos da desativação causada pelo vírus e teriam maiores respostas a um segundo estímulo, como uma infecção bacteriana secundária.

O perfil de leucócitos no trato respiratório é altamente alterado em decorrência de infecções. Em condições de homeostase, o parênquima pulmonar é povoado basicamente por

células dendríticas (DC) e linfócitos T de memória; as vias aéreas possuem macrófagos alveolares e linfócitos T de memória. Na resposta inata ao vírus, de 3 a 6 dias após a infecção, o parênquima e as vias aéreas recebem grandes quantidades de neutrófilos e células NK. Células T efetoras chegam aos dois compartimentos pulmonares aproximadamente no 7º dia de infecção (KOHLMEIER e WOODLAND, 2008). Nossos resultados mostram um aumento de todas as populações analisadas – NK, NKT, linfócitos T CD4 e CD8, macrófagos e neutrófilos – em decorrência da infecção nas vias aéreas. A deficiência em PAFR levou a um menor recrutamento de macrófagos e de neutrófilos para as vias aéreas após a infecção. Vale lembrar que, apesar de estarem em menor número, os macrófagos do grupo de animais PAFR KO infectados estão em uma menor taxa de apoptose. No parênquima pulmonar, apenas as células T CD8 de animais infectados encontraram-se em níveis basais, enquanto as demais populações analisadas estiveram em níveis aumentados em decorrência da infecção. Maiores níveis de granulócitos foram encontrados em animais PAFR KO.

As células NKT dos animais selvagens tiveram um aumento de 465% em decorrência da infecção, enquanto a mesma população de animais KO teve um aumento de 514%. O mesmo ocorreu para as células NK, aumentadas em 183% nos animais WT infectados e 253% nos animais deficientes no receptor de PAF. As células NK são uma peça importante na defesa do organismo contra os vírus Influenza. O reconhecimento de células infectadas pelo vírus através dos receptores NKp46 e a secreção da citocina IL-12 por células como as DC estimulam a citotoxicidade mediada por NK e a produção de IFN- γ por essas células (LANIER, 2008). No entanto, os níveis das citocinas IL-12/IL-23p40 e IFN- γ e da quimiocina CCL5 estiveram reduzidos nos pulmões de animais PAFR KO infectados em relação ao grupo WT infectado. Níveis reduzidos de IFN- γ podem ser em parte explicados pela menor porcentagem de células T CD4+ nos pulmões. Estas células, em resposta ao vírus Influenza, polarizam a produção de citocinas para respostas Th1 e produzem IFN- γ , IL-2 e TNF- α (BROWN *et al.*, 2004). Os resultados pareceram, a princípio, conflitantes, pois um número elevado de células NK produziria, em teoria, níveis elevados de IFN- γ e CCL5 ou estariam proliferando mais sob efeito de IL-12/IL-23p40 e teriam uma maior atividade antiviral. Uma investigação detalhada na literatura trouxe possíveis explicações para o fenômeno. Desde os anos 80, estudos revelam a importância de PAF na atividade citotóxica das células NK, uma vez que o uso de antagonistas do receptor de PAF reduziu a atividade de citotoxicidade de células NK e a adição de PAF à cultura de células NK aumentou a citotoxicidade sobre

células K562 (MANDI *et al.*, 1989). Trabalhos posteriores revelaram que, sob estimulação, células NK apresentam níveis elevados do receptor de PAF, produzem maiores quantidades do fosfolípido, exercendo maior atividade citolítica (BERTHOU *et al.*, 2000; JIN *et al.*, 2005). O IFN- γ produzido pela própria célula NK pode ser um potente estimulador da expressão de PAFR em células tumorais. Além disso, PAF parece exercer importante função na ligação de perforinas nas células tumorais (BERTHOU *et al.*, 2000). O trabalho de Jin e colaboradores mostrou ainda, que PAF produzido por células inflamatórias recruta células NK ativadas por IL-2, IL-12, IL-15 e IFN- α . O mesmo artigo demonstrou que PAF inibe a secreção de IFN- γ de células NK ativadas por IL-12 ou IL-15, mas não por IL-2 (JIN *et al.*, 2005). Sendo assim, podemos inferir que a ausência do receptor de PAF poderia contribuir para uma reduzida ativação de células NK e, conseqüentemente a citólise de células infectadas pelo vírus Influenza A. E ainda, que a ativação de células NK pode ser mediada por IL-2, tendo como base a redução progressiva desta citocina durante o curso da infecção, indicando um consumo contínuo da mesma. Uma vez que o título viral de animais deficientes no receptor de PAF é semelhante ou menor que o de animais WT, a menor atividade de células NK não interferiu, portanto, no combate ao vírus, mas sim na lesão tecidual associada à morte de células infectadas. Além disso, os níveis de IFN- γ , mesmo reduzidos, são capazes de induzir uma posterior resposta imune adaptativa, visto que os animais PAFR KO desenvolvem proteção à reinfeção pelo mesmo tipo de vírus Influenza A, assim como animais WT. A menor produção de IFN- γ pode, ainda, acarretar em menor produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos infectados (KACERGIUS *et al.*, 2006), o que corrobora com o menor dano tecidual observado em animais PAFR KO.

Além do efeito protetor alcançado pelo uso de um antagonista do receptor de PAF na infecção pelo vírus Influenza A, o trabalho demonstrou um potencial efeito protetor sinérgico na combinação do antagonista com um fármaco inibidor da neuraminidase viral. O fármaco oseltamivir é utilizado como profilaxia ou tratamento dos casos mais graves de gripe. Dessa maneira, a sua administração deve ser imediata à exposição a um foco de gripe ou imediata ao surgimento dos sintomas. Estudos que iniciaram o tratamento com o fármaco na dose de 1mg/kg/dia antes da infecção experimental apontaram proteção de 60-86% à letalidade (SIDWELL *et al.*, 1998; GAROZZO *et al.*, 2007). Um estudo de 2006, envolvendo infecção experimental em camundongos, aponta proteção à letalidade de 20 a 40%, iniciando-se o tratamento do 3º ao 5º dia de infecção, com a dose de 10mg/kg/dia (SMEE *et al.*, 2006). Com

base nesses estudos, a dose de 1mg/kg/dia foi escolhida de modo que não houvesse proteção completa, o que inviabilizaria a observação de um possível efeito da combinação do tratamento do antiviral com PCA 4248. Apesar da letalidade acentuada no grupo tratado somente com Tamiflu[®], o título viral caiu significativamente em relação ao grupo veículo. Em 2008, Zheng e colaboradores mostraram que o uso terapêutico de Zanamivir, outro inibidor de Neuraminidase, após 2 dias de infecção pelo vírus Influenza A é capaz de conferir proteção significativa contra a letalidade se associado com fármacos imunomodulatórios inibidores de COX-2, embora o uso do antiviral sozinho após 48 horas de infecção proteja apenas 10% dos animais.

Em suma, o modelo murino de patogênese induzida pelo vírus Influenza A utilizado demonstrou uma correlação direta entre a gravidade da doença e as manifestações inflamatórias. O presente trabalho demonstrou, pela primeira vez, que o receptor do Fator de Ativação Plaquetária possui papel importante na patogênese associada à infecção por dois subtipos do vírus Influenza A, H1N1 e H3N1. A sinalização do mediador fosfolipídico participa do recrutamento de neutrófilos para as vias aéreas, da ativação de fagócitos pulmonares, da formação de edema pulmonar e na ativação de células NK após a infecção por Influenza. Os efeitos secundários às ações de PAF são maiores danos pulmonares, maior produção de citocinas relacionadas à ativação de células NK e maior letalidade, sem que haja interferência direta, ou ainda, dificultando o combate aos vírus. Além disso, não há participação do sistema PAF-PAFR na montagem da resposta imune adaptativa à infecção pelo vírus Influenza A.

5.2 – CONCLUSÃO

Com base nos nossos resultados e na literatura, é possível concluir que a ausência da sinalização de PAF resulta em proteção à morbidade associada à infecção pelo vírus Influenza devido à menor atividade inflamatória em resposta ao vírus. Dessa maneira, o uso de fármacos antagonistas do receptor de PAF pode representar importante terapia no controle da resposta inflamatória associada à infecção pelos vírus Influenza A e conseqüentemente, reduzir a mortalidade associada às formas mais graves da doença. A utilização de inibidores da atividade inflamatória do hospedeiro em resposta ao vírus representa uma alternativa ao uso de antivirais, pois não possui ação restrita a diferentes variantes do vírus. A combinação de antagonistas de PAFR com fármacos antivirais tem grande potencial terapêutico, principalmente se utilizado em tempos posteriores à infecção, quando o uso de antivirais possui ação restrita.

6 - Referências Bibliográficas

- Abramson, J. S., D. S. Lyles, et al. (1982). "Influenza A virus-induced polymorphonuclear leukocyte dysfunction." *Infect Immun* 37(2): 794-9.
- Abu-Zidan, F. M., S. Walther, et al. (1994). "Modulation of lung injury by platelet-activating factor antagonism in nonhypotensive porcine endotoxemia." *Circ Shock* 44(3): 148-53.
- Allen, I. C., M. A. Scull, et al. (2009). "The NLRP3 inflammasome mediates in vivo innate immunity to influenza A virus through recognition of viral RNA." *Immunity* 30(4): 556-65.
- Barcelos, L. S., A. Talvani, et al. (2004). "Impaired inflammatory angiogenesis, but not leukocyte influx, in mice lacking TNFR1." *J Leukoc Biol* 78(2): 352-8.
- Barnard, D. L. (2009). "Animal models for the study of influenza pathogenesis and therapy." *Antiviral Res* 82(2): A110-22.
- Beigel, J. H. (2008). "Influenza." *Crit Care Med* 36(9): 2660-6.
- Berthou, C., J. Bourge, et al. (2000). "Interferon-gamma-induced membrane PAF-receptor expression confers tumor cell susceptibility to NK perforin-dependent lysis." *Blood* 95(7): 2329-36.
- Boni, M. F. (2008). "Vaccination and antigenic drift in influenza." *Vaccine* 26 Suppl 3: C8-14.
- Bot, A., S. Bot, et al. (1998). "Protective role of gamma interferon during the recall response to influenza virus." *J Virol* 72(8): 6637-45.
- Bouvier, N. M. e P. Palese (2008). "The biology of influenza viruses." *Vaccine* 26 Suppl 4: D49-53.
- Brown, D. M. E. Román, et al. (2004) "CD4 T cell responses to influenza infection." *Semin in Immunol* 16(3): 171-7
- Bruder, D., A. Srikiatkachorn, et al. (2006). "Cellular immunity and lung injury in respiratory virus infection." *Viral Immunol* 19(2): 147-55.
- Burns, A. R., C. W. Smith, et al. (2003). "Unique structural features that influence neutrophil emigration into the lung." *Physiol Rev* 83(2): 309-36.
- Butler, D. (2007). "Cheaper approaches to flu divide researchers." *Nature* 448(7157): 976-7.

- Caini P, Guerra C.T., et al (2007). "Modifications of plasma platelet-activating factor (PAF)-acetylhydrolase/PAF system activity in patients with chronic hepatitis C virus infection". *J Viral Hepat* 14(1):22-28.
- Chao, W. e M. S. Olson (1993). "Platelet-activating factor: receptors and signal transduction." *Biochem J* 292 (Pt 3): 617-29.
- Chen, J. e Y. M. Deng (2009). "Influenza virus antigenic variation, host antibody production and new approach to control epidemics." *Virol J* 6: 30.
- Cheung, T. K. e L. L. Poon (2007). "Biology of influenza a virus." *Ann N Y Acad Sci* 1102: 1-25.
- Collin, N., X. de Radigues, et al. (2009). "New influenza A(H1N1) vaccine: How ready are we for large-scale production?" *Vaccine*.
- Colman, P. M. (1999). "A novel approach to antiviral therapy for influenza." *J Antimicrob Chemother* 44 Suppl B: 17-22.
- Condliffe, A. M., E. R. Chilvers, et al. (1996). "Priming differentially regulates neutrophil adhesion molecule expression/function." *Immunology* 89(1): 105-11.
- Cox, N. J. e K. Subbarao (1999). "Influenza." *Lancet* 354(9186): 1277-82.
- Daigneault, D. E., K. L. Hartshorn, et al. (1992). "Influenza A virus binding to human neutrophils and cross-linking requirements for activation." *Blood* 80(12): 3227-34.
- Dawood, F. S., S. Jain, et al. (2009). "Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans." *N Engl J Med* 360(25): 2605-15.
- Dessing, M. C., K. F. van der Sluijs, et al. (2007). "Monocyte chemoattractant protein 1 contributes to an adequate immune response in influenza pneumonia." *Clin Immunol* 125(3): 328-36.
- Fleming, D. M. (2001). "Influenza diagnosis and treatment: a view from clinical practice." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356(1416): 1933-43.
- Fujisawa, H. (2008). "Neutrophils play an essential role in cooperation with antibody in both protection against and recovery from pulmonary infection with influenza virus in mice." *J Virol* 82(6): 2772-83.
- García-García J. e C. Ramos (2006). "La influenza, un problema vigente de salud pública." *Salud públ de Mex* 48(3): 244-67.

- Garozzo, A., G. Tempera, et al. (2007). "N-acetylcysteine synergizes with oseltamivir in protecting mice from lethal influenza infection." *Int J Immunopathol Pharmacol* 20(2): 349-54.
- Gilbert, B. E., S. Z. Wilson, et al. (1985). "Ribavirin small-particle aerosol treatment of infections caused by influenza virus strains A/Victoria/7/83 (H1N1) and B/Texas/1/84." *Antimicrob Agents Chemother* 27(3): 309-13.
- Hallett, J. M., A. E. Leitch, et al. (2008). "Novel pharmacological strategies for driving inflammatory cell apoptosis and enhancing the resolution of inflammation." *Trends Pharmacol Sci* 29(5): 250-7.
- Hampson, A. W. e J. S. Mackenzie (2006). "The influenza viruses." *Med J Aust* 185(10 Suppl): S39-43.
- Hartshorn, K. L., M. Collamer, et al. (1990). "Characterization of influenza A virus activation of the human neutrophil." *Blood* 75(1): 218-26.
- Hartshorn, K. L., L. S. Liou, et al. (1995). "Neutrophil Deactivation by Influenza A Virus Role of Hemagglutinin Binding to Specific Sialic Acid-Bearing Cellular Proteins" *J Immunol* 154(8): 3952-60.
- Hartshorn, K. L. e M. R. White (1999). "Influenza A virus up-regulates neutrophil adhesion molecules and adhesion to biological surfaces." *J Leukoc Biol* 65(5): 614-22.
- Hayden, F. G., R. Fritz, et al. (1998). "Local and systemic cytokine responses during experimental human influenza A virus infection. Relation to symptom formation and host defense." *J Clin Invest* 101(3): 643-9.
- Ho, L. P., L. Denney, et al. (2008). "Activation of invariant NKT cells enhances the innate immune response and improves the disease course in influenza A virus infection." *Eur J Immunol* 38(7): 1913-22.
- Honda, Z., S. Ishii, et al. (2002). "Platelet-activating factor receptor." *J Biochem* 131(6): 773-9.
- Hussell, T., R. Snelgrove, et al. (2004). "Co-stimulation: novel methods for preventing viral-induced lung inflammation." *Trends Mol Med* 10(8): 379-86.
- Ishii, S. e T. Shimizu (2000). "Platelet-activating factor (PAF) receptor and genetically engineered PAF receptor mutant mice." *Prog Lipid Res* 39(1): 41-82.

- Jin, Y., B. B. Damaj, et al. (2005). "Human resting CD16⁻, CD16⁺ and IL-2-, IL-12-, IL-15-or IFN- α -activated natural killer cells differentially respond to sphingosylphosphorylcholine, lysophosphatidylcholine and platelet-activating factor" *Eur J Immunol* 35(9): 2699–708.
- Johnson, C.D., N. A. Kingsnorth, et al. (2001) "Double blind, randomised, placebo controlled study of a platelet activating factor antagonist, lexipafant, in the treatment and prevention of organ failure in predicted severe acute pancreatitis." *Gut* 48(1): 62-9
- Julkunen, I., K. Melen, et al. (2000). "Inflammatory responses in influenza A virus infection." *Vaccine* 19 Suppl 1: S32-7.
- Kawaoka Y., N. J. Cox, et al. (2005). "Family Orthomyxoviridae." *Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, p. 681-693. Editado por Fauquet, C. M., M. A. Mayo, et al. San Diego: Elsevier Academic Press. Disponível em: <http://elsevier.insidethecover.com/searchbook.jsp?isbn=9780122499517>.
- Kacergius, T. A. Ambrozaitis, et al. (2008). "Neuraminidase inhibitors reduce nitric oxide production in influenza virus-infected and gamma interferon-activated RAW264.7 macrophages." *Pharmacol Rep* 58(6):924-30.
- Kacergius, T., A. Ambrozaitis, et al. (2006). "Neuraminidase inhibitors reduce nitric oxide production in influenza virus-infected and gamma interferon-activated RAW 264.7 macrophages." *Pharmacol Rep* 58(6): 924-30.
- Kash, J. C., C. F. Basler, et al. (2004). "Global host immune response: pathogenesis and transcriptional profiling of type A influenza viruses expressing the hemagglutinin and neuraminidase genes from the 1918 pandemic virus." *J Virol* 78(17): 9499-511.
- Khreiss, T., L. Jozsef, et al. (2004). "Activation of extracellular signal-regulated kinase couples platelet-activating factor-induced adhesion and delayed apoptosis of human neutrophils." *Cell Signal* 16(7): 801-10.
- Kohlmeier, J. E. e D. L. Woodland (2009). "Immunity to respiratory viruses." *Annu Rev Immunol* 27: 61-82.
- Kuitert, L. M., R. M. Angus, et al. (1995) "Effect of a novel potent platelet-activating factor antagonist, modipafant, in clinical asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 151(5): 1331-5
- Lam, W. Y., J. W. Tang, et al. (2008). "Avian influenza virus A/HK/483/97(H5N1) NS1 protein induces apoptosis in human airway epithelial cells." *J Virol* 82(6): 2741-51.
- Langley, J. M. e M. E. Faughnan (2004). "Prevention of influenza in the general population." *CMAJ* 171(10): 1213-22.

- Lanier, L. L. (2008). "Evolutionary struggles between NK cells and viruses." *Nat Rev Immunol* 8(4): 259-68.
- Le Goffic, R., J. Pothlichet, et al. (2007). "Cutting Edge: Influenza A virus activates TLR3-dependent inflammatory and RIG-I-dependent antiviral responses in human lung epithelial cells." *J Immunol* 178(6): 3368-72.
- Li, S., J. Schulman, et al. (1993). "Glycosylation of neuraminidase determines the neurovirulence of influenza A/WSN/33 virus." *J Virol* 67(11): 6667-73.
- Lin, K. L., Y. Suzuki, et al. (2008). "CCR2+ monocyte-derived dendritic cells and exudate macrophages produce influenza-induced pulmonary immune pathology and mortality." *J Immunol* 180(4): 2562-72.
- Liu, S., K. Ji, et al. (2009). "Panorama phylogenetic diversity and distribution of Type A influenza virus." *PLoS One* 4(3): e5022.
- Maines, T. R., K. J. Szretter, et al. (2008). "Pathogenesis of emerging avian influenza viruses in mammals and the host innate immune response." *Immunol Rev* 225: 68-84.
- Mandi, Y., G. Farkas, et al. (1989) "The effect of the platelet-activating factor antagonist, BN 52021, on human natural killer cell-mediated cytotoxicity." *Immunology* 67(3) 370-4.
- Marrache, A. M., F. Gobeil, Jr., et al. (2002). "Proinflammatory gene induction by platelet-activating factor mediated via its cognate nuclear receptor." *J Immunol* 169(11): 6474-81.
- McCarty, M. F., J. Barroso-Aranda, et al. (2009). "Practical strategies for targeting NF-kappaB and NADPH oxidase may improve survival during lethal influenza epidemics." *Med Hypotheses*.
- McCullers, J. A., A. R. Iverson, et al. (2008). "The platelet activating factor receptor is not required for exacerbation of bacterial pneumonia following influenza." *Scand J Infect Dis* 40(1): 11-7.
- McCullers, J. A. e J. E. Rehg (2002). "Lethal synergism between influenza virus and *Streptococcus pneumoniae*: characterization of a mouse model and the role of platelet-activating factor receptor." *J Infect Dis* 186(3): 341-50.
- Molinari, N. A., I. R. Ortega-Sanchez, et al. (2007). "The annual impact of seasonal influenza in the US: measuring disease burden and costs." *Vaccine* 25(27): 5086-96.
- Montrucchio, G., G. Alloati, et al. (2000). "Role of platelet-activating factor in cardiovascular pathophysiology." *Physiol Rev* 80(4): 1669-99.

- Neumann, G., T. Noda, et al. (2009). "Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus." *Nature* 459(7249): 931-9.
- Nichol, K. L. e J. J. Treanor (2006). "Vaccines for seasonal and pandemic influenza." *J Infect Dis* 194 Suppl 2: S111-8.
- Opitz, B., A. Rejaibi, et al. (2007). "IFNbeta induction by influenza A virus is mediated by RIG-I which is regulated by the viral NS1 protein." *Cell Microbiol* 9(4): 930-8.
- Ottolini, M., J. Blanco, et al. (2003). "Combination anti-inflammatory and antiviral therapy of influenza in a cotton rat model." *Pediatr Pulmonol* 36(4): 290-4.
- Pappaioanou, M. (2009). "Highly pathogenic H5N1 avian influenza virus: cause of the next pandemic?" *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 32(4): 287-300.
- Perrone, L. A., J. K. Plowden, et al. (2008). "H5N1 and 1918 pandemic influenza virus infection results in early and excessive infiltration of macrophages and neutrophils in the lungs of mice." *PLoS Pathog* 4(8): e1000115.
- Rainsford, K. D. (2006). "Influenza ("Bird Flu"), inflammation and anti-inflammatory/analgesic drugs." *Inflammopharmacology* 14(1-2): 2-9.
- Regoes, R. R. e S. Bonhoeffer (2006). "Emergence of drug-resistant influenza virus: population dynamical considerations." *Science* 312(5772): 389-91.
- Reid, A. H., T. G. Fanning, et al. (1999). "Origin and evolution of the 1918 "Spanish" influenza virus hemagglutinin gene." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(4): 1651-6.
- Russo, R. C., R. Guabiraba, et al. (2009). "Role of the chemokine receptor CXCR2 in bleomycin-induced pulmonary inflammation and fibrosis." *Am J Respir Cell Mol Biol* 40(4): 410-21.
- Schmitz, N., M. Kurrer, et al. (2005). "Interleukin-1 is responsible for acute lung immunopathology but increases survival of respiratory influenza virus infection." *J Virol* 79(10): 6441-8.
- Sidwell, R. W., J. H. Huffman, et al. (1998). "Inhibition of influenza virus infections in mice by GS4104, an orally effective influenza virus neuraminidase inhibitor." *Antiviral Res* 37(2): 107-20.
- Smee, D. F., M. H. Wong, et al. (2006). "Activities of oseltamivir and ribavirin used alone and in combination against infections in mice with recent isolates of influenza A (H1N1) and B viruses." *Antivir Chem Chemother* 17(4): 185-92.

- Stohr, K. e M. Esveld (2004). "Public health. Will vaccines be available for the next influenza pandemic?" *Science* 306(5705): 2195-6.
- Strieter, R. M., J. A. Belperio, et al. (2002). "Cytokines in innate host defense in the lung." *J Clin Invest* 109(6): 699-705.
- Subbarao, K. e T. Joseph (2007). "Scientific barriers to developing vaccines against avian influenza viruses." *Nat Rev Immunol* 7(4): 267-78.
- Taubenberger, J. K. e D. M. Morens (2006). "1918 Influenza: the mother of all pandemics." *Emerg Infect Dis* 12(1): 15-22.
- Taubenberger, J. K., A. H. Reid, et al. (2001). "Integrating historical, clinical and molecular genetic data in order to explain the origin and virulence of the 1918 Spanish influenza virus." *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356(1416): 1829-39.
- Taubenberger, J. K., A. H. Reid, et al. (1997). "Initial genetic characterization of the 1918 "Spanish" influenza virus." *Science* 275(5307): 1793-6.
- Tumpey, T. M., A. Garcia-Sastre, et al. (2005). "Pathogenicity of influenza viruses with genes from the 1918 pandemic virus: functional roles of alveolar macrophages and neutrophils in limiting virus replication and mortality in mice." *J Virol* 79(23): 14933-44.
- Uhlig, S., R. Goggel, et al. (2005). "Mechanisms of platelet-activating factor (PAF)-mediated responses in the lung." *Pharmacol Rep* 57 Suppl: 206-21.
- van der Sluijs, K. F., L. J. van Elden, et al. (2006). "Involvement of the platelet-activating factor receptor in host defense against *Streptococcus pneumoniae* during postinfluenza pneumonia." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 290(1): L194-9.
- Villani A, Cirino Nm, et al (1991). "Respiratory syncytial virus infection of human mononuclear phagocytes stimulates synthesis of platelet-activating factor". *J Biol Chem* 266(9):5472-5479.
- Wang, J. P., G. N. Bowen, et al. (2008). "Toll-like receptor-mediated activation of neutrophils by influenza A virus." *Blood* 112(5): 2028-34.
- Wareing, M. D., A. L. Shea, et al. (2007). "CXCR2 is required for neutrophil recruitment to the lung during influenza virus infection, but is not essential for viral clearance." *Viral Immunol* 20(3): 369-78.
- Webby, R. J. e R. G. Webster (2003). "Are we ready for pandemic influenza?" *Science* 302(5650): 1519-22.

- Webster, R. G., W. J. Bean, et al. (1992). "Evolution and ecology of influenza A viruses." *Microbiol Rev* 56(1): 152-79.
- Weijer, S., J. C. Leemans, et al. (2003). "Host response of platelet-activating factor receptor-deficient mice during pulmonary tuberculosis." *Immunology* 109(4): 552-6.
- Widjaja, L., S. L. Krauss, et al. (2004). "Matrix gene of influenza a viruses isolated from wild aquatic birds: ecology and emergence of influenza a viruses." *J Virol* 78(16): 8771-9.
- World Health Organization web site. Geneva (2009) www.who.int
- Zheng, B. J., K. W. Chan, et al. (2008). "Delayed antiviral plus immunomodulator treatment still reduces mortality in mice infected by high inoculum of influenza A/H5N1 virus." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(23): 8091-6.
- Zimmerman, G. A. e T. M. McIntyre (2004). "PAF, ceramide and pulmonary edema: alveolar flooding and a flood of questions." *Trends Mol Med* 10(6): 245-8.