

GUILHERME PEREIRA SCAGION

**A PROTEÍNA ARFGAP COM DOIS DOMÍNIOS PLAQUISTRINOS 2  
(ADAP2) NO SISTEMA IMUNE INATO DE GALINHAS**

São Paulo

2020



GUILHERME PEREIRA SCAGION

**A PROTEÍNA ARFGAP COM DOIS DOMÍNIOS PLAQUISTRINOS 2  
(ADAP2) NO SISTEMA IMUNE INATO DE GALINHAS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para a obtenção do título de Doutor em Ciências

**Departamento:**

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

**Área de concentração:**

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

**Orientador:**

Prof. Dr. Helena Lage Ferreira

São Paulo

2020

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

## DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virgínia Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo)

T. 3971 FMVZ	Scagion, Guilherme Pereira A proteína ArfGAP com dois domínios plaquistrinos 2 (ADAP2) no sistema imune inato de galinhas / Guilherme Pereira Scagion. – 2020. 163 p. : il.  Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2020.  Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses. Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses. Orientadora: Profa. Dra. Helena Lage Ferreira.  1. ADAP2. 2. Sistema imune de galinhas. 3. Grânulos de estresse. 4. Interferon. 5. Antiviral. I. Título.
-----------------	---



São Paulo, 12 de março de 2020  
CEUax N [8346300316](#)

Ilmo(a). Sr(a).  
Responsável: Helena Lage Ferreira  
Área: Epidemiologia Experimental Aplicada As Zoonoses

Título do projeto: "A proteína ArfGAP com dois domínios plaquistrinos 2 (ADAP2) no sistema imune inato de galinhas".

**Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais FMVZ** (ID 000892)

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, no cumprimento das suas atribuições, **ANALISOU** e **APROVOU** a Alteração do cadastro (versão de 08/outubro/2019) do protocolo de estudo acima referenciado.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Venho por meio deste solicitar a alteração do título do projeto intitulado "Avaliação da expressão gênica de ISGs na resposta imune de células DF-1, após coinfeção com aMPV e NDV in vitro, CEUax N<sup>o</sup> 8346300316 registrado em: 30/03/2016, para [A proteína ArfGAP com dois domínios plaquistrinos 2 (ADAP2) no sistema imune inato de galinhas]. Durante a execução do projeto de doutorado, houve um problema em relação ao fornecimento da linhagem do cultivo celular, bem como a mudança de um dos principais colaboradores deste projeto para outra instituição na Inglaterra o que culminou em atrasos e falta de alguns importantes materiais. Dessa forma, o enfoque do projeto precisou ser alterado, e o título que foi utilizado para cadastro do CEUA não condiz mais com o estudo atual.

Atenciosamente,  
Helena".

Comentários da CEUA: "Alteração de título solicitada aprovada".

Prof. Dr. Marcelo Bahia Labruna  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade  
de São Paulo

Camilla Mota Mendes  
Vice-Coodenador  
Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade  
de São Paulo

## FOLHA DE AVALIAÇÃO

Autor: SCAGION, Guilherme Pereira

**Título: A Proteína ArfGAP Com Dois Domínios Plaquistrinos 2 (ADAP2) No Sistema Imune Inato De Galinhas**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

### Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Julgamento: \_\_\_\_\_

## **DEDICATÓRIA**

Eu gostaria de dedicar essa tese a todos os pós-graduandos, que continuam lutando e fazendo ciência. Em um país que hoje despreza o saber científico e pisa nos sonhos dos jovens cientistas. Atualmente 74% dos pós-graduandos do Brasil apresentam distúrbios de ansiedade e aqui eu me incluo entre um deles. Espero que comecemos a dar a verdadeira atenção a esse problema!

## AGRADECIMENTOS

Eu preciso, agradecer a muitas pessoas porque com toda certeza eu não conseguiria terminar esse Doutorado sem o auxílio de todos,

Primeiro agradeço, a minha família aos meus pais, os verdadeiros financiadores da minha carreira acadêmica, sem o apoio deles não seria possível eu sequer imaginar em desenvolver ciência, agradeço de coração por tudo!

Aos meus irmãos o Thiago, o Matheus e minha cunhadinha a Cássia obrigado, por me escutarem e me entenderem.

As minhas tias Fabiane e Doraci que sempre me ajudaram em tudo que podiam. Agradeço as minhas vós, Maria e Júlia por todos os ensinamentos.

Ao meu irmãozinho de vida acadêmica o Rapha, que está seguindo o caminho do seu coração.

E as minhas irmãzinhas acadêmicas a Laís e a Carla, as pessoas que sabem tanto quanto eu, quão complicada foi essa jornada do doutorado.

A Jú esse presente em forma de pessoa que faz parte das nossas vidas, se alguém é o coração que bombeia vida para esse laboratório em Pirassununga é você Jú, muito obrigado!

Ao João, a Arina, a Giovana, ao Diogo e o Júlio, a Professora Trícia e Lara, a todos os amigos de laboratório, que participaram dessa jornada.

A minha orientadora a professora Helena por compreender, que agora no final eu realmente não estava bem, e me dar o tempo necessário para que eu terminasse o doutorado.

A todo o pessoal do Instituto de Pirbright,

Ao Dr. Muhammad Munir por ter cedido seu laboratório e materiais para realizarmos essa pesquisa, Thanks!

A Archie, uma pessoa extremamente especial que nos acolheu desde o primeiro dia.

Ao Rohaim شكرًا , a pessoa que ajudou e compartilhou seus conhecimentos com a Carla e comigo, durante todo o tempo no instituto.

A Ana e seus filhos, ao Diwakar, a Dagmara, o Paulo, enfim a todos que estiveram presentes durante essa jornada nas terras européias.

E ainda, meus mais sinceros agradecimentos:



Ao professor Durigon e a Dani, que me acolheram em seu laboratório, o LVCM-ICB-USP, me ensinaram muito e me permitiram terminar esse projeto. Muito obrigado mesmo!

E aqui eu estendo esses agradecimentos, a todo o pessoal do laboratório Virologia Clínica e Molecular, ao Luciano Thomazzeli, a Dani Bastos, a Angélica, a Camis, a Erika, a Vanessa, ao Rafael, ao Fabiano, ao Erick, ao Flávio;

A Thais minha companheira de almoço e concursos,

Ao Cairo e o Seu Zé meus companheiros de perrengue,

A Nathi minha companheira de luta e de inoculação de ovos,

Muito obrigado, a todos por me ajudarem, foi incrível conhecê-los.

A com K e a Clara, que me acolheram na sua casa em Sampa, e me ajudaram a passar por dias bem difíceis.

A Daya, a Fer, a Babi, a Bibis, a Bruna, a Mari, a Marmis, a Ariela, a Flor, a Lari, a Lili, a Carol carolis, ao Tu, o Caface, a Isis, o Adriel, a Kátia, só foi possível continuar porque amigos tornam nossos dias mais leves.

A USP, a UNICAMP e a UNESP pela formação científica (completei o álbum)

A coordenação do programa de pós-graduação de Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses pelo apoio recebido, em especial ao Danival que sempre salva a minha vida com essas burocracias

As professoras Tercília, Alessandra, Paula e Clarice minhas antigas orientadoras,

A Alexandra Elbakyan, a criadora do Sci-Hub,

Aos Membros da banca,

Agradeço também as agências de fomento. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES). - Proex – IES públicas, 88882328010/2019-01, e ao projeto que auxiliou o desenvolvimento do mesmo, programa geral de cooperação Internacional (PGCI) NFIL CAPES/ Newton Foundation -Inst Links (88887141171/2017-00).

E a você que direta e indiretamente me ajudou e que não foi citado aqui,  
Um grande abraço e Obrigado por tudo!

“É só isso

That's it

Não tem mais jeito

There's no way

Acabou, boa sorte

It's over, good luck

Não tenho o que dizer

I've nothing left to say

São só palavras

It's only words

E o que eu sinto

And what I feel

Não mudará...

Won't change...”

Boa Sorte/ Good Luck

Vanessa da Mata/ Ben harper

## RESUMO

SCAGION, G. P. A Proteína ArfGAP com dois domínios plaquistrinos 2 (ADAP2) no sistema imune inato de galinhas. 2020. 163p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Aves e mamíferos possuem algumas semelhanças em seu sistema imune inato, porém também apresentam diferenças pela sua divergência evolutiva. Alguns componentes da via do interferon (IFN) estão ausentes em células de galinha, como o gene RIG-I, IRF 3 e IRF 9. Outros componentes são únicos na resposta imune inata das galinhas, como o gene do receptor do tipo Toll 15 (TLR15). A via do IFN tipo I, ativa os genes estimulados por IFN (ISGs), os quais possuem um importante papel contra os vírus, estabelecendo o estado antiviral no hospedeiro. No entanto, os mecanismos moleculares dessa indução em aves são pouco compreendidos e podem ser evolutivamente distintos dos mamíferos. Em mamíferos, uma das proteínas responsivas ao vírus e reguladas por IFN é codificada pelo gene Arf-GAP com dois domínios plaquistrinos 2 (ADAP2, também conhecido como CENTA2 e Centaurina- $\beta$ ). A caracterização molecular e biológica da proteína ADAP2 de galinha (chADAP2) foi realizada neste estudo. Análises de bioinformática foram realizadas para identificar características da sequência de aminoácidos desta proteína e compará-las com as sequências obtidas de mamíferos. A expressão do gene chADAP2 foi calculada após a infecção em células de galinha (DF-1) com o vírus da influenza aviária (AIV) de dois subtipos (H2N1 e H5N1) em diferentes tempos. A localização da proteína chADAP2 e sua interação com a proteína MAVS de galinha (chMAVS) e grânulos de estresse (G3BP1) em células de galinhas foi acessada pela microscopia confocal e pela co-imunoprecipitação. A atividade antiviral foi avaliada após a transfecção de plasmídeos expressando as proteínas de chADAP2 em células infectadas com o subtipo H9N2 do AIV. Nossos resultados mostraram que as sequências de aminoácidos da proteína ADAP2 deram origem a dois clusters (mamíferos e aves) na análise filogenética. Após a infecção com os isolados AIV houve um aumento de expressão do gene chADAP2, entre o período de 0 a 48 horas em células aviárias. A co-localização entre as proteínas chADAP2, MAVS e grânulos de estresse (G3BP1) na região citoplasmática celular foi confirmada pela microscopia confocal. A interação entre chADAP2 e chMAVS foi também comprovada pela co-imunoprecipitação. Finalmente, a atividade

antiviral foi confirmada pela diminuição de infecção de AIV em células transfectadas com o plasmídeo expressando a proteína chADAP2 em células de galinha. O presente estudo identificou que a proteína chADAP2 possui um papel semelhante ao descrito pela ADAP2 em células de mamíferos, apesar da distância genética das sequências de nucleotídeos e organização dos domínios proteicos entre eles. Nossos dados confirmam a interação entre os grânulos de estresse e as proteínas da resposta antiviral, com as proteínas chADAP2 e chMAVS envolvidas na cascata para expressão de IFN tipo I. Este é o primeiro relato sobre o papel chADAP2 em células aviárias. Este novo conhecimento sobre a resposta imune inata permitirá o desenvolvimento de ferramentas para o controle de infecções virais em aves.

Palavras-chave: ADAP2. MAVS. sistema imune de galinhas. imunidade inata. Grânulos de estresse. Interferon. Antiviral. Vírus.

## ABSTRACT

SCAGION, G. P. **ArfGAP with dual pleckstrin domains 2 protein in the chicken innate immune system**. 2020. 163p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2020.

Avian and mammals have some similarities in their innate immune system, but they also show differences due to their evolutionary divergence. A few components of the interferon (IFN) pathway are absent in chicken cells, such as the RIG-I gene, IRF 3, and IRF 9. Other components are unique in their innate immune response, like the toll-like receptor 15 (TLR15) gene. The type I IFN pathway, activates the IFN-stimulated genes (ISGs), which plays a crucial role against viruses by establishing an antiviral state in the host. However, molecular mechanisms of this induction in avian are poorly understood and can be evolutionarily distinct from mammalian. In mammalian, one of the virus-responsive and IFN-regulated protein is encoded by Arf-GAP with dual PH Domain-Containing Protein 2 gene (ADAP2, also known as CEN2A2 and Centaurin- $\beta$ ). Molecular and biological characterization of chicken ADAP2 protein (chADAP2) was performed in this study. Bioinformatics analyses were performed to identify molecular features in the amino acid sequence and compare them to sequences obtained from mammals. chADAP2 gene expression was calculated after infection in chicken cells (DF-1) with avian influenza viruses (AIV) from two subtypes (H2N1 and H5N1) at different time points. The co-localization of chADAP2 protein with the chicken MAVS (chMAVS) and stress granules (G3BP1) in chicken cells was evaluated by confocal microscopy and co-immunoprecipitation. The antiviral activity was evaluated after the transfection of plasmids expressing chADAP2 protein in cells infected with AIV from H9N2 subtype. Our results showed that the ADAP2 amino acid sequences had two clusters (mammals and avian) by phylogenetic analysis. After infection with AIV isolates, an upregulation of the ADAP2 gene was detected from 0 to 48 hours in chicken cells. Confocal microscopy assays confirmed the co-localization of chADAP2, MAVS, and G3BP1 proteins in the cells' cytoplasmic region. The interaction between chADAP2 and chMAVS has been also proven by co-immunoprecipitation. Finally, the antiviral activity of the chADAP2 was confirmed by a decrease in AIV expression in cells transfected with the plasmid expressing the chADAP2 protein in chicken cells. The present study identified that chADAP2 has a similar role, as described in

mammals' cells, despite their high genetic distances of nucleotide sequences and protein domains organization. Our results confirm the interaction among stress granules and antiviral response proteins, such as ADAP2 and chMAVS proteins involved in the cascade for IFN type I. This is the first report of the chADAP2 role in avian cells. This new knowledge about the innate immune response will allow the development of tools for controlling virus infections in birds.

Keywords: ADAP2. MAVS. chicken immune system. innate immunity. Stress granules. Interferon. Antiviral. Virus.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo da estrutura do vírion do vírus influenza A. ....	33
Figura 2. Modelo da estrutura genômica e proteômica do vírus influenza A .....	40
Figura 3. Representação do ciclo de replicação dos vírus influenza A. ....	42
Figura 4. Mecanismos de evolução do AIV. ....	47
Figura 5. Modelo de Indução de IFNs e estabelecimento de um estado antiviral em uma célula de galinha .....	55
Figura 6. Modelo de sinalização do ADAP2 durante ativação de sinalização por RIG-I. ....	66
Figura 7. Modelo para função antiviral dos grânulos de estresse (SG). ....	71
Figura 8. Laboratórios onde foram desenvolvidas as diferentes partes deste estudo .....	77
Figura 9. Procedimento de transfecção dos plasmídeos nas células DF-1 utilizando Lipofectamina 2000. ....	82
Figura 10. Equipamento de extração automatizado de ácidos nucleicos MagMAX™. ....	84
Figura 11. Comparação entre as sequências de aminoácidos ADAP2 de aves e mamíferos. ....	96
Figura 12 Comparação das sequências de aminoácidos dos diferentes domínios de ADAP2 .....	97
Figura 13. Análise molecular filogenética do gene ADAP2 pelo método da máxima verossimilhança.....	101
Figura 14. Cultivo celular DF-1 visualizado no microscópio de luz com contraste de fase 48h pós infecção (aumento 400x). ....	102
Figura 15. Células DF-1 não infectadas e após infecção com diferentes vírus (H5N2 e H2N1) com diferentes concentrações virais (MOI=1 ou 10) após 0h, 24h e 48h observadas no microscópio de luz com contraste (aumento 400x).....	103
Figura 16. Variação da concentração RNA viral (ng) ao longo dos diferentes períodos dos experimentos. ....	105
Figura 17. Quantificação da expressão relativa dos genes chADAP2 e M de AIV em células DF-1 em diferentes tempos de infecção por AIV.....	107
Figura 18. Imagens obtidas por microscopia confocal de células DF-1 transfectadas com diferentes plasmídeos contendo os genes ADAP2, MAVS e G3BP1. ....	109

Figura 19. Imagens obtidas por microscopia confocal de células DF-1 transfectadas com diferentes plasmídeos contendo os genes chADAP2, chMAVS e G3BP1 (grânulos de estresse), indicando associação entre as duas proteínas e SG.....	110
Figura 20. Resultados obtidos a partir da co-imunoprecipitação das proteínas MAVS e chADAP2 em células DF-1 transfectadas. ....	112
Figura 21. Imagens obtidas por microscopia confocal da avaliação do papel antiviral em células DF-1 que expressaram a proteína chADAP2 .....	114



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Proteoma dos vírus influenza A.....	36
Tabela 2. Oligonucleotídeos e sondas utilizados para amplificação do material genético dos testes moleculares no RT-qPCR.....	86
Tabela 3. Plasmídeos utilizados na transfecção para o ensaio de co-imunoprecipitação utilizados a 1000 ug por poço.....	91

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Representação esquemática de placa de titulação. ....	80
Quadro 2. Estimativas de identidade entre sequências de aminoácidos do dos diferentes domínios do gene ADAP2. ....	99
Quadro 3. Estimativas de distancias genéticas entre sequências de aminoácidos do gene ADAP2.....	100
Quadro 4. Dados da concentração viral do experimento quantificação da expressão de ADAP2 em células DF-1 frente à infecção viral.....	159
Quadro 5. Dados da expressão relativa dos genes ADAP2 e HPRT. ....	161
Quadro 6. Dados da expressão relativa dos genes NP de AIV e HPRT. ....	163

## LISTA DE SIGLAS

(FMR)P-Fragile X mental retardation protein	CRM-1-Região de manutenção cromossômica-1
2-5A- 2'-5' oligoadenilato	cRNP-complexo ribonucleoproteína complementar
ADAP2-Arf-GAP com dois domínios plaquistrinos 2	CVB3-coxsackievirus B3
ADP-difosfato de adenosina	CVB-coxsackievirus B
AIM 2- Absent in Melanoma 2	DAPI-4', 6-diamidino-2-fenilindol
AIV- vírus influenza aviária	DBD-domínio de ligação ao DNA
AP-1- <i>activating protein 1</i>	DENV-vírus da dengue
ARF - fator ribosilação do ADP	DF-1-Douglas Foster-1
Arf6 - fator de ribosilação do ADP 6	DHX36- <i>DEAH-Box Helicase 36</i>
ATAD5-ATPase Family, AAA Domain Containing 5,	DMEM- meio Eagle modificado de Dulbecco
ATF2 - <i>activating transcription factor 2</i>	DNA- ácido desoxirribonucleico
avSG-SG que possuem RLRs nos grânulos citoplasmáticos	DNTP- Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
BF-Bursa de Fabricius	DP- Desvio Padrão
BSA-albumina bovina sérica	<i>drift- deriva antigênica</i>
C17orf75- <i>Chromosome 17 Open Reading Frame 75</i>	dsRNA-RNA de dupla fita
CAPRIN1- <i>cell cycle-associated protein 1</i>	eGFP-proteína fluorescente verde
CARD- <i>caspase ctivation and recruitment domains</i>	eIF2 $\alpha$ - <i>eukaryotic initiation factor 2 2<math>\alpha</math></i>
CC-bobina em espiral	eIF3- <i>Eukaryotic initiation factor 3</i>
CENTB1-centaurina beta 1	eIF4G- <i>eukaryotic translation initiation factor 4G</i>
CEUA-Comitê de Ética de Uso Animal	EMCV-vírus da encefalomiocardite
cGAS-Cyclic GMP-AMP synthetase	ER- Retículo endoplasmático
CG- <i>Complexo de Golgi</i>	FMVZ-Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
chADAP2-ADAP2 de galinha	FRAP-Fluorescência após experimentos de fotodegradação
chIRF3-IRF3 de galinha	G3BP1- <i>RAS GTPase-activating protein SH3 domain-binding protein 1</i>
chMAVS-MAVS de galinha	G3BP-Ras-GAP SH3 domain binding protein
chMDA5-MDA5 de galinha	GAP-proteínas ativadoras de GTPase
chTLR15- TLR15 de galinha	GCN2- <i>general control non-derepressible protein 2</i>
CLRs-receptores <i>C-type lectin</i>	GEFs-fatores de troca de nucleotídeos de guanina
co-IP-Co-Imunoprecipitação	GTP-Trifosfato de guanosina
CpG ODNs-oligodesoxinucleotídeos de citosina-guanosina	H 5 e 7-Hemaglutinina 5 e 7
Cq- <i>Cycle Quantification</i>	H5N1-Hemaglutinina tipo 5 e neuraminidase tipo 1
Cqm-Cq médio	
CRLF3- <i>Cytokine Receptor Like Factor 3</i>	

HA-Hemaglutinina  
 HAt-Teste de Hemaglutinação  
 HAU- unidades hemaglutinantes  
 HPAIV-vírus da influenza aviária de alta patogenicidade  
 HPRT-Hipoxantina guanina fosforibosiltransferase  
 IAD-domínio de associação IRF  
 ICB-Instituto de Ciências Biomédicas  
 ICTV-*International Committee on Taxonomy of Viruses*  
 IFIT5-*Interferon Induced Protein with Tetratricopeptide Repeats 5*  
 IFITM3-transmembrana induzida por interferon-3  
 IFN I-interferons do tipo I  
 IFN –Interferon  
 IFN $\alpha$ -Interferon Alfa  
 IFN $\beta$ -Interferon Beta  
 IFN $\gamma$ -interferon gama  
 IFN $\lambda$ -IFN lambda  
 Ig- imunoglobulina  
 IKK-*I $\kappa$ B kinase*  
 IKK $\alpha$ -IKK *alpha*  
 IKK $\beta$ -IKK *beta*  
 IKK $\gamma$ -IKK *gamma*  
 IKK $\epsilon$ -IKK *epsilon*  
 IL-1 $\beta$ -Interleucinas 1 beta  
 IL-6-Interleucinas 6  
 IL-8-Interleucinas 8  
 IRES-*internal ribosome entry sites*  
 IRF3, 7 e 9 -regulador de interferon-3, 7 e 9  
 IRF-fator regulador de interferon  
 ISGF3-*type I IFN-stimulated gene factor 3*  
 ISRE-*interferon-sensitive response element*  
 IV- Influenza aviária  
 IVPI-índice de patogenicidade intravenosa  
 I $\kappa$ B-inhibitors of NF- $\kappa$ B  
 JAK-1- *Janus kinase 1*  
 JAK-STAT-*Janus kinase- signal transducer and activator of transcription*  
 J<sub>H</sub>-Gene do segmento J cadeia pesada  
 J<sub>L</sub>-Gene do segmento J cadeia leve  
 kbp-Kilo pares de base  
 KD-Domínio quinase  
 LA-líquido alantoide  
 LFDA-Laboratório Federal de Defesa Agropecuária  
 LGP2-*Laboratory of Genetics and Physiology 2*  
 LMVPA-Laboratório de Medicina Preventiva Aplicada  
 LPAIV-vírus da influenza aviária de baixa patogenicidade  
 LVCM-Laboratório de Virologia Clínica e Molecular  
 M1 e M2- proteína da matriz 1 e 2  
 MAVS-*mitochondrial antiviral-signaling protein*  
 MAVS-proteína de sinalização antiviral mitocondrial  
 MDA5-*Melanoma Differentiation-associated Gene 5*  
 MHC-complexo principal de histocompatibilidade  
 MOI- multiplicidade de infecção  
 mRNAs-RNA mensageiros  
 mRNP-*Messenger ribonucleoprotein particles*  
 Mx1-resistência a myxoma 1  
 MyD88-*myeloid differentiation primary response 88*  
 NA-neuraminidase  
 NEMO- *NF- $\kappa$ B essential modulator*  
 NEP-Proteína exportadora nuclear  
 NF1- *Neurofibromin 1*  
 NF- $\kappa$ B-fator nuclear kappa B  
 NK-natural killer  
 NLRs-receptores do tipo NOD receptores tipo  
 NOD-*nucleotide oligomerization domain*  
 NP- Nucleoproteína  
 NS1- proteína não estrutural 1

NS1, 2 e 3-Proteína não estrutural 1, 2 e 3.  
 NUP153-nucleoporina 153  
 NUP98 -nucleoporina 98  
 NXF-1-Fator 1 de exportação de RNA nuclear  
*OAS-2'-5'-oligoadenylate synthetase*  
 OIE-Organização Mundial da Saúde Animal  
 OMG-*Oligodendrocyte Myelin Glycoprotein*.  
 OMS-Organização Mundial de Saúde  
 ORF-fase leitura aberta  
 PABP-1-*Polyadenylate-binding protein 1*  
 PABP-*Poly(A)-Binding Protein*  
 PAMPs-padrões moleculares associados a patógenos  
 PA-Polimerase viral ácida  
*Pb- corpus P*  
 PB1 e 2-Polimerase básica 1 e 2  
 PBS-Tampão fosfato-salino  
 PCR-Reação de Polimerase em cadeia  
 pDCs-células dendríticas plasmocitoides  
*PERK-PKR-like endoplasmic reticulum kinase*  
 pH- potencial hidrogeniônico  
 PH-plaquistrina  
 PKR-proteína quinase R  
 Poli A-Poliadeniladas  
 Poly I:C-Ácido polinossínico-policitidílico  
 ppp-trifosfato  
 PRRs-Receptores de reconhecimento de padrões  
 R1-receptor de IFN do tipo I  
 RdRP-RNA polimerase dependente de RNA  
*RHBDL3-Rhomboid Like 3*  
*RHOT1-Ras Homolog Family Member T1*  
*RIG-I- retinoic acid-inducible gene I*  
 RLRs-receptores do tipo RIG-I  
 RNA- ácido ribonucleico  
*RNaseL- Ribonuclease Latent*  
 RNAss(-)-RNA de fita simples negativa  
 RNAss(+)-RNA de fita simples positiva  
*RNF135-Ring Finger Protein 135*  
 RNP-complexo ribonucleoproteico  
 RT-qPCR-PCR quantitativo em tempo real com RT  
 RT-Transcriptase reversa  
 SA-ácido siálico  
 SAcp-sítio aceptor de splice  
 SD-Doadores de *splicing*  
 SeV-vírus Sendai  
 SFB-Soro fetal bovino  
 SG-Grânulos de Estresse  
*Shift-rearranjo antigênico*  
 SPF-livres de patógenos específicos  
 ssRNA-RNA de fita simples  
 STAT1 e 2-*signal transducer and activator of transcription 1 and 2*  
 STING- estimuladora dos genes IFN  
*SUZ12P1-Polycomb Repressive Complex 2 Subunit Pseudogene 1*  
*SUZ12-Polycomb Repressive Complex 2 Subunit*  
 SV -paramyxovírus Sendai  
 TA - Temperatura ambiente  
*TBK1-TANK-binding kinase 1*  
 TCID<sub>50</sub>-dose infectante média de 50% em cultivo celular  
*TEFM-Transcription Elongation Factor Mitochondrial*  
*Th2-T helper 2*  
 tHA-teste de hemaglutinação  
*TIA1-T cell-restricted intracellular antigen 1*  
*TIAR-TIA1 da cytotoxic granule-associated RNA binding protein-Like 1*  
 TLRs-receptores endossômicos *Toll-like*  
 TMEV-vírus da encefalomielite murina de Theiler  
*TRAF2-tumor necrosis fator receptor-associated fator 2*  
*TRAM-TRIF-related adaptor molecule*  
*TRIF-TIR-domain-containing adapter-inducing interferon*  
*TTP -Thrombotic thrombocytopenic purpura*

TYK-2- *tyrosine kinase 2*

ULD-domínio semelhante à ubiquitina

USP-Universidade de São Paulo

UTP6-*Small Subunit Processome Component*

V<sub>H</sub>-Gene do segmento V cadeia pesada

Viperin-*Virus inhibitory protein, endoplasmic reticulum-associated, interferon-inducible*

V<sub>L</sub> – Gene do segmento V cadeia leve

vRNP- complexo ribonucleoproteico viral

VSV-vírus da estomatite vesicular

YFP- proteína fluorescente amarela

ZAP-*Zinc finger Antiviral Protein*

ZNF207-Zinc Finger Protein 207

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>23</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>26</b>
2.1 VÍRUS .....	26
2.2 VÍRUS DA INFLUENZA AVIÁRIA (AIV) .....	28
2.3 SISTEMA IMUNE.....	48
2.4 IMUNIDADE INATA E RESPOSTA ANTIVIRAL.....	52
2.5 ADAP2 .....	63
2.6 GRÂNULOS DE ESTRESSE (SG) .....	67
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>75</b>
3.1 GERAL .....	75
3.2 ESPECÍFICOS.....	75
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>76</b>
4.1 INSTALAÇÕES .....	76
4.2 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR PELAS ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA.....	77
4.3 CÉLULAS.....	78
4.4 VÍRUS .....	79
4.5 TITULAÇÃO VIRAL .....	79
4.6 PLASMÍDEOS E TRANSFECCÃO.....	80
4.7 ANTICORPOS.....	82
4.8 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DE ADAP2 EM CÉLULAS DF-1 FRENTE À INFECCÃO VIRAL .....	82
4.8.1 CULTIVO CELULAR E INFECCÃO .....	82
4.8.2 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL.....	83
4.8.3 DETECÇÃO VIRAL .....	84
4.8.4 QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DA EXPRESSÃO GÊNICA.....	87
4.8.5 ANÁLISE DOS DADOS DA DETECÇÃO.....	88
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	88
4.10 MICROSCOPIA CONFOCAL .....	89
4.11 CO-IMUNOPRECIPITAÇÃO (CO-IP).....	89
4.11.1 SOLUÇÕES .....	90
4.11.2 PREPARO DAS AMOSTRAS .....	90
4.11.3 ELETROFORESE DE GEL SDS-PAGE .....	92

4.11.4 WESTERN BLOTTING.....	92
4.12 ENSAIO PARA DETECÇÃO DE CAPACIDADE ANTIVIRAL .....	93
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>93</b>
5.1 CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR PELAS ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA.....	93
5.2 QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DE ADAP2 EM CÉLULAS DF-1 APÓS A INFECÇÃO VIRAL .....	102
5.3 LOCALIZAÇÃO DE CHADAP2 E OUTRAS PROTEÍNAS NO CITOPLASMA CELULAR .....	108
5.4 INTERAÇÃO QUÍMICA DA PROTEÍNA CHADAP2 COM OUTRAS PROTEÍNAS DA RESPOSTA INATA.....	111
5.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIVIRAL DE CHADAP2.....	112
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>115</b>
<b>7. CONCLUSÕES .....</b>	<b>121</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>122</b>
<b>APÊNDICES .....</b>	<b>158</b>
APÊNDICE A – QUADRO DE DADOS DO RT-QPCR .....	159



## 1. INTRODUÇÃO

A resposta imune inata das galinhas é única, tanto estrutural como funcionalmente. Por exemplo, uma pesquisa dos recursos genômicos demonstrou um menor número de genes complementares ao sistema imune das aves quando comparado aos de mamíferos. Análises preliminares dos genes imunes no genoma da linhagem *red junglefowl*, considerada como ancestral comum das galinhas domésticas, apontaram que essas aves já possuíam um repertório reduzido de genes imunes antes da domesticação (CONSORTIUM, I. C. G. S., 2004; MAGOR et al., 2013). Além disso, a especificidade e a amplitude das capacidades antivirais ainda não estão claras e começaram a ser investigadas recentemente (GOOSSENS et al., 2013; GOOSSENS et al., 2015).

A resposta imune inata desempenha um papel importante no combate a infecção viral. Entre essas respostas do hospedeiro, os interferons do tipo I (IFN I) apresentam um importante papel na resposta imune inata (RANDALL; GOODBOURN, 2008). Todas as células eucarióticas, em especial células imunes, são capazes de produzir IFN de tipo I para responder rapidamente aos agentes patogênicos invasores e para preparar as células vizinhas contra possíveis infecções (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012). Apesar da sua importância na patobiologia viral, das centenas de genes estimulados por interferons (ISGs) identificados e rastreados em mamíferos (> 350 em mamíferos), apenas alguns ISGs já foram caracterizados geneticamente e funcionalmente em galinhas (RANDALL; GOODBOURN, 2008).

Os ISGs são os componentes mais dominantes e eficazes da resposta do hospedeiro à infecções virais (MUNIR; KAPUR, 2003; MUNIR; SHARMA; KAPUR, 2005; HEIDARI et al., 2010; RUE et al., 2011; CONG et al., 2013). Alguns exemplos de ISGs já descritos em galinhas são: a proteína transmembrana induzida por interferon-3 (IFITM3); que inibe a entrada de vírus, a proteína de resistência a myxoma (Mx); bloqueia a fase inicial da replicação viral, *viperin* e ZAP; ISGs antivirais, 2'-5' oligoadenilato (2-5A) sintetase (OAS/ RNaseL); atuam na clivagem de transcritos de RNA virais, a proteína quinase R (PKR); sensores de receptores do tipo Toll (TLR) medeiam respostas imunes (GOOSSENS et al., 2013; QU et al., 2013; SMITH, S. E. et al., 2013; ZHANG, Y. et al., 2013; GOOSSENS et al., 2014; GOOSSENS et al., 2015).

As galinhas são deficientes em algumas proteínas da resposta imune como o fator regulador de interferon-3 (IRF3) e RIG-I (*retinoic acid-inducible gene 1*), proteínas importantes para ativação da resposta imune por via do IFN do tipo I. Esta ausência deixou várias perguntas sem resposta, por exemplo, como a falta de RIG-I e IRF3 afetam a via de sinalização de interferon de galinhas? Se a via de sinalização de interferon ocorre em galinhas, quais moléculas substituem o papel de RIG-I e IRF3?

Um estudo que avaliou a expressão ectópica de RIG-I de pato em células de galinha, conseguiu reconstituir a cascata da via de sinalização causando a indução de várias ISGs, Mx1, PKR, IFIT5, OAS (BARBER et al., 2010), o que indica a presença de um potente mecanismo de regulação da transcrição de ISGs em galinha. Outro receptor, chMDA5, da mesma família de RIG-I, foi identificado em galinhas (KARPALA et al., 2011). Este receptor, o MDA5, já foi comprovado como iniciador de cascatas de sinalização, convergindo na mesma via que leva à indução da expressão do interferon beta, IFN $\beta$  (BARBER et al., 2010; LINIGER et al., 2012).

O IRF3 é um participante crítico na indução de resposta de IFNs do tipo I após infecção por vírus (AU et al., 1995). Tanto o IRF3 quanto o IRF7 têm papéis diferentes e cruciais na indução de IFN $\alpha$  e IFN $\beta$  (HONDA, K.; TAKAOKA; TANIGUCHI, 2006; HONDA, K.; TANIGUCHI, 2006). O IRF3 é expresso constitutivamente e é ativado pela fosforilação da região C terminal, que permite a dimerização e o leva para localização nuclear (LIN, R. et al., 1998). Isso levou à sugestão de que o IRF3 seria responsável pela regulação positiva inicial do gene IFN $\beta$ , seguida pela indução IFN dependente do IRF7. No entanto, camundongos knockout para IRF7 foram gravemente prejudicados na produção de interferon após a infecção pelo vírus de RNA simples fita, ssRNA (HONDA, K. et al., 2005), sugerindo que o IRF3 possui um menor papel nessa resposta. Embora o gene encontrado em galinhas tenha sido denominado IRF3 a princípio, este é induzível por interferon, porém mais semelhante ao IRF7 (GRANT; VASA; DEELEY, 1995).

Outros autores também observaram a ausência do IRF3 em galinhas, chIRF3, e em outras espécies aviárias (CORMICAN et al., 2009; HUANG, B. et al., 2010). Portanto, não se sabe até momento, qual IRF é translocado para o núcleo para ativar a via de interferon mediada por RIG-I / MDA5 em espécies aviárias. Especula-se que o IRF7 cumpra o papel de translocação nuclear e a ativação do tipos I de IFNs na sinalização TLR e RLR, mas isso não foi examinado experimentalmente (MAGOR et

al., 2013). Estes são apenas alguns exemplos da diversidade do genoma da galinha em vias de IFN e por consequência nas de ISGs.

Em 2015, uma nova ISG foi identificada em células de mamíferos, o gene *Arfgap* com dois domínios plaquistrinos 2 (ADAP2). A proteína ADAP2 alterou o tráfego celular mediado pelo fator de ribosilação do ADP 6 (Arf6) durante a entrada de um vírus de RNA nas células de mamíferos (SHU et al., 2015). O presente estudo teve como principal objetivo caracterizar a expressão do gene de ADAP2 em células aviárias. Assim, análises de bioinformática foram realizadas para comparar as diferenças genéticas do gene ADAP2 em aves e mamíferos. A expressão do chADAP2 frente a infecções virais e a interação do gene com a proteína adaptadora MAVS e com grânulos de estresse foram analisadas. Além disso, a atividade antiviral de chADAP2 frente a infecção com AIV de baixa patogenicidade em células aviárias também foi avaliada. Nossos resultados sugerem que a atividade do gene chADAP2 apresenta funções similares às atividades descritas em mamíferos apesar das diferenças genéticas. Com isso, novas terapias antivirais e vacinas utilizando o gene chADAP2 podem ser desenvolvidas para o controle de doenças.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Vírus

Os vírus infectam as células pertencentes aos três diferentes domínios da vida, Archaea, Bacteria e Eukarya, que apresentam características homólogas, sugerindo que os vírus se originaram muito cedo na evolução da vida. (FORTERRE, 2006). Mesmo com essa longa existência e possuindo estruturas simples, uma definição concisa aos vírus é algo problemático. Pesquisadores de diferentes áreas possuem diferentes interpretações sobre a definição dos vírus. (BENSON et al., 2004; DURZYŃSKA; GOŹDZICKA-JÓZEFIAK, 2015).

Por décadas vírus foram considerados simplesmente como entidades patogênicas bioquímicas compostas por dois elementos principais: ácidos nucleicos (RNA e DNA) que constituíam seu genoma e um revestimento proteico (capsídeo) (ABRESCIA et al., 2012; ROSSMANN, 2013). Novas descobertas mudaram o entendimento dos vírus. Estes não são mais vistos com simples agentes causadores de doenças, mas sim como participantes ativos da evolução dos organismos eucariotos e procariotos. O papel dos vírus na evolução, soluciona questões como: (i) a origem do núcleo dos organismos eucariotos, (ii) o papel dos elementos genéticos moveis (iii) e o papel dos RNAs não codificantes, estão entre alguns dos exemplos (VILLARREAL; WITZANY, 2010).

Segundo Karl Popper, as definições são baseadas nos dados e nas ferramentas disponíveis em um determinado momento específico no tempo (POPPER, 2005). Dessa maneira, os vírus foram inicialmente considerados agentes infecciosos que não são visíveis ao microscópio e podem ser filtrados através de ultrafiltros de 0,22  $\mu\text{m}$  (daí o nome 'ultravírus') (LWOFF, 1957; RAOULT, 2005). Posteriormente, ao promover a dicotomia entre eucariota-procarionte, Andre Lwoff definiu vírus como pequenos (uma dimensão menor que 0,2  $\mu\text{m}$ ), agentes infecciosos, mas não autônomos, que não podem se dividir por fissão binária e consistem em proteínas e um único tipo de ácido nucleico (LWOFF, 1957).

Essas definições de vírus foram recentemente desafiadas pela descoberta de vírus maiores que os organismos celulares. Os vírus da família Mimiviridae foram considerados por anos como cocos gram-positivos, porque esses vírus grandes eram desconhecidos na época. Porém, estes ditos cocos não apresentavam nenhum produto de PCR, mesmo utilizando primers universais, direcionados ao DNA

ribossômico bacteriano 16S, mas a microscopia eletrônica finalmente resolveu esse mistério, ao revelar vírus icosaédricos de 500 nm de diâmetro com fibras de 20 nm de comprimento (LA SCOLA et al., 2003; KOONIN, 2005; RAOULT, 2013).

Estes achados demonstram como a virologia é uma ciência rica e que tem muito ainda a descobrir. Recentemente uma mudança taxonômica notável foi aprovada pelo ICTV (Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus) com o estabelecimento do reino Riboviria. Um provável clado monofilético de vírus de RNA genômico de fita positiva, fita dupla ou fita negativa que usam RNA polimerase dependente de RNA (RdRPs) para replicação. O reino Riboviria é colocado na classificação taxonômica mais alta permitida pelo Código do ICTV. As evidências de monofilia para os vírus de RNA e os vários clados dentro de Riboviria vêm se acumulando ao longo dos anos a partir de análises filogenéticas do marcador universal, RdRP, sendo complementadas pela comparação de características moleculares adicionais compartilhadas por subconjuntos destes vírus de RNA (WOLF et al., 2018; KUHN et al., 2019; WOLF et al., 2019)

Podemos dizer que com todas essas novas descobertas, os vírus continuam sendo definidos como parasitas intracelulares obrigatórios, que são formados por ácidos nucleicos e proteínas, e que são as espécies mais difundidas na Terra. Eles estão espalhados por todo o planeta e são estruturalmente simples. Sendo formados por dois estados durante seu ciclo, as partículas infecciosas dos vírus, ou vírion, que é composta pelas proteínas do revestimento viral que envolvem o genoma viral. Estas proteínas podem estar envolvidas ainda, por um 'envelope' lipídico. Sendo estas as características dos vírus detectáveis quando estes estão fora das células.(VILLARREAL; WITZANY, 2010; ANTONELLI; PISTELLO, 2019)

Quando um vírion infecta uma célula, gera o que denominamos de células virais, o segundo estado no qual os vírus podem se apresentar. Isso leva a profundas mudanças na homeostase celular e, por sua vez, alterações nas funções dos órgãos. Os vírus nesse estado são capazes de induzir efeitos bem definidos em organismos procarióticos e eucarióticos, levando a doenças agudas, como gastroenterite, gripe, ou doenças crônicas, como imunodeficiência ou hepatite. Estas infecções virais desencadeiam mecanismos muito eficazes de defesa dos hospedeiros, e induzem a modulações que podem ser transitórias ou permanentes. Dessa forma, os vírus são considerados os principais atores na evolução dos hospedeiros (ANTONELLI;

PISTELLO, 2019), o que demonstra a importância de investigarmos mais a fundo estas relações.

## 2.2 Vírus da influenza aviária (AIV)

Poucas doenças virais têm desempenhado um papel mais central no desenvolvimento histórico da virologia do que a influenza. No início do século XV, o termo influenza foi introduzido na Itália para descrever sintomas clínicos como febre, tosse e calafrio, que eram os sinais clínicos de uma epidemia atribuída à influência das estrelas. No século XVIII o mesmo termo foi utilizado pelos ingleses, e no mesmo século os franceses nomeavam os mesmos sintomas como “La gripe”(AYORATALAVERA, 1999; AGUILAR, 2002).

A pandemia que varreu o mundo em 1918, exatamente quando a Primeira Guerra Mundial terminou, foi um dos eventos mais mortais da história humana, matando cerca de 40 a 50 milhões de pessoas - mais do que a própria guerra. Porém, somente em 1933 o isolamento do vírus foi realizado em furões, determinado como um marco no desenvolvimento da virologia como ciência de laboratório (SMITH, W.; ANDREWES; LAIDLAW, 1933; BURRELL; HOWARD; MURPHY, 2017).

Os vírus influenza pertencem atualmente ao reino Riboviria, filo Negarnaviricota, subfilo Polyploviricotina, Classe Insthoviricetes, Articulavirales, família Orthomyxoviridae (ICTV, 2018). Esta família inclui vírus com os genomas compostos por diversos (seis a oito) segmentos de RNA de fita simples. Até o presente momento sete gêneros (e nove espécies) são incluídos nesta família: *Alphainfluenzavirus* (*influenza A virus*), *Betainfluenzavirus* (*influenza B virus*), *Deltainfluenzavirus* (*influenza D virus*), *Gammainfluenzavirus* (*influenza C virus*), *Isavirus* (*Salmon isavirus*), *Quaranjavirus* (*Johnston Atoll quaranjavirus*, *Quaranfil quaranjavirus*) and *Thogotovirus* (*Dhori thogotovirus* and *Thogoto thogotovirus*) (MACLACHLAN; DUBOVI, 2011; ICTV, 2018).

O gênero *Alphainfluenzavirus* contém somente uma espécie, o vírus influenza A, constituído por diversas cepas (BURRELL; HOWARD; MURPHY, 2017). Estes vírus são distribuídos em todo o mundo, causando infecções sintomáticas e assintomáticas em muitas espécies de vertebrados. Incluindo uma grande variedade de aves, como patos, gansos, andorinhas-do-mar, patagarros, gaivotas, galinhas, codornas, perus, faisões, estorninhos, periquitos, e em mais de 100 espécies diferentes de aves. Estes vírus já foram detectados também em mamíferos, como em

suínos, cavalos, cães, gatos, mamíferos marinhos, gibões, babuínos, chimpanzés, morcegos e humanos (HINSHAW et al., 1980; HINSHAW et al., 1981; WEBSTER, R. et al., 1981; NESTOROWICZ et al., 1987; LENEVA et al., 2001; CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2017).

Para identificação das diferentes cepas de influenza é utilizado o sistema de Nomenclatura da Organização Mundial de Saúde (OMS), para os vírus influenza, especifica-se o gênero, o hospedeiro (para não humanos), a localização geográfica do primeiro isolamento, o número da amostra e o ano do isolamento. A descrição antigênica da hemaglutinina (HA) e da neuraminidase (NA), glicoproteínas de superfície, é dada entre parênteses, somente para o *Influenzavirus A*, exemplo A/SWINE/lowa/15/30 (H1N1), A/PuertoRico/8/34 (H1N1)(MEMORANDUM, 1980; RÖHM et al., 1996). Existem 18 subtipos diferentes de hemaglutinina e 11 neuraminidase, com 16 HA e 9 NA sendo encontrados em aves aquáticas e o restante em morcegos (WEBSTER, R. G. et al., 1992; TONG et al., 2013).

Estudos filogenéticos dos vírus influenza A revelam que as aves aquáticas, principalmente das ordens Anseriformes e Charadriiformes, são as principais fontes de vírus influenza para outras espécies, exceto morcegos (WEBSTER, R. G. et al., 1992). Estudos realizados em material genético advindo de morcegos da Guatemala e do Peru identificaram vírus influenza A H17N11 e H18N12, respectivamente (TONG et al., 2012; TONG et al., 2013). Sendo que estes influenza vírus descobertos em morcegos, apesar de semelhantes entre si, revelaram-se como subtipos completamente novos, sendo evolutivamente distintos de todos os outros subtipos circulantes (MEHLE, 2014; WU, Y. et al., 2014; LEE, D.-H.; CRIADO; SWAYNE, 2020).

Em seu reservatório principal, principalmente nos *Anseriformes*, o vírus Influenza A se replica nos tratos intestinal e respiratório, causando doença entre leve a assintomática, embora com algum custo para o animal, incluindo redução da capacidade migratória (VAN GILS et al., 2007). Estudos tem demonstrado que a transmissão entre espécies ocorra principalmente de aves selvagens para aves domésticas, de onde se espalha para outras espécies (SHORTRIDGE, 1992; LAM et al., 2013). Contudo, já houve surtos ocasionais originados de aves domésticas, nos quais ocorreram um escape viral para aves selvagens (LIPKIND; SHIHMANTER; SHOHAM, 1982; MORGAN; KELLY, 1990; PHILIPPA et al., 2005). Sendo que um dos casos mais famosos, o da cepa H5N1 em 1996, em que o vírus A / Goose / Guangdong / 1/1996 foi isolado de um ganso doméstico durante um surto com morbidade de 40%

em uma fazenda de gansos na província de Guangdong, sul da China (XU, X. et al., 1999). Os primeiros surtos entre aves selvagens ocorreram em 2002, como resultado do escape do vírus H5N1 de aves domésticas para aves selvagens. Durante dois surtos em dois parques aquáticos em Hong Kong, o H5N1 foi detectado em várias espécies de aves aquáticas (ELLIS et al., 2004).

Nas aves domésticas infectadas pelo AIV estes podem ser diferenciados em dois patotipos de acordo com os sinais clínicos que estes vírus podem causar, principalmente em galináceos: vírus da influenza aviária de baixa patogenicidade (LPAIV) e vírus da influenza aviária de alta patogenicidade (HPAIV). Até o presente momento, apenas os subtipos H5 e H7 foram responsáveis por gerar HPAI em espécies susceptíveis, mas nem todos os vírus H5 e H7 podem ser classificados como HPAI (ALEXANDER, 2000; LIU, D., 2009; LEE, D.-H.; CRIADO; SWAYNE, 2020)

Devido aos problemas que alguns AIV causam com sua ocorrência em aves domésticas, estes devem ser notificados à Organização Mundial de Saúde Animal, OIE (WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH, 2019). Os vírus de alta patogenicidade em aves domésticas e silvestres, e os vírus de baixa patogenicidade dos subtipos H5 e H7 em aves domésticas devem ser notificados à OIE. Lembrando, que as infecções por vírus de baixa patogenicidade, que não sejam H5 ou H7, não são definidos como Influenza Aviária (IV) e, portanto, não são notificáveis. No Brasil, a influenza está contemplada na instrução Normativa nº 50 de 24 de setembro de 2013, constando na lista de doenças nunca registradas no país (MAPA, 2013).

Segundo o Código Sanitário para animais Terrestres da Organização Mundial de Saúde Animal (2016), a AIV é definida como uma infecção de aves domésticas causada por qualquer AIV dos subtipos H5 e H7 ou por qualquer vírus influenza A com índice de patogenicidade intravenosa (IVPI) maior ou igual a 1,2; ou com letalidade maior que 75%, e ainda se ao sequenciarem estes vírus os mesmos apresentarem sequências de aminoácidos (aa) no sítio de clivagem da proteína HA já observadas em outros HPAIV, estes novos vírus devem também ser classificados como de alta patogenicidade (OIE, 2016). Portanto o termo geral “influenza aviária de alta patogenicidade” (HPAI) refere-se a infecções com amostras altamente patogênicas de AIV, sendo necessário avaliar a patogenicidade dos isolados virais para aves domésticas. Embora até o presente momento, todas as amostras virais isoladas de casos naturais de HPAI sejam dos subtipos H5 ou H7, a maioria desses dois subtipos virais isolados a campo tem sido caracterizado como influenza aviária de baixa



patogenicidade (WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH, 2019). No entanto, a presença de quaisquer novas inserções nos sítios de clivagem de AIV (H5 e H7) que ainda não tiverem sido reportadas, devem atualmente ser discutidas com um Laboratório ou Centro de referência reconhecido pela OIE antes da classificação de patogenicidade do vírus (LEE, D.-H.; CRIADO; SWAYNE, 2020; OFFLU, 2020).

Nesse sentido um dos principais fatores que afetam a patogenicidade, e a disseminação tecidual dos AIV são os aminoácidos no sítio de clivagem do HA0 (forma inativa da proteína HA, antes passar pelo processo de clivagem proteolítica) e a distribuição das proteases no hospedeiro. Sabe-se que esta mudança de patogenicidade ocorre por diferentes mecanismos no sítio de clivagem proteolítico da proteína HA0, como mutação, inserção e recombinação (GARTEN; KLENK, 1983; LEE, D.-H.; CRIADO; SWAYNE, 2020). Mais especificamente, as alterações observadas no sítio de clivagem da HA dos HPAIV já descritas foram:

- 1) substituições de aas não-básicos por aas básicos e em algumas situações, acompanhadas pela perda da proteção do sítio de glicosilação,
- 2) inserções de múltiplos aas básicos advindos de códon duplicados,
- 3) inserções curtas de aminoácidos básicos e não básicos de fontes desconhecidas,
- 4) recombinação não-homóloga com RNAs celulares (por exemplo, RNA 28S do hospedeiro) ou virais (por exemplo, RNA que codifica a proteína NP ou M) que prolongam o sítio de clivagem.

As alterações (1), (2) e (3) já foram observadas nos HPAIV H5 / H7, enquanto (4) foram observadas apenas nos vírus HPAI H7 (SUAREZ et al., 2004; PASICK et al., 2005; MAURER-STROH et al., 2013; SWAYNE, 2016; LEE, D.-H.; CRIADO; SWAYNE, 2020).

Como observado nos tópicos acima a presença e o número de aa básicos no sítio de clivagem do HA, nos AIV dos subtipos H5 e H7, é uma característica de extrema importância na definição de patogenicidade destes vírus e conseqüentemente nos tipos celulares e de tecidos aos quais terá capacidade de infectar. Primeiramente, o sítio de clivagem da HA0 consiste em uma arginina (R) e uma glicina (G) adjacente conservada, podendo ser classificado em monobásico (exemplo: PEKQTR/GLF) ou multibásico (exemplo: PQRKKR/GLF). Os sítios monobásicos são clivados por proteases do tipo tripsina, sendo dessa forma confinados nas células dos tratos respiratório e gastrointestinal para sua replicação.

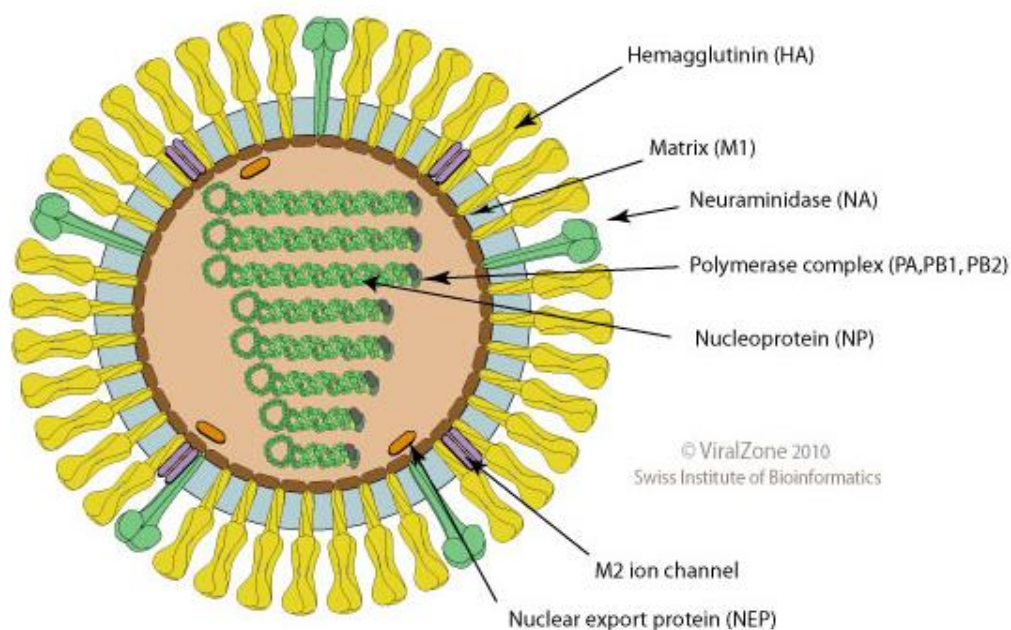
Os LPAIV H5/H7 possuem geralmente sítios de clivagem monobásicos com uma ou duas não consecutivas, arginina (R) ou lisina (K), embora em aves selvagens possa ocorrer variação no padrão desses aas. Com um aumento no número de aas básicos no sítio de clivagem, com um mínimo de 4 aa básicos, pode-se ter um aumento em sua patogenicidade. Tornando a região do sítio de clivagem não apenas alvo de proteases do tipo tripsina, mas também de proteases intracelulares, do tipo furina, que permitem a disseminação sistêmica dos vírus, e assim, aumentam a capacidade de infecção de diferentes tipos de tecido no organismo (KOBAYASHI et al.; CHEN, J. et al., 1998; BÖTTCHER et al., 2006; MAIR et al., 2014; SUAREZ, 2016; LEE, D.-H.; CRIADO; SWAYNE, 2020).

Apesar dos aas que constituem o sítio de clivagem da HA serem uma das principais características ligadas ao aumento da patogenicidade esta não é a única. Esta variação na patogenicidade está também ligada a múltiplos genes tanto do vírus como do hospedeiro. Além disso, estudos experimentais mostram que a mutação na região carboxi terminal da proteína não estrutural 1 (NS1) e deleção na região da haste da proteína NA podem contribuir para a virulência durante a mudança do vírus LPAI para HPAI, aumentando a eliminação de vírus e a adaptação nas aves domésticas (SENNE et al., 1996; KEINER et al., 2010; MUNIER et al., 2010; RICHARD; FOUCHIER; MONNE, 2017)

Quanto a sua composição química os AIV são compostos de 1% de RNA, 5 a 8% de carboidratos, 20% de lipídios e aproximadamente 70% de proteínas. Eles são sensíveis ao calor (56°C por 30 minutos), pH ácido (3,0) e solventes lipídicos pela sua composição química (PALESE, 2007; COUCEIRO; DE ALBUQUERQUE, 2015).

Seus vírions podem ser pleomórficos ou esféricos com um diâmetro de 80-120nm, quando adaptados em cultura celular. O envelope viral é constituído de uma bicamada lipídica derivada da célula do hospedeiro, que apresenta as projeções das proteínas hemaglutinina (HA), neuraminidase (NA). Associados ao envelope a proteína M2 (proteína da Matriz 2) forma o canal iônico junto com a M1. O RNA viral é protegido pela nucleoproteína (NP), que é associada a um complexo de polimerases virais, PB1 e PB2 (Polimerase básica 1 e 2) e mais uma PA (polimerase viral ácida), como pode ser visto na Figura 1 (WEBSTER, R. G. et al., 1992; ZHENG; TAO, 2013).

**Figura 1. Modelo da estrutura do vírion do vírus influenza A.**



**Legenda:** Bicamada lipídica do vírion com projeções das glicoproteínas hemaglutinina (HA) e neuraminidase (NA) e está associada à proteína da Matriz 1 (M1). A proteína M2 forma canais iônicos de prótons que atravessam o envelope lipídico. As proteínas de matriz envolvem o core viral, que apresenta a proteína exportadora nuclear (NEP). O complexo ribonucleoproteico (RNP) é formado pelos oito segmentos de RNA sentido negativo encapsulados pelas nucleoproteínas (NP) associados a duas polimerases virais básicas, Polimerase básica 1 e 2 (PB1 e PB2); e uma polimerase viral ácida (PA).

**Fonte:** Adaptado de (VIRAL ZONE, 2014) .

Os genomas dos AIV consistem em oito segmentos de RNA fita simples sentido negativo. Até o momento, o genoma de aproximadamente 13 kb pode codificar até 18 proteínas, Figura 2 (WISE, H. M. et al., 2009; JAGGER et al., 2012; WISE, H. M. et al., 2012; VASIN et al., 2014; YAMAYOSHI et al., 2016). Estes vírus influenza A desenvolveram mecanismos moleculares diferentes para expressão de seus genes, fornecendo a expressão de múltiplas proteínas a partir de um único segmento gênico. Esses mecanismos incluem o *splicing* alternativo de mRNAs virais, bem como a tradução não canônica, ou como *leaky ribosomal scanning* (também conhecida como varredura "frouxa", um alteração da interação entre o mRNA e a subunidade menor do ribossomo, o qual não reconhece o primeiro AUG iniciando a tradução pelo próximo códon AUG), também pode ocorrer a iniciação por códons não AUG, além da reiniciação e até mudança de frame ribossômico (KOMAR; HATZOGLOU, 2005; FIRTH; BRIERLEY, 2012; YEWDELL; INCE, 2012).

Desde de 1970 acreditava-se que oito segmentos genômicos virais codificavam 10 proteínas, sendo 8 estruturais (PB1, PB2, PA, HA, NA, NP, M1 e M2) e duas proteínas não estruturais (NS1 e NS2/NEP) (PALESE; SCHULMAN, 1976; RITCHEY; PALESE; SCHULMAN, 1976; BOUVIER; PALESE, 2008; COUCEIRO; DE ALBUQUERQUE, 2015). Em 2001, foi descoberta uma décima primeira proteína do vírus influenza A, PB1-F2, que foi traduzida de uma fase leitura aberta (ORF) alternativa (CHEN, W. et al., 2001). Desde então, sete proteínas virais adicionais, PB1-N40, PB2-S1, PA-X, PA-N155, PA-N182, M42 e NS3 foram encontradas e/ou redescobertas. Além disso, uma ORF hipotética conhecida como NEG8 já foi prevista por pesquisas em 2007 e 2009. (ZHIRNOV et al., 2007; CLIFFORD; TWIGG; UPTON, 2009; WISE, H. M. et al., 2009; JAGGER et al., 2012; SELMAN et al., 2012; WISE, H. M. et al., 2012; MURAMOTO et al., 2013; YAMAYOSHI et al., 2016).

Os segmentos 4, 5 e 6 do genoma dos vírus influenza A codificam uma única proteína: HA, NP e NA, respectivamente (Figura 2). Enquanto, os segmentos 1, 2, 3, 7 e 8 têm a capacidades de codificação de mais de uma de proteína. Até 2016, acreditava-se que o segmento 1, o maior segmento do genoma viral, produzia unicamente a proteína PB2. Porém, um estudo que avaliou os transcritos dessa proteína PB2, mostrou que os mRNAs do segmento 1 poderiam sofrer um processo de *splicing* em seus transcritos, e estes quando traduzidos gerariam uma nova proteína, a PB2-S1. Os produtos proteicos primários dos segmentos 2 e 3 são as proteínas da polimerase PB1 e PA, respectivamente. Esses genes podem codificar adicionalmente proteínas como a PB1-F2, a PB1-N40 e a PA-N155, a PA-N182, a partir de espécies de mRNA produzidas pelos: mecanismo de *leaky ribosomal scanning*, ou pelo mecanismo terminação-reinicialização da tradução ribossomal. E ainda, o segmento 3 pode produzir uma terceira proteína a PA-X, que é obtida através da tradução de uma segunda fase de leitura aberta ("X-ORF"), que é acessada via uma mudança no frame de leitura ribossômico (CHEN, W. et al., 2001; WISE, H. M. et al., 2009; WISE, H. M. et al., 2011; JAGGER et al., 2012; YAMAYOSHI et al., 2016).

Nos segmentos 7 e 8, a capacidade de codificação de proteínas é expandida pelo mecanismo *splicing* diferencial de mRNA. Para o segmento 8, foram descritas 3 proteínas, produzindo NS2 / NEP e NS3 por mecanismo de *splicing* alternativo, enquanto a NS1 é produzida a partir da transcrição do segmento sem *splicing* (INGLIS; GETHING; BROWN, 1980; LAMB; LAI, 1980; SELMAN et al., 2012). A maioria das proteínas do vírus influenza A são traduzidas a partir de mRNAs de sentido positivo

que são sintetizados, a partir dos RNAs genômicos virais de sentido negativo. No entanto, uma ORF adicional, extraordinariamente longa, no segmento genômico 8 do vírus A / PR / 8/34 humano foi encontrada através de análises biocomputacionais detalhadas dessa ORF. A qual foi denominada NEG8, e o correspondente produto de tradução putativo, foi denominado NSP (BAEZ et al., 1980; ZHIRNOV et al., 2007; CLIFFORD; TWIGG; UPTON, 2009).

Quanto ao segmento 7, observamos que este sofre um processo de *splicing* de seu mRNA mais complexo, pois três transcritos foram descritos ser produzidos pelo processo de *splicing* (designados como mRNAs 2, 3 e 4) desse segmento, além do mRNA 1 o produto sem *splicing* (INGLIS; BROWN, 1981; LAMB; LAI; CHOPPIN, 1981; SHIH et al., 1998). O mRNA 1 dá origem à proteína M1. Os mRNAs que sofrem o processo de *splicing* utilizam de um sítio acceptor de splice (SAcp) comum na região 3', mas usam sítios diferentes de doadores de *splicing* (SD) na região de 5'. Até o momento, apenas o mRNA 2 demonstrou codificar uma proteína: o canal de íon M2 (LAMB; CHOPPIN, 1981).

O mRNA 3 é produzido a partir do SD mais proximal da região 5', sendo proposto como um regulador negativo da expressão de proteínas do segmento 7 durante os períodos precoces da infecção (SHIH; NEMEROFF; KRUG, 1995), uma função não essencial para o crescimento de vírus em um cultivo tecidual (CHIANG; CHEN; SHIH, 2008; JACKSON; LAMB, 2008). Mais recentemente, o mRNA 4 demonstrou ser produzido pela cepa do vírus A / WSN / 33 (WSN) (SHIH et al., 1998; CHIANG; CHEN; SHIH, 2008; ROBB; FODOR, 2012). A qual codifica uma forma variante da proteína M2 com um ectodomínio alternativo, codificado por um mRNA distinto do segmento 7. Esta nova proteína, M42, pode substituir funcionalmente M2 e auxiliar na eficiência da replicação viral nas células do cultivo, como também na patogenia em hospedeiros animais, apesar de mostrar diferenças fenotípicas claras em relação à sua localização intracelular (WISE, H. M. et al., 2012). Outras informações sobre as proteínas que compõem os vírus influenza A podem ser encontradas na Tabela 1.

Segmento Genômico	Proteína	mRNA	Mecanismo		Função
			De Expressão	Comprimento (aa) <sup>a</sup>	
1	PB2 <sup>b</sup>	Segmento 1 mRNA sem splicing.	Tradução AUG1	759	O PB2 é a subunidade da polimerase viral, que interage diretamente com o PA. O PB2 está envolvido no reconhecimento de pré-mRNAs do hospedeiro com cap 5'. Verificou-se que PB2 afeta a variação de hospedeiros, bem como a virulência dos vírus influenza
	PB2-S1 <sup>c</sup>	Segmento 1 mRNA com splicing alternativo MRNA2	-	508	Possui localização nas mitocôndrias e capacidade de inibir a via de sinalização do interferon dependente de RIG-I e interferir na atividade da polimerase viral (dependente da capacidade de ligação ao PB1).
2	PB1 <sup>b</sup>	Segmento 2 mRNA sem splicing	Tradução AUG1	757	PB1 é a subunidade catalítica da RNA polimerase viral dependente de RNA responsável pelo alongamento da cadeia de RNA e necessária para replicação e transcrição. PB1 interage com PB2 e PA.
	PB1-N40 <sup>d</sup>	Segmento 2 mRNA sem splicing	Tradução AUG5 como resultado de um <i>leaky ribosomal scanning</i>	718	PB1-N40 é a forma truncada da região N terminal do PB1. PB1-N40 mantém o equilíbrio entre a expressão PB1 e PB1-F2.
	PB1-F2 <sup>e</sup>	Segmento 2 mRNA sem splicing	Tradução AUG4 em ORF alternativa (relativa +1 ao PB1) como resultado de um <i>leaky ribosomal scanning</i>	90 (pode ser truncado em algumas cepas virais)	PB1-F2 é o fator de virulência. PB1-F2 induz apoptose associada as mitocôndrias, interage com PB1 e influenciando na atividade da polimerase
3	PA <sup>b</sup>	Segmento 3 mRNA sem splicing	Tradução AUG1	716	PA é a subunidade da RNA polimerase viral dependente de RNA. O PA fornece uma atividade de endonuclease de RNA (retirando o cap). O PA interage com o PB1.
	PA-X <sup>f</sup>	Segmento 3 mRNA	Tradução AUG1 e	252	O PA-X modula a resposta do hospedeiro e a virulência do vírus.

		sem splicing	mudança de frame ribossomal +1 nos códons 190-193		
	PA-N155 <sup>a</sup>	Segmento 3 mRNA sem splicing	Tradução AUG11 como resultado de leaky ribossomal scanning	568	?
	PA-N182 <sup>a</sup>	Segmento 3 mRNA sem splicing	Tradução AUG13 como resultado de leaky ribossomal scanning	535	?
<b>4</b>	HA <sup>b</sup>	Segmento 4 mRNA sem splicing	Tradução AUG1	560	O HA é responsável pelo reconhecimento e ligação com receptores (ácido siálico) na membrana das células-alvo.
<b>5</b>	NP <sup>b</sup>	Segmento 5 mRNA sem splicing	Tradução AUG1	498	NP é o principal componente do complexo viral de RNP. NP controla o transporte citoplasmático nuclear de RNA.
<b>6</b>	NA <sup>b</sup>	Segmento 6 mRNA sem splicing	Tradução AUG1	465	O NA cliva o HA de sua interação com ácido siálico dos receptores celulares, para permitir que a progênie escape das células hospedeiras infectadas.
<b>7</b>	M1 <sup>b</sup>	Segmento 7 mRNA sem splicing (mRNA1)	Tradução AUG1	252	M1 é o principal componente da matriz viral; subjacente ao envelope viral, desempenhando diversos papéis na montagem e infecção do vírion.

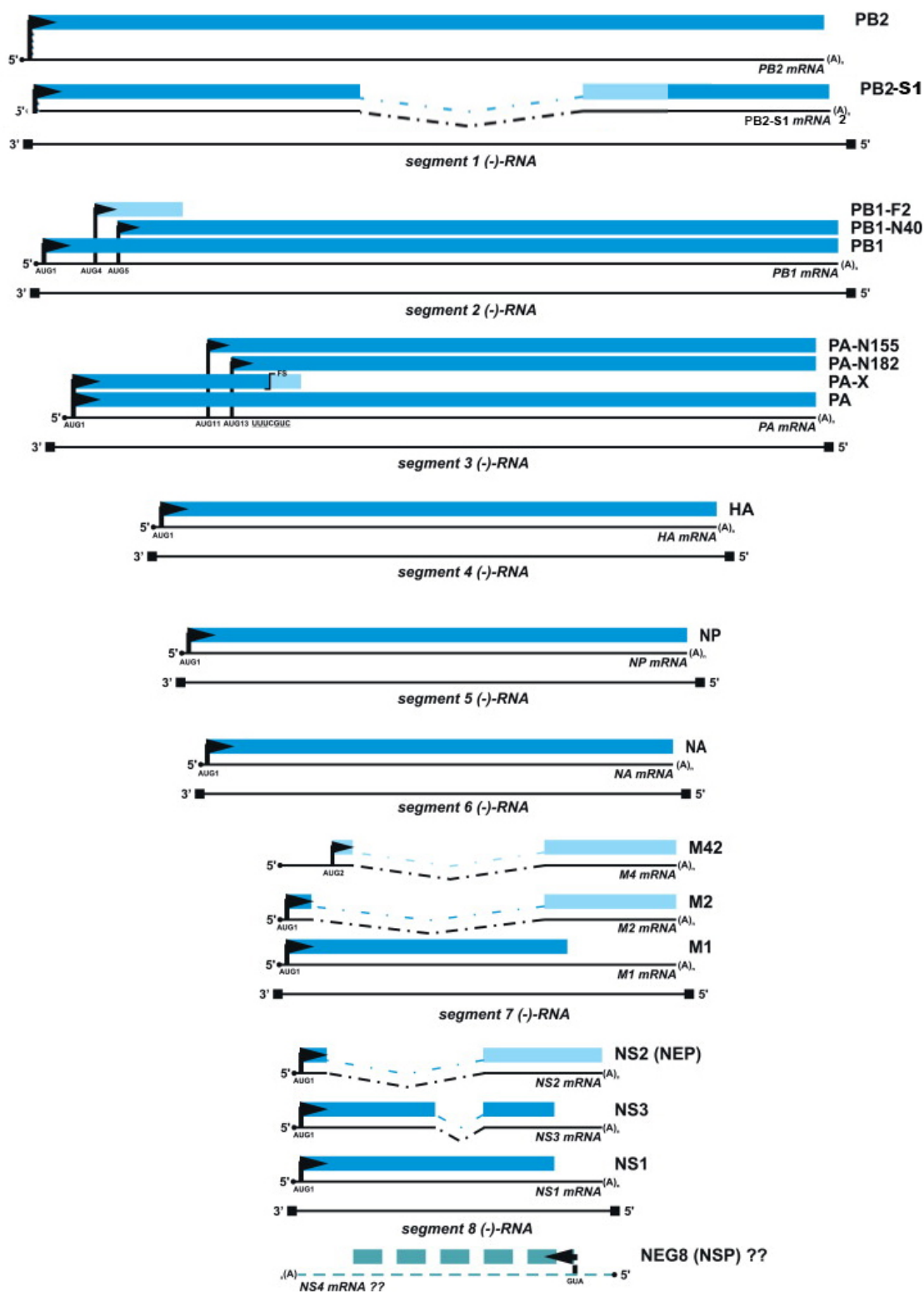
8	M2 <sup>h</sup>	Segmento 7 mRNA com splicing alternativo (mRNA2)	Tradução AUG1	97	M2 é uma proteína de membrana que forma um canal de prótons que é ativado sob condições de baixo pH; importante para a descompactação do genoma durante a entrada do vírus.
	M42 <sup>i</sup>	Segmento 7 mRNA com splicing alternativo (mRNA4)	Tradução AUG1 do mRNA4	99	M42 pode substituir funcionalmente M2, nos vírus onde a M2 foi deletada do genoma.
	NS1 <sup>b</sup>	Segmento 8 mRNA sem splicing (NS1 mRNA)	Tradução AUG1	217	A NS1 é uma proteína multifuncional envolvida em inúmeras interações vírus-hospedeiro, incluindo a fuga dos mecanismos antivirais das células hospedeiras, bem como a regulação da expressão de genes virais e do hospedeiro.
	NS2/NEP <sup>j</sup>	Segmento 8 mRNA com splicing alternativo (NS2 mRNA)	Tradução AUG1	121	NS2 é um componente estrutural da partícula viral que medeia a exportação de RNP virais do núcleo para o citoplasma.
	NS3 <sup>k</sup>	Segmento 8 mRNA com splicing alternativo (NS3 mRNA)	Tradução AUG1	174	O papel do NS3 está potencialmente associado à adaptação do vírus influenza A na mudança de hospedeiros virais, como de aves para mamíferos, incluindo populações humanas, camundongos, suínas e caninas. **



NEG8 (NSP (?) <sup>l</sup>	Segmento 8 mRNA antisenso splicing alternativo (NS4 mRNA, ?)	Tradução ORF antisenso	156 (216 na maioria dos IAV humanos)	?
-------------------------------	--	------------------------------	---	---

Nesta Tabela, revisamos brevemente os mecanismos moleculares usados pelo vírus influenza A para expandir seu proteoma e resumimos os dados disponíveis sobre as possíveis funções das proteínas virais descobertas recentemente. Também avaliamos a presença dessas ORFs no vírus influenza humano A. <sup>a</sup>Previsto para o vírus influenza A / Anhui / 1/2013 (H7N9). Fontes da detecção das proteínas <sup>b</sup> (LAZAROWITZ; COMPANS; CHOPPIN, 1971; SKEHEL, J. J., 1972; WHITE, D. O., 1974; KAWAOKA, 2006), <sup>c</sup>(YAMAYOSHI et al., 2016), <sup>d</sup>(WISE, H. M. et al., 2009), <sup>e</sup>(CHEN, W. et al., 2001), <sup>f</sup>(JAGGER et al., 2012), <sup>g</sup>(MURAMOTO et al., 2013), <sup>h</sup>(LAMB; LAI; CHOPPIN, 1981), <sup>i</sup>(WISE, H. M. et al., 2012), <sup>j</sup>(LAMB; LAI, 1980), <sup>k</sup>(SELMAN et al., 2012), <sup>l</sup>(ZHIRNOV et al., 2007; CLIFFORD; TWIGG; UPTON, 2009) e <sup>\*\*</sup>(CH AISRI; CHAICUMPA, 2018).  
Fonte: Adaptado de (VASIN et al., 2014) .

Figura 2. Modelo da estrutura genômica e proteômica do vírus influenza A



**Legenda:** É mostrada a organização das fases de leitura aberta (ORF) das proteínas codificantes nos transcritos dos mRNAs virais a partir dos diferentes segmentos do genoma do vírus influenza A. Os segmentos do genoma do RNA antisenso (-) são indicados por linhas pretas de extremidade quadrada.

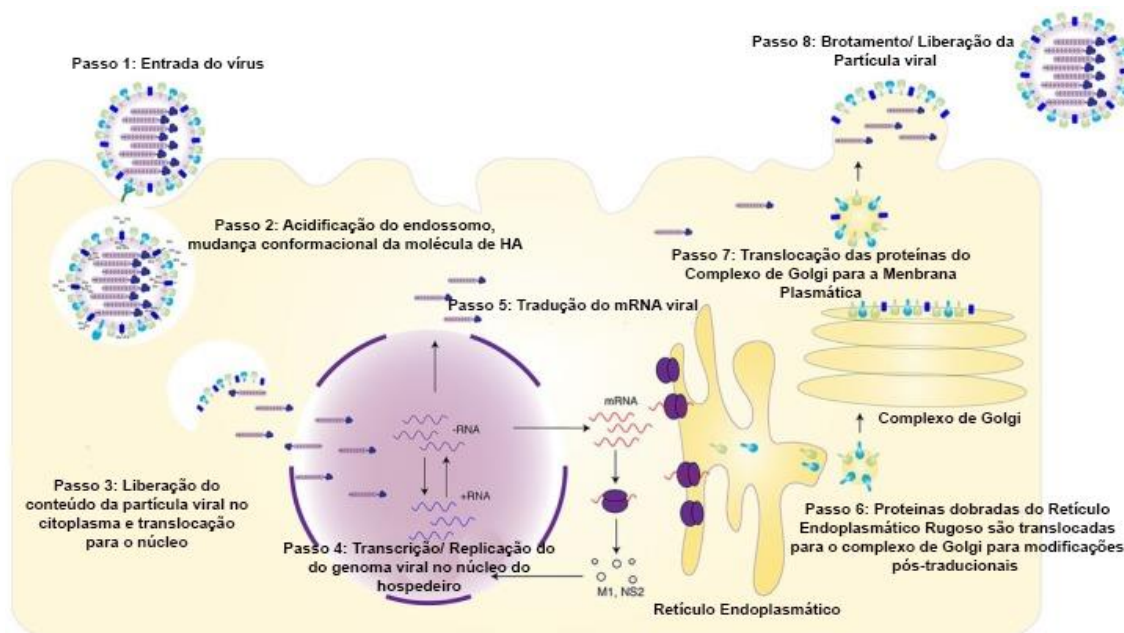
Os mRNAs virais sem e com splicing são mostrados como linhas pretas, onde as estruturas dos cap 5 são mostradas como círculos pretos e as caudas de poli-A são representadas como (A)<sub>n</sub>. As regiões de splicing são mostradas como linhas pontilhadas. As setas pretas indicam o início da síntese de proteínas no códon de iniciação (AUG) de uma ORF. As proteínas são mostradas como retângulos azuis, as ORFs alternativas são mostradas em diferentes tons de azul. FS-evento de mudança na fase de leitura. O mRNA e a proteína hipotéticas NEG8 são mostrados como linhas pontilhadas e de cor verde.

**Fonte:** Adaptado de (VASIN et al., 2014) .

Os vírus Influenza A nas aves podem ser transmitidos por contato ave a ave (contato direto ou aerossóis) ou pelo meio ambiente (aerossóis ou água), com as principais vias de transmissão sendo a fecal-oral ou a fecal-respiratória (HUTCHINSON; FODOR, 2012; NALLAR et al., 2016; VAN DIJK et al., 2018). A eficiência da infecção por Influenza A depende de uma série de fatores do vírus (como patogenicidade, estabilidade ambiental, tropismo de tecidos e interações de ligação a receptores) e do hospedeiro (por exemplo comportamento, migração, reprodução, características que afetam a suscetibilidade à infecção como, idade, condição corporal e imunidade pré-existente) (VAN DIJK et al., 2018).

Contudo, sabe-se que infecções por LPAIV replicam preferencialmente nas células epiteliais do trato intestinal de patos, enquanto em galinhas a replicação ocorre em altos títulos nos pulmões e intestinos. Ao passo que as infecções por HPAIV ocorrem principalmente nas vias aéreas dos anseriformes e têm maior propensão a espalhar-se para outros tecidos e órgãos sistemicamente, como em outras espécies de aves. No entanto, a disseminação e os danos sistêmicos por HPAIV em patos são frequentemente mais limitados do que em galiformes. (WHITTAKER; BUI; HELENIUS, 1996; YOON; WEBBY; WEBSTER, 2014; STALLKNECHT; BROWN, 2017; BODEWES; KUIKEN, 2018; VAN DIJK et al., 2018; EVSEEV; MAGOR, 2019). Após a ligação do vírus a superfície de uma célula alvo, o ciclo de replicação viral dos vírus Influenza A iniciará, neste momento ele explora muitos componentes celulares em um processo complexo e de várias etapas (Figura 3) .

**Figura 3. Representação do ciclo de replicação dos vírus influenza A.**



Legenda: Etapa 1 - Entrada viral na célula hospedeira. Etapa 2 - Endocitose do vírus no endossoma do hospedeiro e acidificação, levando a alterações conformacionais da molécula de HA, expondo o peptídeo de fusão e a fusão da membrana viral a do hospedeiro. A proteína M2 bombeia íons H<sup>+</sup> para o núcleo viral, causando a dissociação de M1 e a liberação de vRNP. Etapa 3 - Liberação do vRNP no citoplasma e translocação para o núcleo. Etapa 4 - os mecanismos de replicação e transcrição de vRNP e captura de cap ocorrem no núcleo. Proteínas virais como M1 e NS2 acompanham o vRNP para fora do núcleo e no citoplasma para serem empacotadas em partículas virais. Etapa 5 - As proteínas estruturais são traduzidas pelos ribossomos hospedeiros e transportadas para o retículo endoplasmático para adquirirem as conformações adequadas. Etapa 6 - As proteínas virais que já estão adequadas são liberadas do retículo endoplasmático e são direcionadas à membrana plasmática ou ao Golgi para modificações antes da liberação. Etapa 7- Movimento de proteínas modificadas da rede de Golgi para a membrana plasmática para brotamento viral. Etapa 8 - Liberação da progênie viral infecciosa.

Fonte: Adaptado de (NUÑEZ; ROSS, 2019)

O processo se inicia quando o vírus se liga às terminações glicanas do ácido siálico (SA) na superfície das células hospedeiras, através do domínio de ligação ao receptor glicoproteico de superfície da HA. A interação entre essas proteínas é um fator determinante e importante na gama de hospedeiros. Que pode ser exemplificado, quando nos vírus da influenza humana ocorre ligação preferencial a um terminal do SA ligado à galactose por uma ligação  $\alpha 2,6$ , enquanto os vírus da gripe aviária ligam-se preferencialmente à ligação SA  $\alpha 2,3$  com a galactose (CONNOR et al., 1994; ITO et al., 1998; SHINYA et al., 2006). Deve-se notar, porém, que esta especificidade viral não é absoluta e que as células aviárias e humanas podem conter, ambas, as ligações (SA  $\alpha 2,3$  e  $2,6$ )(MATROSOVICH et al., 2004). Após a ligação, os vírus podem entrar

nas células por via endocítica mediada por clatrina, ou independente de clatrina e caveolina (LAKADAMYALI; RUST; ZHUANG, 2004; RUST et al., 2004).

Uma vez que partícula viral é internalizada em um endossomo, as proteases do hospedeiro dividem a HA viral (ou HA0) em HA1 e HA2. A clivagem desta proteína é um importante fator de virulência para estes vírus, sendo que a eficiência da clivagem varia de acordo com a presença de um, ou vários resíduos básicos no sítio de clivagem, de HA1 e HA2. (NAYAK; HUI; BARMAN, 2004) Após ocorrer a acidificação do endossomo, que induz uma alteração conformacional na HA que expõe o peptídeo de fusão HA2. O peptídeo de fusão HA2, então insere-se na membrana endossômica que induz a fusão do envelope viral com a do endossomo (SKEHEL, J. et al., 2001). Como o pH dos endossomos varia entre as espécies hospedeiras, a estabilidade ao pH da HA é um importante determinante dos tipos de tecidos aos quais o vírus pode infectar (BULLOUGH et al., 1994).

Após a fusão das duas membranas, os prótons do endossomo entram no vírion através do canal de íon viral M2, que acidifica a partícula do vírus, levando à dissociação da proteína M1 e do complexo vRNP (MARTIN, K.; HELENIUS, 1991; BUI; WHITTAKER; HELENIUS, 1996). A ATPase vacuolar do hospedeiro é importante para a acidificação e fusão entre as membranas do vírus e a endossômica, permitindo que o material genético do vírus ligado na forma das 8 RNPs seja liberado no citoplasma (MARJUKI et al., 2011). Os RNPs são então importados para o núcleo através do complexo de poros nucleares. Este processo é auxiliado pela importina  $\alpha$  e pela ação das proteínas do complexo nuclear dos poros NUP98 e NUP153 (MARTIN, K.; HELENIUS, 1991; SATTERLY et al., 2007; RESA-INFANTE et al., 2008).

No núcleo ocorre a transcrição e replicação do RNA viral, que é catalisada pela ação do complexo da polimerase viral (PB1, PB2 e PA) associado aos RNPs (ENGELHARDT; FODOR, 2006). A replicação do RNA viral ocorre através de um intermediário de sentido positivo conhecido como complexo ribonucleoproteína complementar (cRNP) (RESA-INFANTE et al., 2008). Muitas cópias do RNA viral são transcritas do cRNP, que por sua vez transcrevem para mais cópias dos mRNAs virais (ENGELHARDT; FODOR, 2006).

Durante a transcrição dos mRNAs virais, a qual ocorre por um mecanismo denominado primer-dependente. Os produtos do RNA viral são copiados de maneira incompleta, necessitando da captura de caps do mRNA do hospedeiro, uma etapa

extramamente importante na transcrição do mRNA viral. Neste processo a proteína PB2 se liga à cap 5' de um pré-mRNA do hospedeiro, o que permite a PA viral clivar a região do cap 5' de 10-13nt de comprimento. Este oligonucleotídeo com cap funciona como um primer e é então usado para iniciar a transcrição do RNA viral. Finalmente, o mRNA viral é amadurecido pela adição de uma cauda poli (A) através da atividade catalítica de outra proteína a PB1 (NEUMANN; HUGHES; KAWAOKA, 2000; FODOR; BROWNLEE, 2002; DIAS et al., 2009).

Além disso alguns mRNA virais podem sofrer outros processos de edição, o mRNA viral da proteína M pode sofrer *splicing* o que gera os mRNAs de M1 e M2, assim como o mRNA de NS1 pode gerar NEP e NS3 (NAITO et al., 2007). Esses processos de *splicing* ocorrem através da atividade de fatores de *splicing* do próprio hospedeiro Tat-SF1 e BAT1 (MOMOSE et al., 2001). Além do processo de transcrição para produção de proteínas virais, também ocorre concomitantemente os processos de replicação do material genômico viral, produzido através do cRNP de polaridade positiva, o qual produz o RNA genômico viral de polaridade negativa (ELTON; TILEY; DIGARD, 2002; PORTELA; DIGARD, 2002).

Os mRNAs virais de cadeia positiva, aos quais foram adicionados caps e caudas poliadenelidas são então exportados do núcleo para o citoplasma, onde a tradução é dividida entre ribossomos citosólicos (para PB1, PB2, PA, NP, NS1, NS2 e M1) e ribossomos associados ao retículo endoplasmático para as proteínas de membrana HA, NA e M2. As polimerases virais recém-sintetizadas (PB1, PB2 e PA) e as proteínas virais NP, NS1, NEP e M1 são importadas para dentro do núcleo para aumentar ainda mais a taxa de síntese do RNA viral enquanto as proteínas da membrana (HA, NA e M2) são trafegadas e inseridas na membrana plasmática do hospedeiro (GREENSPAN; PALESE; KRYSTAL, 1988; WEBER et al., 1998). Para auxiliar ainda mais na replicação viral, muitas das proteínas não estruturais virais inibem ativamente a síntese proteica do hospedeiro ou promovem a síntese viral de mRNA para favorecer a tradução dos mRNAs virais. Por exemplo, o NS1 contribui para a exportação de mRNA viral, ligando os transcritos virais aos componentes de exportação nuclear celular e à nucleoporina NUP98 (SATTERLY et al., 2007).

Ao mesmo tempo no núcleo, o RNA viral genômico é amadurecido em complexos de RNP através da associação com o complexo de proteínas formado pelas NP, PA, PB1 e PB2. Esses complexos de RNP são então exportados para fora do núcleo por duas vias diferentes, mediadas pelo fator 1 de exportação de RNA

nuclear (NXF-1) e pela região de manutenção cromossômica-1 (CRM-1) (MA, K.; ROY; WHITTAKER, 2001; HUTTEN; KEHLENBACH, 2007). Acredita-se que o NS1 ajude na exportação dos componentes virais através da via de exportação nuclear NXF-1 (READ; DIGARD, 2010; WATANABE; WATANABE; KAWAOKA, 2010). Além disso, o M1 atua como uma proteína adaptadora, que vincula o NEP aos RNPs. Por meio do qual os NEP interagem com os CRM-1 para guiarem os RNPs à via de exportação nuclear do CRM-1, para assim serem transportados através do citoplasma (AKARSU et al., 2003; SHIMIZU et al., 2011; HUANG, S. et al., 2013).

As proteínas de superfície da partícula viral HA, NA e M2 são sintetizadas por ribossomos associados à membrana do retículo endoplasmático (ER) (BOS; DAVIS; NAYAK, 1984; HULL; GILMORE; LAMB, 1988; DANIELS et al., 2003; DOU et al., 2014). Após a síntese, estas proteínas são oligomerizadas e são enviadas através Complexo de Golgi (CG) para a membrana plasmática. Durante esse processo de tráfego do ER para CG, a proteína HA inativa precursora denominado HA0, obtém sua função de fusão, ao ter o HA clivado nas subunidades HA1 e HA2 (KLENK et al., 1975; HUANG, R. T.; ROTT; KLENK, 1981; MAEDA; KAWASAKI; OHNISHI, 1981). Diferentes proteases clivam o HA, dependendo da cepa do AIV, portanto a capacidade de clivagem do HA é importante para a habilidade de replicação viral e um dos aspectos determinantes para o tropismo tecidual do vírus. Todos os vírus influenza têm um sítio de clivagem reconhecido pelas proteases intracelulares do tipo tripsina presentes nas células respiratórias e epiteliais, exceto os vírus de alta patogenicidade, que contêm um local de clivagem multibásico na HA reconhecido pelas proteases do tipo furina, uma protease ubiquamente expressa nas células de diferentes tecidos (STIENEKE-GRÖBER et al., 1992; BERTRAM et al., 2010).

Nos estágios finais da infecção viral, as proteínas M1 e NEP translocam-se para o núcleo onde se ligam aos RNPs do vírus para mediar sua exportação para o citoplasma. Então, por meio de interações com o endossomos de reciclagem e microtúbulos, eles migram para a membrana plasmática e são empacotados nos 8 RNPs que compõem o genoma viral (SHIMIZU et al., 2011; BRUNOTTE et al., 2014; HUSAIN; CHEUNG, 2014).

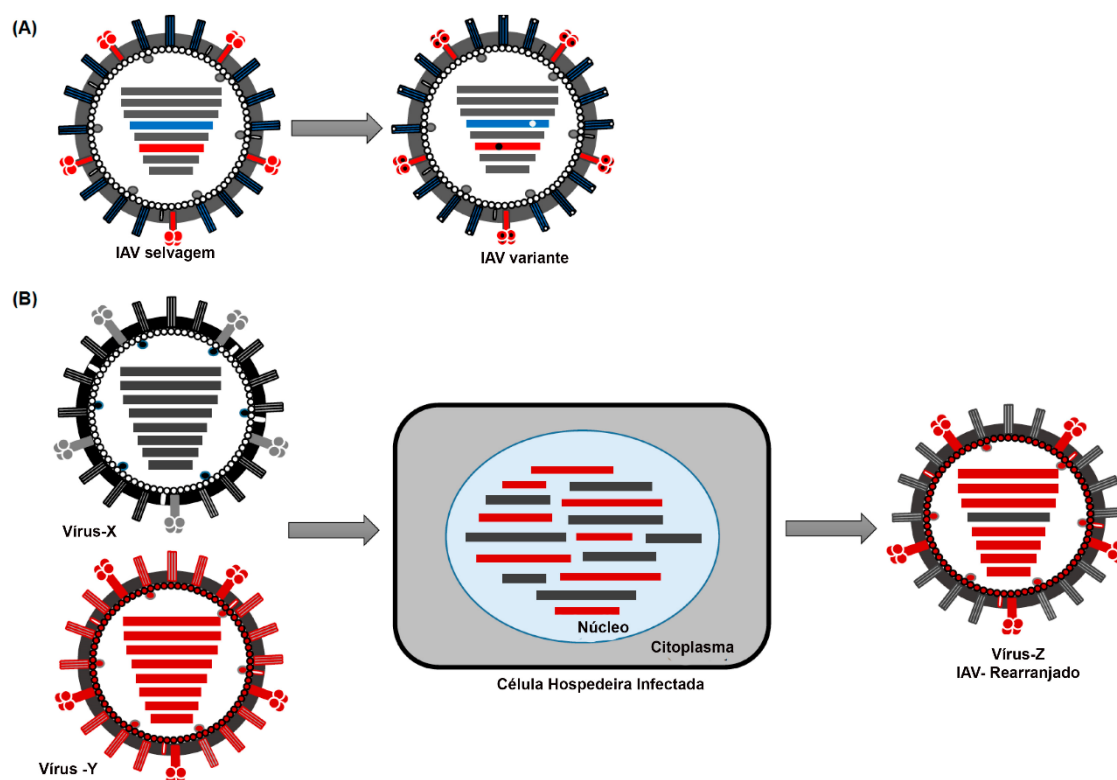
O surgimento de novos vírions ocorre através do agrupamento de HA e NA na membrana plasmática. M1 liga-se às caudas citoplasmáticas de HA e NA e funciona como locais de ancoragem para os RNPs. A polimerização das proteínas M1 faz com que o broto se alongue e, em seguida, a proteína M2 forma uma curvatura positiva na

periferia do broto. A cisão da membrana ocorre através da inserção da hélice anfipática M2 na base do limite da fase lipídica, resultando na liberação do vírion por brotamento (AIR; LAVER, 1989; TAYLOR, 1996). Uma vez liberado o vírion, ele ainda pode estar ligado à membrana celular por meio de interações entre o SA do hospedeiro e o HA associado ao vírion. Neste momento a proteína NA desempenha o papel final na liberação, pois é capaz de clivar o HA ligado aos receptores de SA através de sua atividade de sialidase (TAYLOR, 1996).

Durante a replicação, pode ocorrer a integração de nucleotídeos incorretos na taxa de  $10^{-3}$  a  $10^{-4}$ , o que permite uma rápida taxa de mutação do genoma viral devido a RNA-polimerase viral não possuir nenhum mecanismo de revisão (AHLQUIST, 2002; CHEN, R.; HOLMES, 2006). O efeito dessa taxa de mutação é mais rapidamente sentido nas duas proteínas de superfície dos vírus influenza A, especialmente o HA. Que atua no reconhecimento dos receptores ligação SA, nesse sentido o HA é o principal determinante na faixa de hospedeiros do vírus influenza A (CASTRUCCI et al., 1993; MA, W.; KAHN; RICHT, 2009; MENA et al., 2016). Estas mutações culminam em dois mecanismos principais que conduzem a mudanças evolutivas nos vírus, que incluem a mutação antigênica (*drift*) e o rearranjo antigênico (*shift*), Figura 4 (MOSTAFA et al., 2018).



**Figura 4. Mecanismos de evolução do AIV.**



**Legenda:** (A) Deriva antigênica (*drift*): O acúmulo gradual de mutações no genoma dos vírus influenza A levando ao surgimento de novas variantes de vírus. Mutações no HA (azul) e NA (vermelho) podem afetar os epítomos antigênicos, levando a novas variantes antigênicas. (B) Rearranjo antigênica (*shift*): A troca/ reagrupamento de segmentos genéticos entre dois ou mais vírus invasores em uma célula hospedeira podendo levar ao surgimento de novos subtipos distintos (antigênicamente).  
 Fonte: Adaptado de (MOSTAFA et al., 2018).

A *drift* é um mecanismo evolutivo dos vírus influenza A que ocorre devido ao acúmulo gradual de mutações nos principais sítios antigênicos. Essa variação dos antígenos resulta na produção dos novos subtipos de influenza que escapam à pressão imunológica da população, Figura 4A (CARRAT; FLAHAULT, 2007). Enquanto o *shift*, se aproveita da segmentação genômica do vírus influenza que permitem a troca de segmentos de RNA entre os vírus da Figura 4B. Esse rearranjo do genoma viral permite a produção de cepas e subtipos de vírus influenza A inteiramente novos que têm o potencial de se transformar em até cepas pandêmicas (REID; TAUBENBERGER, 2003; NELSON; HOLMES, 2007).

Para se defender da infecção viral, os hospedeiros possuem diferentes linhas de defesa. Sendo a primeira delas impedir a entrada do vírus na célula, as barreiras

físicas, como por exemplo a camada de mucina e ação ciliar no trato respiratório superior que impedem o contato do vírus com células suscetíveis (PALESE, 2007). Uma vez que um vírus seja capaz de entrar na célula hospedeira, uma série de respostas complexas são estimuladas pelas respostas imunes inatas e adaptativas. A resposta inata é rápida e funciona principalmente para impedir a replicação do vírus. As células infectadas induzem a produção de quimiocinas e citocinas, que atraem células imunes, incluindo macrófagos, neutrófilos e células natural killer (NK) (JULKUNEN et al., 2000). Nessa situação a ativação dos IFNs do tipo I é essencial para ativação das respostas imunes antivirais inatas as quais conheceremos melhor nos próximos tópicos dessa revisão.

### 2.3 Sistema imune

A palavra imunidade é de origem latina advindo de “*immunitas*”, que é relativa ao conceito empregado pelos senadores romanos que utilizavam de proteções legais durante os períodos de mandato. Já o conceito biológico de imunidade se refere à capacidade dos organismos de reconhecerem corpos e moléculas estranhas e responderem a estas de modo a manter a homeostasia do organismo (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012).

Apesar de aves e mamíferos terem evoluído de um ancestral em comum há mais de 200 milhões de anos e herdarem muitos sistemas imunológicos comuns. Estas espécies também desenvolveram várias estratégias muito diferentes e, em alguns casos notáveis (DAVISON, 2014). Os sistemas imune aviários fornece um modelo excelente para estudos de imunologia básica. Devido à sua importância econômica e à disponibilidade imediata de linhagens, a maioria das pesquisas em imunologia aviária desenvolveu-se em galinhas domésticas, *Gallus gallus domesticus* (BROWNLIE; ALLAN, 2011; DAVISON, 2014; TIZARD, 2018) embora patos (BARBER et al., 2010; EVSEEV; MAGOR, 2019) e mandarins também tenham sido estudados (EWENSON; ZANN; FLANNERY, 2001; BERTRAND et al., 2006; HELLGREN; EKBLUM, 2010).

O sistema imune de aves é desenvolvido durante o período embrionário. As células de origem epiteliais (bursa de Fabricius- BF- e timo) e mesenquimais (baço, linfonodos, medula óssea) são as responsáveis pela formação dos tecidos linfomielóides nos embriões de aves. Estas regiões são colonizadas por células

hematopoiéticas imaturas que migram do saco embrionário para a corrente sanguínea e deste para o baço, onde irão formar os glóbulos vermelhos e brancos. A partir disto, colonizam os órgãos primários (bursa e timo) por meio de fatores quimiotáticos que atraem as células e permitem a colonização destes órgãos por volta do sexto dia de incubação para o timo, e por volta do décimo dia de incubação para a bursa (MOORE; OWEN, 1965; 1967; OLÁH; NAGY; VERVELDE, 2014) até a terceira semana após a eclosão quando ocorre a maturação dos órgãos primários e secundários (JUUL-MADSEN, HELLE R et al., 2008).

Assim, se pode definir a estrutura do sistema imune das aves segundo o desenvolvimento em dois: (i) **sistema linfóide primário** (BF e Timo) e (ii) **sistema linfóide secundário** (baço e tecidos linfóides associados a mucosas: glândula de Harder, intestino, brônquios, placas de Peyer, divertículo de Meckel, tonsilas cecais e glândula pineal). Estes tecidos linfóides associados às mucosas, ao contrário dos mamíferos, não são distribuídos como linfonodos encapsulados e sim dispersos pelos diferentes tecidos do corpo (OLÁH; NAGY, 2013; OLÁH; NAGY; VERVELDE, 2014).

As células são então conduzidas para a BF, um órgão único das aves, e para o timo e nestes órgãos ocorre o desenvolvimento da sua eficiência imunológica. Devido a isto, as células B e T possuem origem extrínseca a estes dois órgãos (JUUL-MADSEN, HELLE R et al., 2008; OLÁH; NAGY; VERVELDE, 2014) que apresentam componentes de morfologia e função distintas (AKTER et al., 2006).

O repertório de receptores e anticorpos dos linfócitos B em aves é mais limitado do que em mamíferos. Aves possuem apenas uma cópia funcional dos genes dos segmentos V e J para as cadeias leve e pesada e esses segmentos são produzidos por um mecanismo chamado gene conversão em vez da via de rearranjo genético (KAISER, 2012). Portanto, a diversidade ocorre devido à união dos V e J de cadeia leve ( $V_L$  e  $J_L$ ) que é muito limitada e os efeitos do rearranjo desses genes são mínimos. Da mesma forma, com os loci das imunoglobulina (Ig) de cadeia pesada dos genes V e J ( $V_H$  e  $J_H$ ) funcionais são únicos, o que significa que pouca diversidade pode ser gerada através do rearranjo desses genes. No entanto, aglomerados de pseudogenes, anteriores aos locais da Ig das cadeias pesada e leve, têm um papel crítico na geração da diversidade de anticorpos de galinha. Por um processo conhecido como conversão genética somática, as sequências do gene  $V_L$  e  $V_H$  são substituídas por sequências pseudogênicas. Uma enorme quantidade de diversidade é gerada pela diversidade substancial contida nas regiões hipervariáveis dos

pseudogenes V doadores, e os eventos somáticos de conversão de genes se acumulam nos únicos genes funcionais  $V_L$  e  $V_H$  (REYNAUD, CLAUDE-AGNES et al., 1985; DAVISON, 2014; FELLAH et al., 2014)

Talvez as galinhas representem a situação extrema com apenas um gene  $V_L$  funcional, enquanto outras espécies como o pato têm até quatro genes funcionais de  $V_L$ , embora estes últimos ainda usem da conversão genética para introduzir uma maior variabilidade. Parece que as aves são dependentes da conversão genética somática para gerar seu repertório de anticorpos, o que gera uma resposta imune semelhante as dos mamíferos imunocompetentes (FELLAH et al., 2014). Curiosamente, recentemente foi demonstrado que ocorre a hipermutação somática se a conversão gênica for bloqueada nas células B de frango (REYNAUD, CLAUDE-AGNÈS et al., 1989). Também tem sido observado que a conversão genética não se limita apenas às aves, mas também ocorre em coelhos, porcos e outras espécies de mamíferos, embora nenhum pareça confiar nele como o meio exclusivo para gerar o repertório de anticorpos (KNIGHT, 1992).

Outra diferença genética se refere à região do genoma que codifica o complexo principal de histocompatibilidade (MHC), altamente polimórfico em mamíferos e mínimo em aves que contém apenas dois genes de classe I e dois de classe II. Outra particularidade do sistema imune das aves são as células brancas denominadas heterófilos que correspondem funcionalmente aos neutrófilos dos mamíferos, apresentando núcleo segmentado em dois a três lóbulos, com heterocromatina formando massa densa e com seus grânulos citoplasmáticos específicos elípticos e esféricos de coloração acidófila. Contudo, ao contrário dos neutrófilos, estes grânulos não apresentam mieloperoxidase, enzima que catalisa a reação entre peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e íons cloreto para formar o hipoclorito, um bactericida. Heterófilos também não produzem espécies reativas de oxigênio em quantidade suficiente para a atividade bactericida, apesar de eliminarem bactérias patogênicas de forma eficiente, indicando a existência de mecanismos não oxidativos, mais essencial para esta função (KAISER, 2010; GENOVESE et al., 2013).

Os heterófilos são as primeiras células a migrarem para o sítio inflamatório. Além de realizarem fagocitose, também produzem citocinas pró-inflamatórias, tais como as interleucinas 1 beta ( $IL-1\beta$ ), 6 ( $IL-6$ ) e 8 ( $IL-8$ ). Assim, essas células são importantes mediadores da imunidade inata, especialmente em aves jovens, que ainda não desenvolveram a imunidade adquirida (KHAMPEERATHUCH et al., 2018).

Os trombócitos de aves também desempenham um papel na resposta imune inata desses animais. Apesar de funcionalmente semelhantes às plaquetas dos mamíferos, os trombócitos das aves possuem núcleo. Além da função hemostática, participando na cascata de coagulação, estas células possuem uma atividade fagocítica semelhante à dos heterófilos. A ampla distribuição dessas células pelo organismo, bem como seu papel na fagocitose de partículas estranhas, faz desse tipo de resposta muito importante frente à resistência às infecções (RIES et al., 1984; ERF, 2004; FELLAH et al., 2014).

O sistema imunológico aviário possui várias características únicas: a) carece de linfonodos e os antígenos são apresentados no local da infecção, provavelmente como agregados linfóides; b) faltam os eosinófilos funcionais e muitos componentes da resposta das células Th2 de mamífero está ausente, c) apenas imunoglobulinas IgA, IgM e IgY (o equivalente funcional de IgG de mamífero) estão presentes, d) neutrófilos são substituídos por heterófilos e e) não existem leucócitos residenciais nas cavidades corporais (MARKOWSKA; MAJEWSKI; SKWARŁO-SOŃTA, 2017).

Após a disponibilização da sequência do genoma de galinha (CONSORTIUM, I. C. G. S., 2004), dados sobre diferenças no repertório de quimiocinas sintetizadas, citocinas e seus receptores, bem como os receptores de reconhecimento de padrões, começaram a ser publicados. Parece haver uma tendência que os mensageiros imunológicos tenham menos representantes no genoma da galinha do que nas mesmas famílias de genes imunes nos mamíferos, com algumas exceções. Devido a essa observação, foi proposto que as aves (especificamente galinhas) tenham “o essencial mínimo de citocina e repertório de quimiocinas”, assim reforçando a ideia proposta de redundância de citocinas em mamíferos (KAISER, 2012; MARKOWSKA; MAJEWSKI; SKWARŁO-SOŃTA, 2017). Destacando a importância dos esforços para continuarmos a investigar esses dois grupos animais.

Como em mamíferos, o sistema imunológico das aves pode ser subdividido em resposta imune inata e adaptativa, que estão sob o controle de vários mecanismos regulatórios. As respostas imunes inata e adaptativa são componentes de um sistema integrado de defesa do hospedeiro no qual numerosas células e moléculas funcionam cooperativamente (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012).

A imunidade adaptativa (também denominada imunidade adquirida ou específica), reconhece e reage a muitas substâncias microbianas e não microbianas. As características que definem a imunidade adaptativa são a habilidade de distinguir

entre diferentes substâncias, chamada especificidade, e a habilidade de responder mais vigorosamente as exposições repetidas ao mesmo microrganismo, conhecida como memória. Os componentes exclusivos da imunidade adaptativa são células denominadas linfócitos e seus produtos secretados, tais como anticorpos. Substâncias estranhas que induzem as respostas imunes específicas ou são reconhecidas pelos linfócitos ou anticorpos denominam-se antígenos(ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012).

A imunidade inata (também denominada imunidade natural ou nativa) fornece a primeira linha de defesa contra microrganismos. Ela consiste em mecanismos de defesa celulares e bioquímicos que estão em vigor mesmo antes da infecção e são preparados para responder rapidamente a infecções. Esses mecanismos reagem aos produtos dos microrganismos e células lesionadas, e elas respondem essencialmente da mesma forma para exposições repetidas. Os mecanismos da imunidade inata são específicos para estruturas que são comuns a grupos de microrganismos relacionados e podem não distinguir pequenas diferenças entre os microrganismos. Os principais componentes da imunidade inata são: (1) barreiras físicas e químicas, tais como epitélio e agentes antimicrobianos produzidos nas superfícies epiteliais; (2) células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos), células dendríticas e células NK e outras células linfoides; e (3) proteínas sanguíneas, incluindo membros do sistema complemento e outros mediadores da inflamação(ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012; JUUL-MADSEN, HELLE R. et al., 2014).

Os dois principais tipos de respostas da resposta imune inata que protegem o organismo contra microrganismos invasores são a **defesa inflamatória** e a **antiviral**. A inflamação é o processo pelo qual leucócitos circulantes e proteínas plasmáticas são trazidos para os locais de infecção nos tecidos e são ativados para destruir e eliminar os agentes agressores. A inflamação também é a principal reação às células danificadas ou mortas e aos acúmulos de substâncias anormais nas células e nos tecidos. Enquanto a defesa antiviral consiste em alterações nas células que previnem a replicação viral e aumentam a suscetibilidade à morte pelos linfócitos, eliminando, assim, os reservatórios de infecção viral. No próximo tópico entenderemos um pouco mais da resposta imune inata e da ativação da resposta antiviral (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012).

#### 2.4 Imunidade Inata e Resposta Antiviral

O sistema imunológico inato é a primeira linha de defesa contra invasão por patógenos (KAWAI; AKIRA, 2010). A indução da via de sinalização da imunidade inata é uma estratégia de defesa primária que as células hospedeiras usam para restringir infecções. A principal via pela qual a resposta imune inata lida com as infecções virais é a indução da expressão de interferons (IFN) tipo I, cuja ação mais importante é a inibição da replicação viral (Figura 5) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012).

O termo interferon deriva exatamente da habilidade destas citocinas em interferir na infecção viral, essa grande família dos IFN tipo I medeiam as respostas imunes inatas iniciais às infecções virais (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012). Atualmente os interferons são divididos em três subfamílias IFN Tipo I, II e III. A subfamília de IFN tipo I compreende numerosos membros em mamíferos ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\omega$ ,  $\kappa$ , e  $\tau$ ), mas apenas dois foram identificados em aves interferon alfa e beta (IFN $\alpha$  e IFN $\beta$ ) estes compartilham 57% de homologia e seus genes estão presentes no cromossomo sexual Z. Enquanto IFN $\alpha$  inclui diversas proteínas diferentes, mas intimamente relacionadas, o IFN $\beta$ , é composto por uma única proteína. (SICK; SCHULTZ; STAEHELI, 1996; BRANTIS-DE-CARVALHO et al., 2012; SANTHAKUMAR et al., 2017).

O IFN do Tipo II compreende o interferon gama (IFN $\gamma$ ) sendo este o único membro tanto em aves como em mamíferos. IFN $\gamma$  serve como uma ponte entre a imunidade inata e adaptativa, desempenhando um papel crucial na regulação do processo de maturação e diferenciação de várias células imunes e ativando as respostas imunes do tipo T auxiliar 1 (FENSTERL; SEN, 2009). O IFN do tipo III em aves parece ser conservado em comparação com o de mamíferos, provavelmente desempenhando um papel predominante na defesa antiviral de barreiras epiteliais (ZHANG, ZHIJIE et al., 2015). Estes apresentam pelo menos quatro genes de IFN lambda (IFN $\lambda$ 1, IFN $\lambda$ 2, IFN $\lambda$ 3 e IFN $\lambda$ 4) em humanos (O'BRIEN; PROKUNINA-OLSSON; DONNELLY, 2014), porém, apenas uma cópia de IFN $\lambda$  funcional foi identificada em galinhas (KAISER et al., 2005; KARPALA et al., 2008). Sendo a IFN $\lambda$  de galinha mais semelhante IFN $\lambda$ 3 humano (REUTER et al., 2014).

Nossa compreensão das vias IFN aviária está aumentando gradualmente e recentemente várias contribuições significativas foram feitas para caracterizar genes existentes (SARMENTO et al., 2008; GOOSSENS et al., 2014; GOOSSENS et al., 2015). Sabe-se resumidamente que respostas antivirais de frango dependem dos

padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) que são reconhecidos pelos PRRs (receptores de reconhecimento de padrões). No caso do RNA de dupla fita (dsRNA) advindo de vírus, este é detectado por receptores como: *Melanoma Differentiation-associated Gene 5* (MDA5) ou *Laboratory of Genetics and Physiology 2* (LGP2), os quais acionam a sinalização mediada pela proteína de sinalização antiviral mitocondrial (MAVS). Já os receptores endossômicos *Toll-like* (TLRs), TLR3, TLR7 e TLR21 podem reconhecer dsRNA, ssRNA e oligodesoxinucleotídeos de citosina-guanosina (CpG ODNs), respectivamente (CHEN, S.; CHENG; WANG, 2013; BARJESTEH et al., 2019; BARJESTEH; O'DOWD; VAHEDI, 2020).

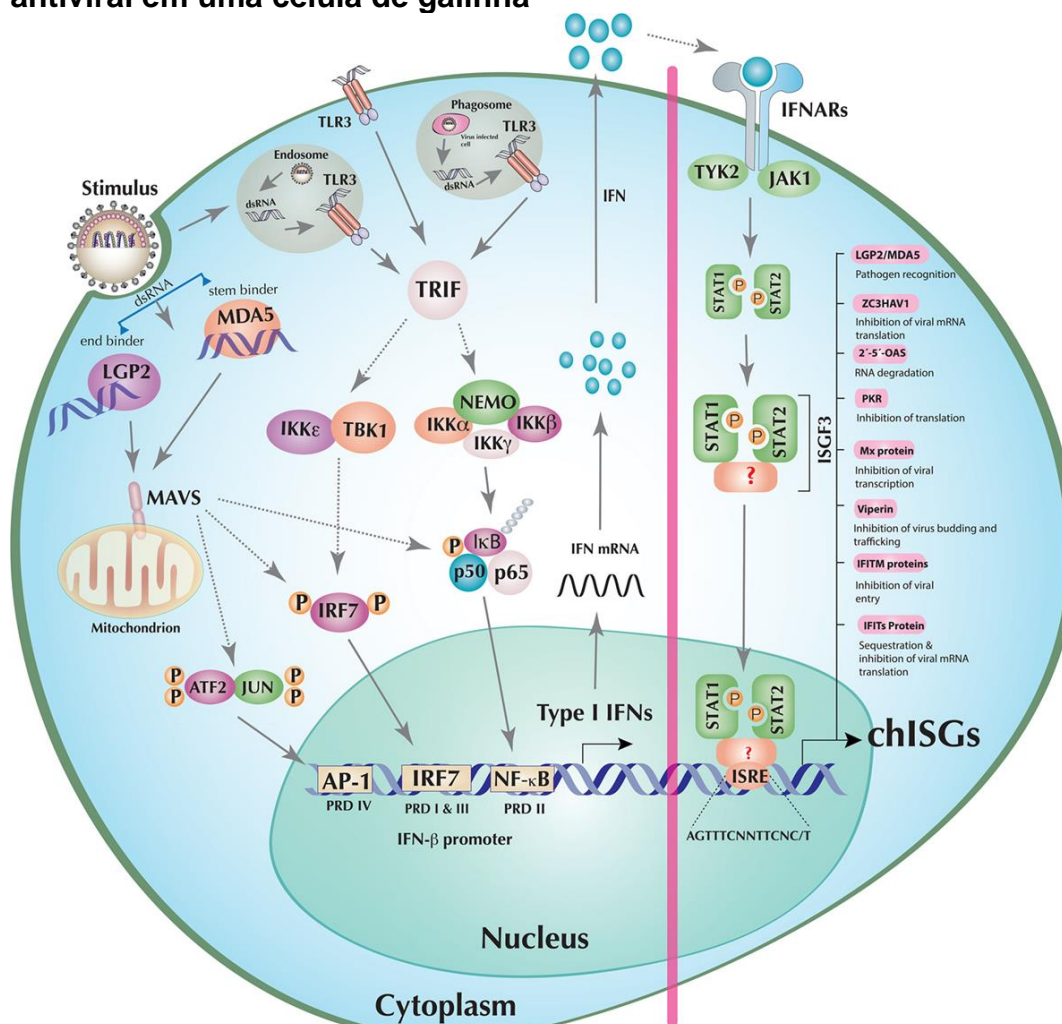
Os sinais do TLR3 são enviados através da proteína adaptadora *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon* (TRIF), enquanto os TLR 7 e TLR21 sinalizam através da *myeloid differentiation primary response 88* (MyD88). O TLR2 e TLR4 de superfície também sinalizam através do MyD88. No entanto, quando estão presentes no fagossomo, o TLR4 sinaliza através da proteína adaptadora TRIF e TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*) (PEROVAL et al., 2013; JANG et al., 2015; BARJESTEH; O'DOWD; VAHEDI, 2020). Essas moléculas adaptadoras ativam os fatores de transcrição: fator regulador de interferon (IRF) 7 e fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B), coordenando a montagem de um complexo de diversas proteínas. As quais após a ativação, do IRF7 e/ou NF- $\kappa$ B induzem a transcrição IFN tipo I (SANTHAKUMAR et al., 2017; BARJESTEH; O'DOWD; VAHEDI, 2020).

IFN $\beta$  e IFN $\alpha$  podem agir de forma parácrina ou autocrina, se ligando ao receptor de IFN do tipo I (IFNAR1) através da ativação da via JAK-STAT, enviando um sinal para o núcleo celular o que leva à fosforilação de STAT1 e STAT2 (*signal transducer and activator of transcription 1 and 2*). Estas proteínas são fatores de transcrição citoplasmáticos latentes que ao serem fosforiladas pelas enzimas JAK-1 (*Janus kinase 1*) e TYK-2 (*tyrosine kinase 2*), da família Janus quinase (JAK). Juntam-se a um terceiro fator desconhecido, que é recrutado pela STAT1 e STAT2 fosforiladas formando um complexo conhecido como ISGF3 (*type I IFN-stimulated gene factor 3*). Este último, se transloca até o núcleo e se liga ao ISRE (*interferon-sensitive response element*) na região promotora de ISGs (*interferon-stimulated genes*), promovendo a expressão de genes importantes para a resposta imune inata aos vírus (JUUL-MADSEN, HELLE R. et al., 2014; SANTHAKUMAR et al., 2017; SANTHAKUMAR et al., 2018). Agora que possuímos uma visão geral da resposta da antiviral pela via do



IFN (Figura 5), no restante deste texto iremos entender alguns detalhes da resposta antiviral de galinhas.

**Figura 5. Modelo de Indução de IFNs e estabelecimento de um estado antiviral em uma célula de galinha**



**Legenda:** O dsRNA, detectado, individualmente ou em cooperação, pelos receptores *melanoma differentiation-associated gene 5* (MDA5) e *laboratory of genetics and physiology 2* (LGP2), ou *Toll-like receptor 3* (TLR3) inicia a sinalização mediada pela proteína de sinalização *mitochondrial antiviral-signaling protein* (MAVS) ou TIR-domain-containing adapter-inducing IFN $\beta$  (TRIF), respectivamente. Essas moléculas adaptadoras ativam os fatores de transcrição, IFN regulatory fator 7 (IRF7), *nuclear factor kappa B* (NF- $\kappa$ B) e *activating protein 1* (AP-1). Uma vez ativados, esses fatores se translocam para o núcleo, onde estimulam a transcrição de IFN de tipo I (por exemplo, IFN $\beta$ ), entre outros fatores. Os IFNs de tipo I transcritos, traduzidos e secretados iniciam a via *Janus kinase- signal transducer and activator of transcription* (JAK-STAT) tanto por sinalização autócrina, quanto parácrina através do receptor de reconhecimento de IFN tipo I. JAK-STAT ativado leva à fosforilação das moléculas STAT1 e STAT2 que, juntamente com alguns fatores desconhecidos em galinhas

(funcionalmente semelhantes à IRF9 de mamíferos), resultam na formação do ISGF3 (*IFN-stimulated gene factor 3*). Este fator de transcrição multifuncional examina e reconhece sequências únicas ISREs (*IFN-stimulated response elemento*) para iniciar a transcrição de centenas ISGs que irão estabelecer o estado antiviral contra os vírus invasores. Outras abreviaturas utilizadas na figura : *IκB kinase* (IKK) *epsilon* (IKKε), *alpha* (IKKα), *beta* (IKKβ), and *gamma* (IKKγ); *NF-κB essential modulator* (NEMO); *TANK-binding kinase 1* (TBK1); inhibitors of *NF-κB* (IκB), *NF-κB subunits p50 and p65*; *activating transcription factor 2* (ATF2); *tyrosine kinase 2* (TYK2); *Janus kinase 1* (JAK1); *signal transducer and activator of transcription 1* (STAT1), and STAT2. “P” representa o estado fosforilado da proteína e as linhas pontilhadas indicam o envolvimento de múltiplos passos intermediários.

**Fonte:** Adaptado de (SANTHAKUMAR et al., 2017)

Na maior parte dos animais, o sistema imunológico inato é ativado pela presença de componentes estranhos ao organismo hospedeiro, que podem ser determinados como PAMPS. Os receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) são receptores codificados por linha germinativa que detectam as PAMPs compartilhados entre muitos microorganismos. A lista atual de PRRs e suas funções é extensa, com novos receptores e funções destes sendo desvendados periodicamente, os PRRs são notavelmente classificados em quatro famílias: receptores Toll-like (TLRs), receptores do tipo *nucleotide oligomerization domain* (NOD) receptores tipo (NLRs), receptores *C-type lectin* (CLRs) e (RLRs) receptores tipo *retinoic acid-inducible gene 1* (RIG-I) (RLRs) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2012; NEERUKONDA; KATNENI, 2020).

As células hospedeiras ao reconhecerem os PAMPS através dos diversos PRRs localizados no citoplasma ou no compartimento endossômico ativam moléculas posteriores na via de sinalização, como Fator de Resposta ao Interferon (IRF) 3 e IRF7, que induzem a **transcrição e secreção de genes do IFN (Interferon)**. Essas moléculas são divididas em 3 grupos principais:

- 1) **Receptores do tipo RIG -I (RLRs):** Sensores citosólicos primários para RNA estranhos- Retinoic-acid Inducible Gene I (RIG-I), MDA 5 and LGP2.
- 2) **Receptores Toll-like (TLR):** sensores endossômicos para RNA de fita dupla e única -TLR-3, TLR-7/8 e TLR-9 que liga o DNA CpG não metilado.

3) **Sensores de DNA:** Absent in Melanoma 2 (AIM 2) and Cyclic GMP-AMP synthetase (cGAS) (SANTHAKUMAR et al., 2017) .

As respostas imunes das aves são semelhantes às dos mamíferos. Embora suas células possuam vias semelhantes para a ativação de interferons e ISGs, alguns componentes essenciais estão ausentes nas células da galinha como o gene RIG-I, IRF 3 e IRF 9. Por outro lado, as aves têm moléculas adicionais em suas vias, incluindo componentes únicos em seu sistema imunológico como TLR15 (BROWNLIE; ALLAN, 2011). Até agora, dez TLR aviários foram confirmados, dos quais cinco têm ortólogos claros aos encontrados em mamíferos, humanos e camundongos (YILMAZ et al., 2005; BOYD; PHILBIN; SMITH, 2007; TEMPERLEY et al., 2008).

O chTLR15 (TLR15 de galinha) foi identificado pela primeira vez como sendo positivamente expresso, juntamente com chTLR2 no ceco de galinhas após infecção por *Salmonella* (HIGGS et al., 2006). Além disso, o chTLR15 foi regulado positivamente em fibroblastos embrionários de frangos após a incubação com *Salmonella*. Outro estudo relatou que o chTLR15 é regulado positivamente em heterófilos por bactérias Gram-negativas ou Gram-positivas, mas não por nenhum dos agonistas conhecidos do TLR (NERREN et al., 2010). Curiosamente, os heterófilos isolados de frangos de corte com uma resistência relativa à infecção por *Salmonella*, *Enterococcus* e *Campylobacter* demonstraram significativamente uma maior regulação positiva do chTLR15 após a estimulação com *Salmonella* viva, quando comparados com heterófilos isolados de uma linhagem de galinhas suscetíveis as infecções ditas acima (NERREN et al., 2009), sugerindo que o chTLR15 pode desempenhar um papel fundamental na proteção contra infecções bacterianas. A expressão de chTLR15 foi demonstrada em tecidos linfóides e não linfóides e é reduzida em neonatos e embriões (HIGGS et al., 2006; BROWNLIE et al., 2009; MEADE et al., 2009).

O RIG-I detecta ligantes de RNA derivados de transcritos virais com ausência da região cap e inicia a resposta do IFN. Em 2010, Barber e colaboradores foram capazes de detectar que o RIG-I está presente nos patos, mas aparentemente ausente nas galinhas *Red Jungle Fowl* (BARBER et al., 2010). A análise filogenética dos receptores do tipo RIG-I, identificou a ausência de sequências genéticas do gene deste receptor no material genético de galinhas (ZOU et al., 2009). Um BLAST nos 4 Mb adjacentes da região sintênica do cromossomo Z de galinha revelou a ausência

da correspondência de um gene RIG-I em galinhas, mas identificou a **aconitinase I**, gene adjacente ao RIG-I em mamíferos. Contudo, foi identificado um homólogo de RIG-I no cromossomo Z ladeado pela aconitinase I no esboço genômico do pato mandarim (*Taeniopygia guttata*). Esses dados sugerem que as galinhas podem ter perdido o RIG-I antes de terem sido domesticadas (BARBER et al., 2010).

Embora as galinhas não expressem moléculas de RIG-I naturalmente, foi observada a formação de uma resposta antiviral com produção de IFN contra a infecção com vírus da influenza nestas aves, de fato IFN foram descobertos pela primeira vez em células de galinhas tratadas com AIV inativados por calor (ISAACS; LINDENMANN; VALENTINE, 2015). Porém, a infecção em fibroblastos primários de embriões de galinha com AIV H5N1 induz a uma baixa expressão do gene Mx1 e IFN $\alpha$ , enquanto o IFN $\beta$  não foi significativamente induzido (SARMENTO et al., 2008). Um efeito semelhante à infecção por influenza, ocorre em infecção com vírus da doença de Newcastle, também detectado pelo RIG-I, o qual causa substancialmente mais patologias em galinhas do que em patos (SICK et al., 1998).

Células de galinhas DF-1 transfectadas com RIG-I ectópico de pato e infectadas com vírus influenza LPAI-H5N2 (A/mallard/British Columbia/500/2005 (BC500)) e HPAI-H5N1 (A/Vietnam/1203/04 (VN1203)), apresentaram após 15h de infecção um aumento na expressão de IFN $\beta$ , bem como dos genes antivirais estimulados por IFN, além de uma redução significativa no título viral para ambas as cepas infectadas. Estes dados sugerem que a via sinalização do RIG-I permanece conservada em galinhas. Sendo possível que existam vias alternativas para levar à resposta do interferon  $\beta$  (IFN $\beta$ ). Uma molécula provável para fornecer essa rota é o MDA5, que como receptor da mesma família de RIG-I, pode iniciar cascatas de sinalização convergindo na mesma via que leva à indução da expressão do IFN $\beta$  (BARBER et al., 2010).

Apesar de pertencerem à mesma família de PRRs, foi verificado em mamíferos que as moléculas RIG-I e MDA5 desempenham papéis diferentes no reconhecimento viral. O RIG-I reconhece a maioria dos vírus de RNA de fita simples (ss), incluindo todos os vírus de RNA de fita simples negativa [(RNAss(-)] estomatite vesicular, incluindo como o vírus da gripe que possui RNA segmentado, e alguns vírus de RNA de fita simples positiva [RNAss(+)] como o vírus da hepatite C e vírus da encefalite japonesa (KATO; TAKAHASI; FUJITA, 2011). Por outro lado, o MDA5 reconhece alguns outros vírus de RNAss (+) como o vírus da encefalomiocardite (EMCV), o vírus

da encefalomielite murina de Theiler (TMEV), o coxsackievirus B3 (CVB3) e norovírus de camundongo (GITLIN et al., 2006; KATO et al., 2006; MCCARTNEY et al., 2008; PICHLMAIR et al., 2009; WANG et al., 2010). Outros vírus RNAss, como o dengue, o vírus do Nilo Ocidental, o vírus da hepatite de murina e vários paramixovírus, são reconhecidos tanto pelo RIG-I quanto pelo MDA5 (KATO; TAKAHASI; FUJITA, 2011). Assim como um vírus de RNA de fita dupla (ds), o reovírus, que também demonstrou envolver ambos os RLRs (KATO et al., 2008).

Este reconhecimento diferencial de vírus por RIG-I e MDA5 pode ser causado por suas preferências distintas para ligação no RNA. O RIG-I pode ser ativado por RNAs contendo 5'-trifosfato (5'ppp), bem como por dsRNAs curtos, menor que 2 kbp, (KATO; TAKAHASI; FUJITA, 2011). A especificidade do RIG-I ao ligante fornece uma explicação de como ele diferencia os RNAs virais dos RNAs celulares. Muitos vírus de RNA carregam genomas que contêm 5'ppp ou produzem RNAs contendo 5'ppp durante seu ciclo de replicação no citoplasma das células infectadas, enquanto os RNAs celulares citoplasmáticos geralmente não possuem 5'ppp.

Embora os ligantes do MDA5 ainda não estejam claros, o MDA5 é ativado pela transfecção de um análogo de dsRNA sintético longo (maior que 2 kbp), com uma sequência artificial, como o ácido polinossínico-policitidílico (Poly I:C). Experimentos baseados em transfecção mostraram que os segmentos do gene L do genoma do reovírus (dsRNAs, de aproximadamente 3,9 kbp) induzem uma resposta de IFN $\beta$  que é parcialmente dependente do MDA5 (KATO et al., 2006). Com base nessas descobertas, o MDA5 parece reconhecer dsRNAs longos intrinsecamente "não-próprios" do hospedeiro. No ser humano, as helicases de RIG-I e MDA5 têm nas regiões N terminais domínios CARD e recrutam um adaptador do gene de sinalização antiviral mitocondrial (MAVS, também conhecido como IPS-1, Cardif ou VISA) (KAWAI et al., 2005; MEYLAN et al., 2005; SETH et al., 2005; XU, L.-G. et al., 2005), que inicia posteriormente a via de sinalização das moléculas NF- $\kappa$ B e IRF3/7 (WEST; SHADEL; GHOSH, 2011). Em galinhas, a superexpressão de um polipeptídeo contendo os dois domínios CARD do MDA5 de galinha (chMDA5) ativa o promotor dos IFN de galinha (chIFN) downstream, semelhante ao MDA5 de mamíferos (ANDREJEVA et al., 2004; CHILDS et al., 2007).

O terceiro membro da família dos RLR é o LGP2 também conhecido como Dhx58, que abriga um domínio de helicase e um RD (repressor domain) em sua região C terminal, mas não possui domínios CARD, como RIG-I e MDA5 (YONEYAMA et al.,

2005). Estudos anteriores em camundongos já indicaram que superexpressão de LGP2 inibe as infecções dos vírus da SV (paramyxovirus Sendai) e da doença de Newcastle através da sinalização para os elementos reguladores e estimulação da via do IFN, tendo um potente papel antiviral. LGP2 age ainda como um regulador negativo do hospedeiro regulando a sinalização do RIG-I, provavelmente através de um mecanismo de competição já que LGP2 possuía uma maior afinidade pelo dsRNA viral do que o RIG-I (ROTHENFUSSER et al., 2005).

Porém, o LGP2 pode atuar também como um regulador positivo no caso do reconhecimento do RNA viral mediado por RIG-I e MDA5, com exceção ao reconhecimento do vírus da influenza. Nesse último caso a LGP2 atua como um componente essencial para mediar respostas antivirais específicas através dos RLR (VENKATARAMAN et al., 2007; SATOH et al., 2010). O LGP2 de mamíferos é semelhante ao de galinhas, de patos e de gansos. e estes LGP2 não possuem domínios CARDS e exibem efeitos funcionais análogos (LINIGER et al., 2012; JIAO et al., 2015; WEI et al., 2016; HUO et al., 2019). Assim, estas moléculas não são capazes de iniciar a interação CARD-CARD com a proteína MAVS porque não possuem o domínio CARDS e não são capazes de iniciar a sinalização *downstream* da via de sinalização IFN do tipo I (SATOH et al., 2010).

Além de seu papel significativo na resposta antiviral e nas respostas inflamatórias, a proteína MAVS também regula outras vias e outros processos como apoptose, dinâmica mitocondrial e autofagia (BELGNAOUI; PAZ; HISCOTT, 2011). As MAVS são proteínas localizadas na membrana de algumas organelas, principalmente em mitocôndrias, em peroxissomos e no sistema de membrana associado à mitocôndria (SETH et al., 2005; XU, L.-G. et al., 2005; DIXIT et al., 2010). Estas proteínas constituem uma via de sinalização complexa envolvendo o NEMO citosólico e TBK1 (ZHONG et al., 2008; LIU, S. et al., 2013). A ativação do IRF3 ocorre pela cascata de sinalização com ubiquitinação de MAVS e sua interação com o NEMO citosólico e o TBK1 (GACK et al., 2007; ZHAO et al., 2007; NAKHAEI et al., 2009; ZENG et al., 2009; OSHIUMI et al., 2010).

A transdução de sinais para ativação da MAVS e de outros PRRs antivirais até a fosforilação de IRF3 estão relacionados a outras proteínas como TRAF 2, 5, 6 e TRAF3 (SAHA et al., 2006; MAO et al., 2010; TANG; WANG, 2010; LI, S. et al., 2011; LIU, S. et al., 2013). A MAVS fosforilada parece ter um papel para aproximar TBK1 da proteína IRF3 (LIU et al., 2015). A transdução de sinais *upstream* ligados à membrana

e aos módulos citosólicos downstream da sinalização do RIG-I requerem processos regulatórios complexos, incluindo plataformas específicas de proteínas andaime (proteínas *scaffold*) que podem reunir vários componentes. Um desses processos conhecidos nas células de mamíferos inclui a molécula ArfGAP com dois domínios plaquistrinos 2 (ADAP2), que atua como uma proteína *scaffold* com um papel crítico para acoplar diferentes módulos de sinalização RIG-I para a transcrição do gene do interferon (BIST et al., 2017).

A MAVS de galinha (chMAVS) é ligada às mitocôndrias como nos mamíferos. A função dessa proteína parece ter sido conservada entre a evolução de aves e mamíferos, uma vez que a superexpressão de chMAVS e IRF7 desencadeia respostas IFN do tipo I, mesmo com a baixa identidade genética entre as sequências dessas duas espécies. Experimentos de silenciamento gênico revelaram que o chMAVS atua recebendo sinais do chMDA5 e transferindo o sinais para o IRF7 na via de produção IFN do tipo I, o que demonstra a necessidade chMAVS para as respostas induzidas por infecção com AIV (LINIGER et al., 2012). Também foi comprovado que o fator de transcrição IRF7 de galinha é necessário para respostas de IFN do tipo I mediadas por RLR, como nas vias de mamíferos (JUANG et al., 1998).

Os fatores reguladores de interferon (IRFs) são uma família de fatores de transcrição de IFNs do tipo I que modulam a resposta imune e são especialmente importantes para vários aspectos das defesas do hospedeiro, como imunidade adaptativa, regulação da oncogênese e diferenciação da linhagem celular (YANAI; NEGISHI; TANIGUCHI, 2012).

Até o momento, um total de dez membros foram classificados na família IRF, IRF-1 a 10 em vertebrados, com outro membro nomeado como IRF-11 em peixes. Em mamíferos, o IRF-10 não foi encontrado em humanos e camundongos. Em peixe-zebra, peixe-boi, sapo, lagarto anolis e cão todos os dez membros foram detectados. Outros estudos, confirmaram em galinha a ausência do IRF-3 e o IRF-9 (HUANG, B. et al., 2010; MAGOR et al., 2013). Estes fatores estão envolvidos na regulação de uma variedade de funções celulares, como as respostas imunes mediadas pelo IFN, como também em leucemia e em outras neoplasias malignas com diferentes tipos de células, na regulação do crescimento e na apoptose das células, afetando a suscetibilidade e a progressão dos cânceres (NING; PAGANO; BARBER, 2011).

Caracterizado como o "regulador principal" da produção do IFN de tipo I (alfa), IRF7 é um regulador primário na produção fisiológica de IFN na reação local e sistêmica em resposta a infecção viral, a expressão da proteína IRF7 é suficiente para ativar a respostas IFN frente ao vírus e manter a integridade da via de transdução de sinal nas células infectadas (PRAKASH; LEVY, 2006). Enquanto, a ausência IRF7 inibe a expressão do gene IFN alfa (IFN $\alpha$ ), diminuindo a imunidade antiviral inata (IWASAKI; PILLAI, 2014)

Nos mamíferos, o IRF7 é inativo sendo expresso constitutivamente no citoplasma, especialmente nas células B, células dendríticas plasmocitóides (pDCs) e monócitos no baço, timo e linfócitos do sangue periférico. A sinalização acionada a partir dos PRRs causa a fosforilação de baixo nível de IRF7 endógeno, que é ativado e junto com NF $\kappa$ B e IRF3 no estágio inicial da infecção viral. A IRF3 se liga aos elementos responsivos aos vírus nos promotores de IFN $\alpha$  e IFN $\beta$  e induz pequenas quantidades de IFNs do tipo I, que se ligam aos receptores de IFN $\alpha$  em outras células, e desencadeiam uma resposta antiviral pela ativação da via IFN (YANG, H. et al., 2003).

A ligação de IFNs ao receptor de IFN $\alpha$  resulta na ativação dos transdutores de sinal de IFN Janus quinase e ativador da cascata de sinalização da transcrição; o que causa a fosforilação e a ativação dos transdutores de sinal e ativador da transcrição 1 e 2. Os transdutores de sinal ativados e o ativador da transcrição 1/2 se ligam ao IRF9 como um complexo denominado "fator 3 estimulador do gene IFN", que por sua vez se liga ao elemento de resposta estimulado por IFN no promotor IRF7 e induz a síntese de mais IRF7. Posteriormente, o IRF7 recém-sintetizado é ativado e induz mais IFNs, para que ainda mais IRF7 e IFNs sejam produzidos. Finalmente, o IRF3 nos estágios finais é degradado pela infecção viral (NING; PAGANO; BARBER, 2011).

A meia-vida do IRF7 é muito curta (entre 0,5 a 1 h nas células infectadas e de aproximadamente 5 h nas células não infectadas) em fibroblastos de embriões de camundongos. O IRF7 permanece em níveis baixos na maioria dos tipos de celulares. A estabilidade da molécula é provavelmente controlada pelo sistema ubiquitina-proteossoma (PRAKASH; LEVY, 2006). Além disso, o IRF7 murino e humano contém uma sequência muito conservada de ácido glutâmico prolina-serina-treonina, esta sequência denomina PEST aparenta ser essencial para destruição seletiva do IRF7 o que não ocorre com o IRF3 (SATO et al., 2000). A fosforilação de IRF7 parece não ser necessária, mas pode contribuir para a degradação do IRF7 quando estimulada



pelos vírus. A estabilidade do IRF7 é específica do tecido, mas a meia-vida do IRF-7 em amostras aviárias, no entanto, permanece desconhecida (CAILLAUD et al., 2005)

O gene que era denominado como IRF3 em galinhas foi descoberto ser induzível por interferon e mais semelhante ao IRF7 (GRANT; VASA; DEELEY, 1995). Dessa maneira, a nomenclatura do IRF3/7 em galinhas ficou confusa e alguns artigos citavam a ausência de IRF3 em galinhas e em outras espécies aviárias (CORMICAN et al., 2009; HUANG, B. et al., 2010; MAGOR et al., 2013). Contudo, um estudo demonstrou que as galinhas usam o IRF7 para a regulação de IFN $\beta$ , que é mediada por MAVS e STING em resposta a infecções por vírus de RNA e DNA (CHENG, Y. et al., 2019). Assim, a função do IRF7 em galinhas foi demonstrada e o gene determinado como chIRF7.

## 2.5 ADAP2

A proteína ArfGAP com dois domínios plaquistrinos (PH) 2 (ADAP2) é também conhecida como centaurina alfa 2 (CENTA2). A ADAP2 é expressa de forma ubíqua possuindo níveis mais altos de expressão na gordura, coração e músculo esquelético de humanos (WHITLEY et al., 2002). Esta proteína possui funções conhecidas na regulação do desenvolvimento cardíaco e na estabilização dos microtúbulos (WHITLEY et al., 2002; HANCK et al., 2004; ZUCCOTTI et al., 2012; VENTURIN et al., 2014).

A expressão do ADAP1 (também conhecido como centaurina alfa 1) é amplamente restrita ao cérebro, diferente do ADAP2. Embora o ADAP2 e o ADAP1 compartilhem por volta de 60% da identidade da sequência de aminoácidos e contenham domínios ARF GAP na região terminal N e dois domínios PH, o ADAP1 contém um sinal de localização nuclear e localiza-se principalmente no citosol ou núcleo, enquanto o ADAP2 localiza-se predominantemente no enrugamento das membranas plasmáticas, este enrugamento é denominado *ruffling* (HAMMONDS-ODIE et al., 1996; VENKATESWARLU; CULLEN, 1999; WHITLEY et al., 2002; AGGENSTEINER; REISER, 2003). O enrugamento da membrana plasmática é constituído pela formação de pregas móveis na superfície celular que contém uma malha de filamentos de actina polimerizados. Esta é uma das primeiras mudanças estruturais observadas nas células, após diversos estímulos quimioatraentes e sua formação está envolvida no processo de macropinocitose (RIDLEY, 1994; BULGIN et al., 2009; MERCER; HELENIUS, 2009).

Atualmente a família ArfGAP possui cerca de 31 membros, que são divididos em 10 subfamílias (KAHN et al., 2008; TANNA et al., 2019). Algumas dessas proteínas são compostas por fatores que controlam, especificamente, os estágios complexos do processo endocítico celular. Além dessas, outras proteínas dessa família se ligam com o Trifosfato de guanosina (GTP), que tem a atividade regulada por fatores de troca de nucleotídeos de guanina (GEFs) e proteínas ativadoras de GTPase (GAPs). Enquanto os membros da família de proteínas Arf, relacionados à superfamília Ras do fator de ribosilação de difosfato de adenosina (ADP), são expressos em todas as células eucarióticas e regulam o tráfego de vias secretoras (como é o caso de Arf1), bem como rearranjos de actina cortical e endocitose (como é o caso de Arf6). O Arf6 influencia também a migração celular, a polarização, a endocitose e o tráfego endossômico por meio de seu impacto direto nos dois reguladores do citoesqueleto de actina (RADHAKRISHNA et al., 1999; SANTY; CASANOVA, 2001) e na membrana lipídica (HONDA, A. et al., 1999; GE et al., 2001). Assim, a expressão de reguladores da atividade de Arf6, como GEFs e GAPs de Arf6, podem induzir efeitos pronunciados em uma infinidade de eventos celulares convergindo na captação da membrana plasmática e / ou no tráfego endossômico, podendo gerar efeitos antivirais (SHU et al., 2015).

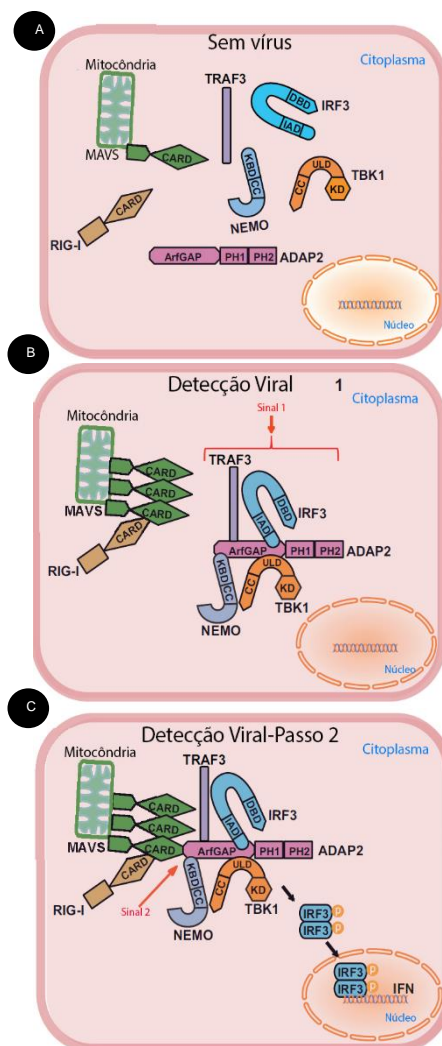
Uma outra proteína desta família que relaciona-se à resposta imune inata é a centaurina beta 1 (CENTB1), a qual funciona como uma reguladora negativa na via de sinalização factor nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) mediada por receptores da resposta imune que atua na detecção de moléculas bacterianas NOD em células de mamíferos (YAMAMOTO-FURUSHO et al., 2006). Ainda pouco se é compreendido sobre o papel da família ArfGAP nas respostas imunes (RANDAZZO; INOUE; BHARTI, 2007; KAHN et al., 2008).

Um total de 226 novos genes reguladores da resposta de IFN $\beta$  mediada por RIG-I já foram identificados, sendo um destes um membro da família ArfGAP, o ADAP2 (PULLOOR et al., 2014). O ADAP2 já havia sido identificado em um microarranjo de proteínas na busca do interactoma do NEMO (modulador essencial do fator nuclear  $\kappa$ B), proteína adaptadora que serve como um canal molecular que conecta sinais transmitidos dos sensores até o fator transcrição NF- $\kappa$ B para ativação gênica (HE; ISRAEL, 1998; FENNER; SCANNELL; PREHN, 2010).

O papel da ADAP2 como uma proteína importante para interação de outras proteínas da via de produção de IFN também foi identificado em células HEK293T em

proteínas de origem humana (Figura 6). Em condições naturais, a interação entre ADAP2 e outras proteínas como MAVS, NEMO, TBK1 e IRF3 não ocorre na ausência de uma infecção viral. Durante a infecção viral, um sinal dependente do TRAF3 (sinal 1) é capaz de ativar o ADAP2 para interagir com MAVS, NEMO, TBK1 e IRF3 e formar um complexo que aproxima o IRF3 do TBK1. Posteriormente, no caso da sinalização através da ativação pelo RIG-I, o ADAP2 que provavelmente está associado ao complexo de proteínas, com NEMO, TBK1 e IRF3 se liga também à MAVS ativada (BIST et al., 2017). Esta etapa ativa a TBK1 para fosforilar o IRF3. A fosforilação de MAVS por TBK1 também pode ocorrer nesta fase (LIU, S. et al., 2015).

**Figura 6. Modelo de sinalização do ADAP2 durante ativação de sinalização por RIG-I.**



**Legenda:** Modelo proposto por Bist e colaboradores (2017) para o papel da ADAP2 na resposta antiviral. As proteínas são mostradas com seus domínios rotuladas com suas siglas. As interações individuais da ADAP2 com as demais proteínas são marcadas especificamente em seus locais de interação identificados experimentalmente, exceto no caso TRAF3. (A) Nas células não infectadas em condições naturais, o ADAP2 não está associado a nenhuma outra proteína da via de sinalização de PRR. (B) Após a infecção viral, dois eventos independentes ocorrem: (i) a detecção do vírus pelo RIG-I ativa e induz a polimerização do MAVS, e (ii) a ADAP2 forma um complexo com TRAF3, NEMO, TBK1 e IRF3, acionada por sinal-1. Isso aproxima o IRF3 do TBK1. (C) Nos estágios posteriores da infecção viral, o complexo ADAP2-NEMO-TBK1-IRF3 se ligará ao MAVS polimerizado, que é desencadeado por um sinal-2 não identificado. Isso ativará o TBK1 para fosforilar o IRF3, que vai ao núcleo ativando a via do IFN. KBD, domínio de ligação à quinase; KD, domínio quinase; CC, bobina em espiral; ULD, domínio semelhante à ubiquitina; IAD, domínio de associação IRF; DBD, domínio de ligação ao DNA; CARD, domínio de recrutamento e ativação da caspase.

**Fonte:** Adaptado de (BIST et al., 2017).

Não está claro se a ligação do complexo ADAP2-NEMO-TBK1-IRF3 ao MAVS exige um segundo sinal. Em mamíferos, o ADAP2 funciona como uma plataforma central, em que diferentes módulos de sinalização de PRR (Receptores de reconhecimento de padrão) são montados e funcionalmente integrados para a fosforilação do IRF3 e conseqüentemente ativação da via do Interferon. Coletivamente, todas essas evidências fornecem uma maior compreensão sobre os papéis das proteínas da família ArfGAP nas interações hospedeiro-patógeno em mamíferos (BIST et al., 2017). Contudo, este papel do ADAP2 não foi ainda investigado em aves.

## 2.6 Grânulos de Estresse (SG)

Um aspecto importante para controlar a expressão gênica nas células é a modulação da função dos RNAs mensageiros (mRNAs) citoplasmáticos. Os mRNAs citoplasmáticos são controlados pela regulação da sua tradução, estabilidade e localização dentro da estrutura celular, sendo estes processos frequentemente interconectados (BUCHAN; PARKER, 2009). Por exemplo, os mRNAs podem ser localizados antes do processo tradução (MARTIN, K. C.; EPHRUSSI, 2009), na iniciação da tradução e na degradação de mRNA (COLLER; PARKER, 2004), sendo que os mecanismos de declínio e repressão da tradução do mRNA compartilham proteínas similares (HOLMES et al., 2004; COLLER; PARKER, 2005).

Em células eucarióticas, mRNAs não traduzidos podem acumular-se em dois tipos de grânulos citoplasmáticos (compartimentos celulares não ligados à membrana são denominados grânulos) de mRNP -*Messenger ribonucleoprotein particles*, extremamente conservados evolutivamente (SPECTOR, 2006): Grânulos de estresse (SG) e *corpos P* (corpos de processamento, Pb) (PARKER; SHETH, 2007; BUCHAN; MUHLRAD; PARKER, 2008; ANDERSON; KEDERSHA, 2009).

mRNPs são complexos formados pela associação de RNAs mensageiros (mRNA) e diversos fatores, proteínas que se ligam ao RNA e a outras proteínas. A formação dos mRNPs se inicia no núcleo e o destino do mRNA depende da combinação desses fatores. Por exemplo, uma vez no citoplasma, o mRNA pode se localizar em regiões específicas da célula e essa localização depende das proteínas que compõem os mRNPs (LÉCUYER et al., 2007). Exemplos de mRNPs, são o complexo necessário para dar início à tradução, formado pela ligação de Poly(A)-

Binding Protein (PABP) à eIF4G, ambas unidas ao mRNA, sendo essencial para que o processo de tradução seja completo (TARUN et al., 1997).

Os grânulos de estresse se formam a partir de mRNAs paralisados no início da tradução e contêm vários fatores de iniciação da tradução, uma variedade de proteínas de ligação ao RNA e muitas proteínas não-ligadas ao RNA (JAIN et al., 2016). Enquanto *Pb* contém mRNAs associados a repressores de tradução e a maquinarias para declínio do RNA. Os mRNAs nos *Pb* podem ser direcionados para retirada do cap e degradação (AIZER et al., 2014).

SG são dinâmicos; podem alcançar vários micrômetros em 20 minutos e são dissolvidos em níveis abaixo do limite de detecção dentro de 60 minutos após a extinção do estímulo de estresse ou a adição de agentes estabilizadores de polissomo, como ciclo-heximida ou emetina (KEDERSHA, N. et al., 2000). O último fenômeno sugere que mRNPs são constantemente trocados entre grânulos de estresse e polissomos e que a persistência de SGs requer um influxo constante de mRNPs inativos. Assim, a formação de SG também requer transporte retrógrado contínuo de mRNPs ao longo de um citoesqueleto intacto de microtúbulos (IVANOV; CHUDINOVA; NADEZHDINA, 2003; LOSCHI et al., 2009).

As características que definem os grânulos de estresse foram estabelecidas na virada do século XXI (ANDERSON; KEDERSHA, 2002), concomitantemente à identificação do *T cell-restricted intracellular antigen 1* (TIA1), da *cytotoxic granule-associated RNA binding protein-Like 1* (TIAR) (KEDERSHA, N. L. et al., 1999; KEDERSHA, N. et al., 2000) e da *RAS GTPase-activating protein SH3 domain-binding protein 1* (G3BP1) (TOURRIÈRE et al., 2003). Estas proteínas citadas são proteínas que mediam a agregação de mRNP; essas são excelentes marcadores para a detecção de SGs por microscopia de imunofluorescência (KEDERSHA, N.; ANDERSON, 2007).

Os SGs, em mamíferos, são formados com a fosforilação do *eukaryotic initiation factor 2 2α* (eIF2α) por quinases ativadas por algum estímulo de estresse. A fosforilação de eIF2α reduz a disponibilidade do complexo ternário eIF2-GTP-tRNA<sup>iMet</sup> resultando num complexo de pré-iniciação 48S deficiente, que não consegue recrutar a subunidade ribossomal 60S, bloqueando o início da tradução e promovendo a dissociação dos polissomos (ANDERSON; KEDERSHA, 2002; 2006).

Diferentes vias sinalizadoras atuam após a fosforilação de eIF2α, regulando a montagem e a dissociação dos SG. A formação destes grânulos começa quando

proteínas ligadoras de RNA tais como a TIA-1, a *Thrombotic thrombocytopenic purpura* (TTP), a Fragile X mental retardation protein (FMR)P e Ras-GAP SH3 domain binding protein (G3BP) ligam-se preferencialmente a determinados transcritos que estão ligados ao complexo 48S formado pela junção da subunidade ribossomal 40S, do *Eukaryotic initiation factor 3* (eIF3) e do complexo ternário eIF2-GTP-tRNA<sup>iMet</sup> provenientes da dissociação dos polissomos (KEDERSHA, N.; ANDERSON, 2007). A ligação de TIA-1 e TIAR a mRNAs livres causam mudanças conformacionais que expõem domínios semelhantes a príons, que desencadeiam a agregação de mRNP (GILKS et al., 2004). Da mesma forma, a auto-agregação de G3BP1 (e / ou da proteína intimamente relacionada G3BP2 (MATSUKI et al., 2013)) através do *amino-terminal nuclear transport factor 2* (NTF2) é importante para a formação de SGs (TOURRIÈRE et al., 2003).

A recuperação da fluorescência após experimentos de fotodegradação (FRAP) usando proteínas de fusão TIA-1 (eGFP-TIA-1) e de fusão eGFP-G3BP1 marcadas com proteína fluorescente verde (eGFP) mostrou que a agregação dessas proteínas não é estável e que elas trocam rapidamente entre SGs e o citosol (KEDERSHA, N. et al., 2000; KEDERSHA, N. et al., 2005).

É possível que após uma acumulação inicial de SGs, os mRNPs 48S ligados por G3BP1 e/ou TIA1 ou TIAR formem pequenos agregados centrais (WHEELER et al., 2016). Depois da primeira etapa de nucleação, a proteína PABP-1 (*polyadenylate-binding protein 1*) é ligada a todos os transcritos poli(A)<sup>+</sup> e promove a agregação destes pequenos grânulos tornando-os microscopicamente visíveis. Alguns transcritos podem estar ligados a várias proteínas de nucleação o que favorece a agregação, aumentando progressivamente o tamanho dos grânulos. Outras proteínas não se ligam aos RNA sendo recrutadas a estes complexos através de interações com outras proteínas de nucleação o que sugere uma integração dos grânulos de estresse com outras vias de sinalização na célula (ANDERSON; KEDERSHA, 2008; BUCHAN; PARKER, 2009; ALVES, 2010).

Há evidências acumuladas de que os grânulos de estresse são mantidos juntos por uma rede de fracas interações RNA-proteína e proteína-proteína que envolvem domínios de baixa complexidade e domínios intrinsecamente desordenados (KEDERSHA, N.; IVANOV; ANDERSON, 2013; PROTTER; PARKER, 2016). Esses domínios impulsionam a separação de fase líquido-líquido, que concentra e mantém

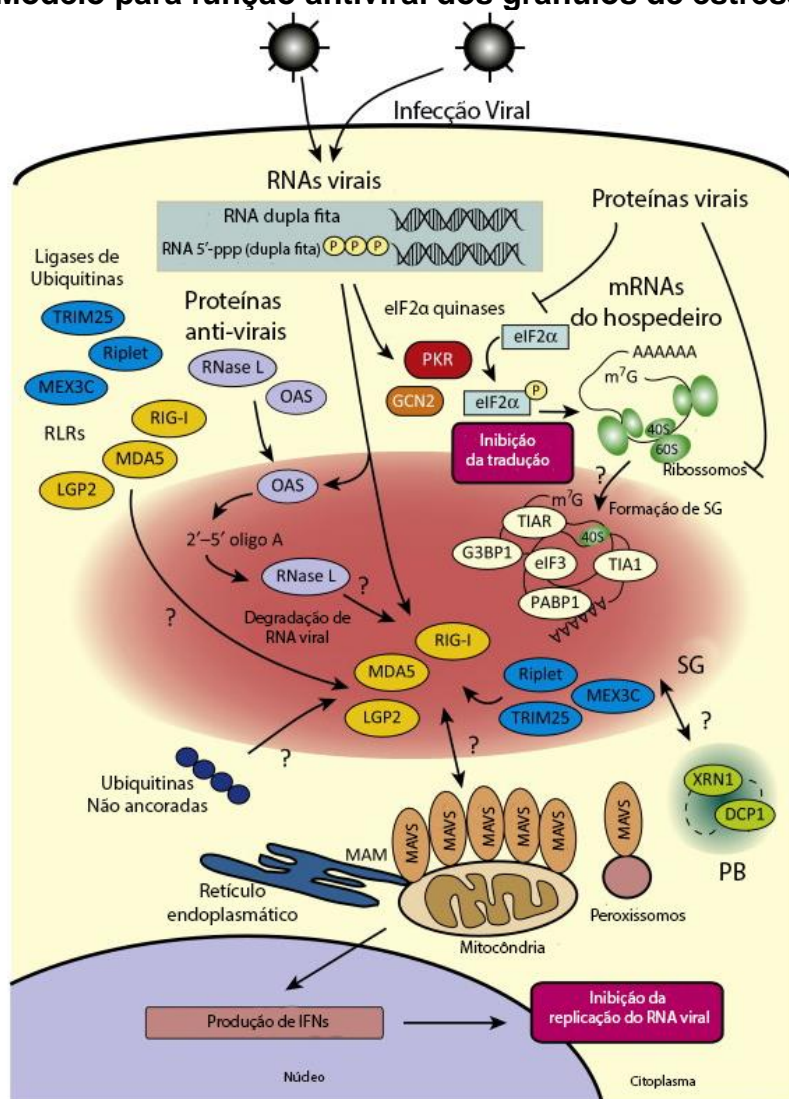
juntos centenas de proteínas e moléculas de RNA em SGs (KEDERSHA, N.; IVANOV; ANDERSON, 2013; LIN, Y. et al., 2015).

Sendo assim é importante investigar os SG por quatro razões principais. Primeiro, a formação e a dinâmica dos grânulos de estresse podem afetar a localização, a tradução e a degradação do mRNA, bem como as vias de sinalização e de respostas antivirais. Segundo, os grânulos de estresse compartilham muitos componentes com o mRNP materno e os grânulos neuronais, sugerindo um mecanismo conservado de compartimentação do mRNP (por exemplo, (BARBEE et al., 2006). Terceiro, mutações que aumentam a formação de grânulos de estresse e/ou limitam a liberação de grânulos de estresse são causadoras em algumas doenças neurodegenerativas (LI, Y. R. et al., 2013; RAMASWAMI; TAYLOR; PARKER, 2013). Finalmente, como representantes de organelas não ligadas à membrana, a compreensão de sua montagem e função ilustra uma novidade interessante da biologia celular (PROTTER; PARKER, 2016).

A formação de SG geralmente tem um efeito negativo na replicação viral. Isso pode ocorrer pela indução da via de estresse, com inibição da tradução independente da estrutura cap, inibição da síntese de proteínas virais ou diminuição das transcrições virais de mRNA que podem ser restringidas nesses grânulos. Enfim os SGs são capazes de capturar muitos fatores celulares que são indispensáveis para tradução e replicação viral impedindo que o ciclo de replicação viral continue ocorrendo normalmente, parte desta situação pode ser visualizado na Figura 7 (FUJIMURA; KANO; MURATA, 2008; HENAO-MEJIA et al., 2009; BORGHESE; MICHIELS, 2011; WHITE, J. P.; LLOYD, 2012; ONOMOTO et al., 2014).



**Figura 7. Modelo para função antiviral dos grânulos de estresse (SG).**



Legenda: Os RNAs virais ativam a PKR (ou GCN2, no caso do vírus Sindbis) para iniciar a montagem do SG através da fosforilação do eIF2 $\alpha$  em células infectadas com vírus. A fosforilação do eIF2 $\alpha$  bloqueia a tradução de mRNAs celulares. Os mRNAs com interrupção da tradução podem ser transferidos para um compartimento celular distinto, o corpo P, para serem degradados. Os RNAs virais também são reconhecidos pelos RLRs, que podem ser recrutados para os SGs com várias outras moléculas de sinalização, incluindo proteínas antivirais e ubiquitina ligases. A via OAS (2',5'-oligoadenylate synthetase) -RNase L cliva RNAs virais e os RNAs clivados podem atuar como ligantes para os RLRs. A MAVS localizada nas mitocôndrias e / ou MAM (mitochondrion-associate membrane) forma agregados semelhantes a príons, que interagem com RLRs nos SGs para ativar a via de sinalização indutora de IFN. Áreas que necessitam mais investigação são destacadas com pontos de interrogação.

Fonte: Adaptado de (ONOMOTO et al., 2014).

Como vemos na Figura 7 as células eucarióticas desenvolveram diferentes mecanismos para interromper a tradução de proteínas virais (GARCIA; MEURS; ESTEBAN, 2007; MCCORMICK; KHAPERSKYY, 2017). Esses mecanismos se iniciam com a detecção dos componentes do vírus, a PKR (*protein kinase*), uma eIF2 $\alpha$  quinase, detectora primária responsável pela detecção de dsRNA (GARCIA; MEURS;

ESTEBAN, 2007). Ao detectar dsRNA, a PKR dimeriza e autofosforila os resíduos de treonina em seus domínios de ativação, estabilizando os dímeros e aumentando atividade da quinase (GARCIA; MEURS; ESTEBAN, 2007; NALLAGATLA; TORONEY; BEVILACQUA, 2011). Esta proteína não é a única eIF2 $\alpha$  quinase que pode ser ativada em células infectadas por vírus. Por exemplo, o RNA genômico do vírus Sindbis é capaz de ativar o GCN2 (*general control non-derepressible protein 2*) (BERLANGA et al., 2006), vírus envelopados podem produzir altos níveis de glicoproteínas e induzem respostas ao estresse do ER (retículo endoplasmático) e ativam o PERK (*PKR-like endoplasmic reticulum kinase*) (CHAN; EGAN, 2005; CHENG, G.; FENG; HE, 2005).

A ativação viral das eIF2 $\alpha$  quinases desencadeia a fosforilação de eIF2 $\alpha$ , e a inibição do início da tradução com acúmulo de mRNPs 48S que se agregam formando SG. Essa via pode interromper rapidamente a síntese de proteínas virais, muito antes da regulação positiva transcricional das proteínas antivirais do hospedeiro, sendo, portanto, um importante mecanismo intrínseco da defesa imunológica. No entanto, a maioria dos vírus desenvolveu proteínas para combater esse mecanismo de defesa inato altamente conservado e impedindo a fosforilação da eIF2 $\alpha$  (GARCIA; MEURS; ESTEBAN, 2007; JAN; MOHR; WALSH, 2016).

No caso do vírus da influenza A, a proteína não estrutural 1 (NS1) é capaz de inibir a fosforilação eIF2 $\alpha$  bloqueando a ativação da PKR, pelo sequestro de RNA viral e pela interação física com a proteína (LU et al., 1995; KHAPERSKYY; HATCHETTE; MCCORMICK, 2012; ONOMOTO et al., 2012). Onomoto e colaboradores mostram que SG que possuem RLRs nos grânulos citoplasmáticos (avSG) podem ser marcados por G3BP1 em células infectadas pelo AIV com deleção do gene NS1 (AIV- $\Delta$ NS1). As MAVS são fisicamente anexadas ao avSG em resposta à infecção por AIV- $\Delta$ NS1, sugerindo que a importância do avSG para a interação RLR-MAVS (ONOMOTO et al., 2012). Outro estudo demonstrou que o MDA5, o RLR, também presente em galinhas, se localiza no SG durante condições de estresse induzidas com presença ou ausência viral (FENG et al., 2012; LINIGER et al., 2012; LANGEREIS; FENG; VAN KUPPEVELD, 2013)

SGs não são estritamente necessários para inibição da tradução. Então fica a questão do porque a maioria dos vírus, possui mecanismos para a supressão de SG (KHAPERSKYY; HATCHETTE; MCCORMICK, 2012). A inativação mutacionais em fatores chaves que modulam a infecção viral ou a utilização de arsenito de sódio (um

potente ativador de eIF2 $\alpha$  quinase) são importantes para a formação de SGs (MCEWEN et al., 2005; RUGGIERI et al., 2012). Por exemplo, células infectadas com AIV tratadas com arsenito de sódio são induzidas a formar SGs que acumulam proteínas virais NS1 e NP, mas esta formação é inibida pela NS1 viral na ausência do arsenito de sódio (KHAPERSKYY et al., 2014). A formação SG e a transcrição do gene para IFN $\beta$  também foram inibidas em células nocaute para G3BP1 ou PKR, que foram infectadas com influenza A com ausência de NS1, o que revela a importância destes genes na formação SGs (ONOMOTO et al., 2012).

Estudos revelam ainda que os vírus possuem mecanismos adicionais de inibição da formação do SG e interrupção da tradução (BORGHESE; MICHIELS, 2011; KHAPERSKYY et al., 2014; FINNEN et al., 2016). Essas observações sugerem que os grânulos de estresse podem ter outras funções antivirais. De fato, vírus que usam mecanismos de iniciação à tradução IRES (*internal ribosome entry sites*, um mecanismo alternativo de iniciação de tradução independente do *cap* e que é menos sensível à fosforilação de eIF2 $\alpha$ ) ainda bloqueiam a formação de grânulos de estresse (WHITE, J. P. et al., 2007; BORGHESE; MICHIELS, 2011).

Como já foi mostrado Figura 7, detectores de RNA e de proteínas virais também são encontradas dentro dos grânulos de estresse PKR e RLRs (como RIG-I, MDA5 e LGP2) (REIKINE; NGUYEN; MODIS, 2014). Estes últimos, possuem estruturas relacionadas aos sinais das helicases DEAD-box que interagem diretamente com a proteína adaptadora MAVS e ativam as proteínas NF- $\kappa$ B, IRF3 e IRF7 em aves. Estas proteínas são translocadas até o núcleo onde ativam os genes do IFN do tipo I e promovem a transcrição de citocinas antivirais e pró-inflamatórias (ZENG et al., 2010; CLAVARINO et al., 2012; REIKINE; NGUYEN; MODIS, 2014; VAZQUEZ; HORNER, 2015; WU, B.; HUR, 2015; CHENG, Y. et al., 2019).

Porém, qual seria a razão para SGs recrutarem proteínas de sinalização? A TRAF2 (*tumor necrosis factor receptor-associated factor 2*) pode guardar uma possível resposta, TRAF2 é um dos primeiros sinalizadores a ser identificado como alvo de SGs, é se torna incapaz de retransmitir sinais para induzir a apoptose através da via de ativação do receptor do fator de necrose tumoral após seu sequestro pelos SGs (KIM, W. J. et al., 2005). Assim, foi proposto que os grânulos de estresse podem promover a sobrevivência celular durante os períodos de estresse pela supressão das cascatas de sinalização pró-apoptóticas. A concentração de detectores citoplásmicos de RNA viral em SGs junto com seus co-fatores de sinalização e ligantes de RNA viral

parecem aumentar o poder de reconhecimento destes por parte dos detectores da resposta imune inata, podendo ser necessários para sua ativação total nesta via (ONOMOTO et al., 2012). De fato, PKR inativo foi mostrado ser especificamente recrutado para os SGs através da interação com G3BP1 e *cell cycle-associated protein 1* (CAPRIN1) (REINEKE et al., 2015).

A indução de IFN tipo I tem um papel crucial nas respostas imunes antivirais inatas. A sinalização através dos receptores de IFN tipo I leva à produção de proteínas codificadas pelos ISGs, que estabelecem um estado antiviral nas células infectadas e não infectadas (TEIJARO, 2016). Muitas proteínas codificadas por ISG são recrutadas pelos SGs, e algumas têm demonstrado regular a dinâmica dos SGs. A diminuição na indução do IFN tipo I na ausência de formação de SGs sugere que SGs podem ser importantes para sinalização de RIG-I em mamíferos (GEORGE et al., 2016).

Contudo, não há evidências definitivas de que a agregação do SG seja necessária para o reconhecimento ideal dos ácidos nucleicos virais e/ou a estimulação da produção de IFN do tipo I, apesar de inúmeros artigos ligando SGs à produção de IFN do tipo I (ONOMOTO et al., 2012; ONOMOTO et al., 2014; YOO et al., 2014; REINEKE; LLOYD, 2015; GEORGE et al., 2016; YONEYAMA; JOGI; ONOMOTO, 2016; MCCORMICK; KHAPERSKYY, 2017; MANIVANNAN; SIDDIQUI; MALATHI, 2020). A formação de grânulos de estresse mostrou-se dispensável para ativação e sinalização de MDA5 (LANGEREIS; FENG; VAN KUPPEVELD, 2013). Diferentemente em células infectadas por vírus, a indução da produção de IFN tipo I pela transfecção com RNA 5'-trifosfato- um ligante que é principalmente reconhecido pelo RIG-I - não foi afetada pelo silenciamento do DHX36, a proteína identificada como link entre ativação do RIG-I para formação SGs (YOO et al., 2014).

Estes achados sugerem que os grânulos de estresse auxiliam os processos antivirais. (WHITE, J. P. et al., 2007; LANGEREIS; FENG; VAN KUPPEVELD, 2013). Porém, os mecanismos de ligações e as dinâmicas entre as diversas moléculas que compõem os SGs ainda não estão completamente elucidados. Novas ferramentas moleculares devem acelerar o progresso no entendimento das propriedades biofísicas e funcionais dos grânulos de estresse e auxiliar na avaliação das propriedades antivirais dos grânulos de estresse. A indução de SGs no hospedeiro pode ser uma alternativa para o desenvolvimento de drogas antivirais (MCCORMICK; KHAPERSKYY, 2017).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

Avaliar os mecanismos moleculares e biológicos in vitro da proteína ADAP2 de galinhas (chADAP2) na resposta imune inata das aves.

#### 3.2 Específicos

- A. Caracterização molecular da proteína chADAP2 e compará-la com a de mamífero;
- B. Caracterização biológica pela expressão da proteína chADAP2 em células aviárias (DF-1) após exposição a infecção viral;
- C. Identificar as principais proteínas que interagem com a chADAP2 para elucidar a via de indução do IFN em células aviárias;
- D. Avaliação da atividade antiviral da proteína chADAP2 em células infectadas com AIV.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Instalações

Os estudos desta tese foram desenvolvidos em diferentes laboratórios. Os cultivos celulares e suas infecções experimentais foram realizados no Laboratório de Virologia Clínica e Molecular do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (LVCM-ICB-USP) ilustrado Figura 8A. A microscopia confocal, produção e transfecções de plasmídeos foram realizadas no “The Pirbright Institute” de pesquisa Figura 8B. A reação do PCR quantitativo em real-time com transcriptase reversa (RT-qPCR) e quantificação relativa foi realizado Laboratório de Medicina Preventiva Aplicada (LMVPA), Figura 8C. Todos os procedimentos laboratoriais estavam de acordo com CEUA (Comitê de Ética de Uso Animal) da FMVZ/USP (**CEUA Nº 8346300316**), bem como com as boas práticas desenvolvidas em cada uma dessas instituições em laboratórios de segurança níveis 2 ou 3. Os experimentos envolvendo Organismos Geneticamente Modificados (OGM) foram realizadas nas instalações do LVCM-ICB-USP com as normas da CTNBio.

**Figura 8. Laboratórios onde foram desenvolvidas as diferentes partes deste estudo**



Legenda: A-) LVCM localizado no ICB II na USP-São Paulo. B-) Prédio Jenner no Instituto de Pirbright, Woking, Inglaterra. C-) LMVPA localizado no Bloco Didático de Medicina Veterinária da FZEA-USP, Pirassununga-SP.

Fonte: A e C - Scagion, 2020; B- (NBBJ, 2019)

#### 4.2 Caracterização molecular pelas análises de bioinformática

Os dados sobre a localização do cromossomo e, principalmente, a estrutura do ADAP2 foram obtidos no banco de dados *Ensembl* e *Uniprot*. Essas informações foram processadas no software *Inkscape*, de modo a gerar um quadro informativo sobre o gene investigado. As sequências dos aminoácidos de *Gallus gallus* (XP415661.1), *Anas platyrhynchos* (XP005012331.2), *Mus musculus* (NP722145.1), *Homo sapiens* (NP060874.1) da proteína ADAP2 foram obtidas no *GenBank* e foram alinhadas com o programa *Bioedit*, utilizando o alinhamento múltiplo de *Clustal W* (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994). Para análise filogenética, foram utilizadas 99 sequências de aminoácidos, sendo 45 de aves, 4 de répteis e 50 de mamíferos. A história evolutiva foi inferida usando o método de máxima verossimilhança baseado no modelo baseado em matriz JTT (JONES; TAYLOR; THORNTON, 1992). A distância *pairwise* e a análise filogenética foram construídas pelo software MEGA 7.0

usando o Modelo de *Maximum Likelihood* com valor de *bootstrap* de  $n = 1.000$  (TAMURA et al., 2011).

### 4.3 Células

As células utilizadas nesse estudo são denominadas DF-1, uma linhagem espontaneamente imortalizada, contínua de fibroblastos derivados de embriões de 10 dias da linhagem East Lansing (ELL-0) (FOSTER, D. N.; FOSTER, 1997; FOSTER, D., 1998). Essas células foram mantidas em meio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina / estreptomicina (Meio completo) e foram mantidas na estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. Todas as células foram testadas periodicamente para a presença de micoplasma, utilizando um teste de PCR convencional do gene ribossomal 16S (Referência disponível sob solicitação). Os seguintes primers MGSO 5'-TGC ACC ATC TGT CAC TCT GTT AAC CTC-3' e GPO3 5'- AGC AAA CAG GAT TAG ATA CCC T-3', foram utilizados para cada reação com Tampão 1X (Buffer) (200mM Tris-HCl, pH 8,4; 500mM KCl), 50 pmol/μl de cada *primer*, 1,0 U de Taq DNA polimerase (Invitrogen™), 2,0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200 μM de dNTPs, 1,0 μL da amostra de DNA e água ultrapura até o volume final de 25 μL. A ciclagem de 1 ciclo 5 minutos a 94°C, 34 ciclos de 94°C por 30 segundos, 57,7°C durante 30 segundos e 72°C por um minuto, finalizando com 1 ciclo de 72°C durante 10 minutos, e deixando a reação a 4°C para sua conservação no termociclador, gerando um amplicon de 270 pb foi utilizada para a tentativa de amplificação do gene 16S(VAN KUPPEVELD et al., 1993). Somente após confirmada a ausência de micoplasma no cultivo celular que os experimentos foram realizados.

Durante a tripsinização, é importante ressaltar o cuidado ao manipular estas células, pois estas são extremamente sensíveis a tripsina (LEE, C.-W. et al., 2008). Deste modo, para manutenção de células saudáveis, em nossos experimentos a cada repique a garrafa contendo o tapete celular era lavada com Tripsina-EDTA (0,2%, Vitrocell) uma vez e, depois, se adicionava o volume necessário para simplesmente cobrir o tapete, pois excessos são danosos às células. Assim que a células começavam a desprender, batia-se vigorosamente para soltá-las totalmente. E rapidamente, adicionava-se meio completo com pelo menos o dobro do volume utilizado para a solução de tripsina. Deste modo, as células DF-1 mostravam uma



morfologia mais uniforme, fibroblástica, podendo ser utilizadas para os diversos experimentos.

#### 4.4 Vírus

Três vírus de influenza de baixa patogenicidade (LPAIV) foram utilizados neste estudo. Dois foram gentilmente cedidos pelo Prof. Edison Luiz Durigon do LVCM-ICB-USP, advindos de coletas em aves silvestres do seu grupo de pesquisa: um pertencente ao subtipo H5N2 (A/Turkey/CA/209092/2002, H5N2) adquirido em colaboração com APHIS-USDA-EUA, Embrapa Aves e Suínos e ICB-USP e o outro H2N1 (A/ *Calidris fuscicollis*/ Quissamã/ PNRJ-49 /2019, H2N1). O terceiro LPAIV do subtipo H9N2 (A/ Chicken/ Pakistan/UDL-01/20089, H9N2) utilizado no ensaio antiviral, foi cedido pelo Dr. Muhammad Munir, Universidade de Lancaster. Os vírus estocados foram cultivados em ovos embrionados de galinha livres de patógenos específicos (SPF) antes da realização dos experimentos (WOOLCOCK, 2008). Após três passagem em ovos, foi realizado o teste de hemaglutinação (tHA) para a confirmação da atividade hemaglutinante viral e, posteriormente, a titulação viral em células DF-1 (KILLIAN, 2008). Os experimentos com o LPAIV do subtipo H5N2 foram realizados no laboratório de biossegurança nível 3 do LVCM-ICB-USP, enquanto os experimentos com os outros vírus foram realizados em laboratórios de biossegurança nível 2.

#### 4.5 Titulação Viral

Titulação viral foi realizada de acordo com estudos prévios (COSWIG, 2008; MARTINI, 2010). O teste foi realizado em placas de 96 cavidades (Corning®), que foram preparadas com uma suspensão celular com concentração de  $1,5$  a  $5,0 \times 10^5$  células por poço, obtidas a partir de culturas celulares com pelo menos 48h de incubação.

Estas placas foram incubadas por pelo menos 12h para que ocorresse a adesão celular, placas com 70 a 80% de confluência, as quais apresentaram células com um aspecto normal foram utilizadas para titulação. Realizou-se diluições seriadas

de razão constante igual a dez das soluções virais como mostrado no Quadro 1. A incubação foi realizada com as diferentes diluições, durante o período de 3 horas.

Ao final, cada poço continha 50µL de meio Dulbecco Eagle modificado (DMEM) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) e 2ug/ml Tripsina-EDTA (0,2%, Vitrocell), sendo este determinado como meio de crescimento viral, 50µL do inóculo viral com diferentes concentrações do vírus realizadas através das diluições seriadas. Com a utilização da suplementação de tripsina tornou-se mais fácil a visualização do efeito citopático do AIV.

**Quadro 1. Representação esquemática de placa de titulação.**

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C-	10 <sup>0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-10</sup>
B	C-	10 <sup>0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-10</sup>
C	C-	10 <sup>0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-10</sup>
D	C-	10 <sup>0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-10</sup>
E	C-	10 <sup>0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-10</sup>
F	C-	10 <sup>0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-10</sup>
G	C-	10 <sup>0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-10</sup>
H	C-	10 <sup>0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>	10 <sup>-9</sup>	10 <sup>-10</sup>

**Legenda:** C- indicado na coluna 1 é o controle o que significa ausência de suspensão viral, estes poços receberam somente meio. Nas demais colunas estão indicadas as diluições em série na base 10 do vírus não diluído (10<sup>0</sup>) à diluição de 10<sup>-10</sup>.

Fonte: Scagion, 2020

Após realizada a infecção, as placas foram incubadas em estufa à 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>. As leituras foram realizadas durante 5 dias após a infecção, sendo a primeira, 24 horas após, em busca do efeito citopático característico. Os títulos foram calculados com base no método de Reed e Muench (REED; MUENCH, 1938).

#### 4.6 Plasmídeos e Transfecção

Os plasmídeos pEF-pL2 (LAIDLAW et al., 2013) com insertos de diferentes genes como ADAP2 de galinhas (chADAP2) e a proteína V da estirpe Beaudette C do vírus da doença de Newcastle (BCV), utilizada como controle positivo no co-imunoprecipitação, foram marcadas com V5. Além, dos insertos dos genes chMAVS e chLGP2, com marcação FLAG, bem como o plasmídeo G3BP1 contendo a proteína fluorescente amarela (YFP) foram cedidos pelo Doutor Muhammad Munir da Universidade de Lancaster. Estes plasmídeos foram transfectados em células DF-1 utilizando Lipofectamina 2000 (cat. n.º 11668030, Invitrogen, ThermoFisher) e Meio Opti-MEM® I (cat. n.º 31985062, Gibco) de acordo com as especificações do fabricante.

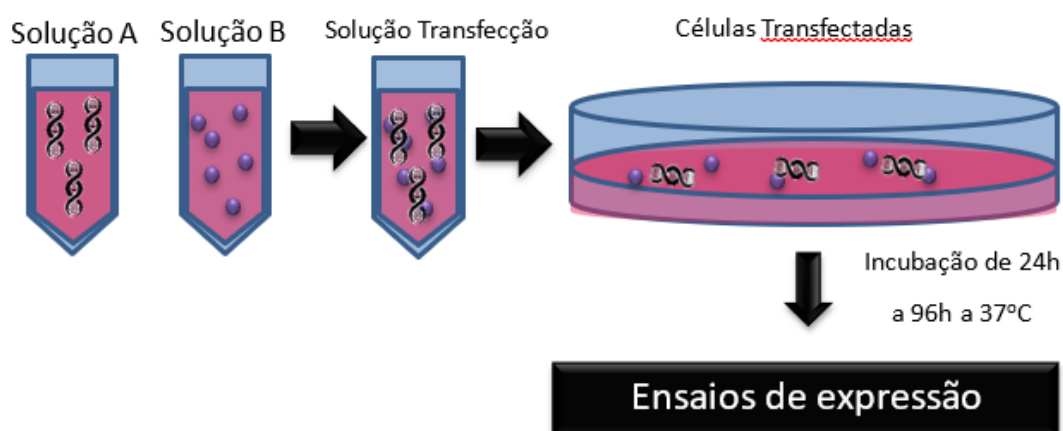
Brevemente, após definida a concentração de material genético a ser transfectado, de acordo com a quantidade de células e citotoxicidade do plasmídeo. Foi preparada a solução de transfecção, o volume desta solução depende da área a ser transfectada, aqui foi dado o exemplo para poços de placas de 24 poços, nas quais utilizamos 100 µl/poço (Figura 9).

Preparou-se duas soluções, a solução A contendo material genético + volume Opti-MEM® necessário para completar 50 µl e a solução B, contendo Lipofectamina 2000 que foi homogeneizada vigorosamente antes da utilização, em uma proporção de 3µl para cada 1 µg de material genético, completando o volume necessário para 50 µl com Opti-MEM®. Incubou-se estas soluções por 5 minutos a temperatura ambiente (TA), depois combinou-se as duas soluções e incubando as por mais 20 minutos a TA.

Retirou-se o meio do poço com o tapete celular, o qual foi transfectado, lavando o duas vezes com meio sem soro fetal bovino e antibiótico, descartou-se solução de lavagem, e adicionou-se cuidadosamente sobre todo o tapete celular a solução de transfecção. Após aplicada a solução de transfecção, incubou-se as células por 5 minutos em TA, e adicionou-se 400µl de solução de manutenção (DMEM + 5% de SFB).

Após este passo as células foram mantidas na estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C, durante 12h, sendo verificadas pelo menos duas vezes. Ao término do período de incubação, total ou parcialmente (pelo menos 6h), dependendo das condições das células transfectadas. O meio era substituído para meio completo para expressão das proteínas de interesse o que pode variar de 24 a 96 h, após este período os experimentos foram realizados.

**Figura 9. Procedimento de transfecção dos plasmídeos nas células DF-1 utilizando Lipofectamina 2000.**



**Legenda:** A solução A apresenta material genético (plasmídeos) + volume Opti-MEM®, enquanto a solução B Lipofectamina 2000+ Opti-MEM®, em uma proporção de 3µl para cada 1 µg de material genético, a solução de transfecção contém a junção da solução A e B, que é gotejada no cultivo celular.

Fonte: Scagion, 2020

#### 4.7 Anticorpos

Dois anticorpos monoclonais produzidos em camundongos foram utilizados no estudo: o anticorpo de camundongo contra a proteína NP do vírus influenza (gentilmente cedido pelo Dr. Muhammad Munir) e o anticorpo anti-FLAG (#F3165, *Sigma-Aldrich*). Um anticorpo policlonal produzido em coelho anti-V5 (#GTX30564, *GeneTex*) também foi utilizado como anticorpo primário. O anticorpo produzido em cabra anti-coelho conjugado com a fluorescência Alexa Fluor 488 (#A11008, Invitrogen) e o anticorpo produzido em cabra anti-camundongo conjugado com a Alexa Fluor 568 (#A11004, Invitrogen) foram utilizados como anticorpos secundários.

#### 4.8 Quantificação da expressão de ADAP2 em células DF-1 frente à infecção viral

##### 4.8.1 Cultivo celular e infecção

Placas de 24 poços contendo  $2 \times 10^5$  células por ml, sendo que cada poço continha 0,5 mL de solução de células foram preparadas previamente e ao atingirem confluência  $\geq 60\%$  foram infectadas com os vírus descritos. A concentração de MOI (multiplicidade de infecção), sendo  $MOI = \text{título viral} / 1 \times 10^5$  (quantidade de células), para a infecção das células com dois diferentes vírus de LPAIV (H5N2 e H2N1) foram utilizadas MOI=1, com exceção do H2N1 no qual foi realizado também outro MOI=10.

Foram utilizados 4 grupos de tratamento: 1) H5N2- MOI=1, 2) H2N1-MOI=1, 3) H2N1-MOI=10, 4) MOCK, nosso controle negativo com as células não tratadas. Os 5 grupos foram avaliados durante 3 momentos, 0h, 24h e 48h após infecção. Todo experimento foi realizado em triplicata para fins estatísticos, totalizando 36 amostras para avaliação.

Para realização da infecção das células, primeiramente os tapetes celulares foram lavados 2 vezes com 300 $\mu$ l de DMEM. Após a lavagem, foi adicionado 100 $\mu$ l da suspensão viral, para que essas ficassem em contato direto com as células.

Dessa maneira, as placas foram incubadas em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C durante 3 horas. Após o período de adsorção viral foi adicionado 500 $\mu$ l de DMEM suplementado com 5% de SFB, 2  $\mu$ g/mL de tripsina (meio de crescimento viral). Após preparadas foram adicionados 500 $\mu$ l dessas soluções aos seus respectivos poços, por fim estas placas também foram deixadas em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

Passadas 3 horas de adsorção, contou-se este momento como 0h pós infecção, sendo as placas deste período congeladas em freezer -80°C. O mesmo procedimento foi realizado com as placas de 24h e 48h pós infecção de todos os tratamentos.

#### 4.8.2 Extração de RNA total

Para a extração de RNA total foram descongeladas em conjunto cada um dos diferentes tratamentos. Após descongeladas totalmente, com auxílio de uma ponteira 1000 $\mu$ l raspou-se o fundo de cada um dos poços a fim de remover quaisquer células que tenham permanecidas aderidas, homogeneizou-se a solução e por fim as mesmas foram transferidas para microtubos de 1,5mL, devidamente catalogados para o armazenamento das amostras. Após a organização das amostras foi realizada a extração de RNA total, com o kit MagMAX CORE Nucleic Acid Purification de maneira automatizada utilizando o Script AM1836 versão 2, através do equipamento MagMAX™ (Figura 10) seguindo as orientações do fabricante.

**Figura 10. Equipamento de extração automatizado de ácidos nucleicos MagMAX™.**



Fonte: (BIOSYSTEMS, 2008)

O procedimento da extração automatizada com o programa AM1836 versão 2 utiliza 6 placas no total, uma para a adição de amostras (placa 1), duas para a lavagem do RNA com a solução de lavagem 1 (placas 2 e 3), duas para a lavagem do RNA com a solução de lavagem 2 (placas 4 e 5) e uma para a eluição do RNA total (placa 6). Brevemente, foi preparada a primeira placa contendo 300 $\mu$ l de amostra e 400 $\mu$ l de Tampão de Lise, incubando essa solução por 10 minutos. Após este período foi adicionado 30 $\mu$ l de solução de beads magnéticas, homogeneizando cada amostra após a adição. Após o preparo da primeira placa, o RNA de cada amostra era transferido para a solução de lavagem 1 (150 $\mu$ l), nas placas 2 e 3. Posteriormente transferido para as placas 4 e 5, onde os poços de cada amostra continham 150 $\mu$ l de solução de lavagem 2. Finalmente, na placa 6 era adicionado aos poços referentes a cada uma das amostras 80 $\mu$ l de tampão de eluição. Após a eluição quantificou-se as amostras de RNA total no espectrofotômetro.

#### 4.8.3 Detecção Viral

Foi realizada uma reação de RT-PCR em tempo real (RT-qPCR) com cada amostra do ensaio, determinando a presença ou ausência dos RNA genômico AIV. As reações de RT-qPCR foram baseadas em sistema de sondas de hidrólises. As sequências dos oligonucleotídeos e sondas foram baseadas em estudos anteriores (WISE, M. G. et al., 2004; ZHANG, Z. et al., 2017). As sequências e as localizações dos oligonucleotídeos estão descritos na tabela 1.

As reações de RT-qPCR para detecção viral utilizaram o Kit Taqman® Fast vírus 1-Step Master Mix (Cat# 4444432 – Life Technologies, Foster City). Cada reação para detecção do RNA genômico do AIV possuía um volume total de 15µl, contendo 3,75µl do master mix (sendo a concentração 4x), 5,39 µl de água livre de nucleases, 0,3µl de cada oligonucleotídeo (20 pmol/µl) , 0,26 µl da sonda (20 pmol/µl ) e 5µl de amostra. A reação para detecção do vírus de influenza aviária foi realizada com um ciclo de 7 minutos e 30 segundos a 50°C para transcrição reversa, seguido por um ciclo de 20 segundos a 95°C para inativação da enzima RT e ativação da enzima Taq polimerase. Após essa etapa, foram efetuados 50 ciclos: 15 segundos a 95°C (desnaturação) e 1 minuto a 55°C (detecção e anelamento).

As reações foram realizadas no termociclador Roche *Light Cycler* 480II (Roche, Alemanha) tendo como ponto de partida os estudos nas quais foram descritas as condições para a amplificação de AIV (ZHANG, Z. et al., 2017). Os produtos de PCR foram analisados com o programa específico do equipamento.

**Tabela 2. Oligonucleotídeos e sondas utilizados para amplificação do material genético dos testes moleculares no RT-qPCR.**

Função	Gene alvo	Nome	Posição	Sequência	Referência
<b>Vírus</b>	AIV- NP	NP FP	1369– 1393	5'- ACCAGAAGATKTGTCMTTCCAGG G-3'	(ZHANG, Z. et al., 2017)
		NP P	1421– 1435	5'- FAM-AAGGCAACGAACCC- MGB -3'	
		NP RP	1473– 1498	5'- TACTCCTCCGCATTGTCTCCGAA G -3'	
<b>Controle interno</b>	<b>Gene HPRT</b>	HPRT1_F	538-560	5'- TGGTCAAAGAAGACTCCTCGAAGT- 3'	(STAINES et al., 2016)
		HPRT1_Pr obe	562-586	5'-FAM- TCCAACAAAGTCTGGCCGATATC CCA-BHQ-3'	
		HPRT1_R_	613-633	5'-TGTAATCGAGGGCGTATCCAA- 3'	
<b>Gene alvo</b>	<b>Gene ADAP2</b>	chADAP2F WD	900-919	5'-CCCCTGGATGCATTTCCAC-3'	Este estudo
		chADAP2V ER	1024- 1043	5'-AAAAAGTCTCTCGCTGGCGT-3'	

Fonte: Scagion, 2020



#### 4.8.4 Quantificação relativa da expressão gênica

Para a determinação da quantificação relativa foi quantificada a expressão do gene de referência medidas a expressão de um gene *housekeeping*, Hipoxantina guanina fosforibosiltransferase (HPRT), e do nosso gene de interesse ADAP2 (ArfGAP com duas plaquistrinas 2) utilizando primers já descritos na Tabela 2. A reação de RT-qPCR do HPRT utilizou o kit *Light Cycler 480 RNA Master Hydrolysis Probes* (cat. n.º 04991885001, Roche) que conteve 7,4µl do tampão da reação, 1,3 µl de *Activator*, 1µl de *Enhancer*, 2,8 µl água livre de nucleases, 1µl de cada oligonucleotídeo (senso e anti-senso, 20 pmol/µl), 0,5µl da sonda (10 pmol/µl) e 5µl de amostra, totalizando uma reação de 20 µl. Já para o ADAP2 foi utilizado um kit que continha *SYBR Green (EXPRESS One-Step SYBR® GreenER™)*, cat. n.º 11780-200,11780-01K, *Invitrogen*). A reação continha um volume total de 15µl, contendo 5 µl de *SuperMix Universal*, 3,55 µl de água livre de nucleases, 0,3 µl de cada primer (10 pmol/µl), 0,25 µl de enzima *EXPRESS Superscript*, e 5 µl de amostra. A ciclagem dessa reação foi feita com um ciclo de 7 minutos e 30 segundos a 50°C para transcrição reversa, seguido por um ciclo de 20 segundos a 95°C para inativação da enzima RT e ativação da enzima Taq polimerase. Após essa etapa, foram efetuados 50 ciclos: 15 segundos a 95°C (denaturação) e 1 minuto a 55°C (detecção e anelamento). Logo após a reação de PCR foi realizado a curva de dissociação de 45 a 90°C.

A eficiência da reação do gene ADAP2 foi determinada baseada em uma curva padrão. Esta curva padrão foi realizada através de diluições seriadas na base 10 de concentrações conhecidas do plasmídeo, em triplicata. Os valores foram expressos em *Cycle quantification (Cq)*, ou seja, o valor que a amostra atinge ao cruzar a linha *Threshold* determinada após o cálculo da eficiência de cada reação.

Os valores para corte foram calculados baseados na última diluição detectada na curva padrão  $+2*DP$  (desvio padrão). O teste foi considerado positivo quando houver detecção de fluorescência acima da linha *Threshold*, ou seja acima do ruído e o pico da curva de dissociação foi entre 81 a 83,6°C, portanto mesmo que haja detecção de fluorescência acima do ruído, mas a amostra estiver fora dos valores do pico da curva de dissociação esta é considerada negativa. Assim sendo, o teste foi considerado válido, quando todos os controles positivos forem dados como positivos e todos os negativos forem dados como negativos no teste.

#### 4.8.5 Análise dos dados da detecção

Os dados obtidos da detecção de AIV (H5N2 e H2N1), bem como dos genes ADAP2 e HPRT e seus respectivos Cq foram obtidos através do software do próprio equipamento *LightCycler 480 II* (Roche Diagnostics, Mannheim, Alemanha). Os cálculos para os genes virais foram realizados no software do equipamento *LightCycler 480 II*. Enquanto os demais cálculos para quantificação relativa, bem como a confecção dos gráficos foram realizados no Microsoft Excel 365 ProPlus. Como as eficiências dos dois primers são extremamente próximas utilizou-se o método  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001) para quantificação relativa.

Brevemente, primeiro foi calculado  $\Delta Cq$ ,  $\Delta Cq = Cq \text{ (gene de interesse)} - Cq \text{ (HPRT)}$ , para cada amostra. O Cq de 41 foi utilizado para calcular a expressão de AIV no grupo controle, uma vez que todas as amostras apresentaram Cq indeterminado por serem negativas. Para o próximo passo foi preciso definir nossas amostras de referência, no caso as amostras que não sofreram variação relativa aos tratamentos aplicados. Portanto, nossas amostras de referência foram o grupo MOCK para cada período de expressão 0h, 24h e 48h, dessa forma calculou-se a média do  $\Delta Cq_{MOCK}$  para esses diferentes momentos. Estes valores foram utilizados para calcularmos os  $\Delta\Delta Cq$ .

Sendo  $\Delta\Delta Cq = \Delta Cq \text{ (amostra tratada)} - \Delta Cq \text{ (MOCK)}$ , referentes a cada um dos períodos analisados. Por último, para calcularmos o quanto a expressão genica variou, utilizou-se a seguinte fórmula sendo **Varição da expressão genica =  $2^{-\Delta\Delta Cq}$** , isso foi realizado para cada amostra. Após obtermos a variação da expressão genica das amostras, realizou-se cálculos de média, desvio padrão e o erro padrão para cada um dos diferentes tratamentos, nos diferentes períodos de expressão construindo gráficos com a função logarítmica das diferentes expressões. Amostras que apresentaram variação  $\pm 3$  Cqs de HPRT dentro do mesmo período e tratamento, foram excluídas dos cálculos finais.

#### 4.9 Análise estatística

Ao obtermos as informações sobre os Cq dos genes analisados, verificamos se havia variação estatística dentro Cq do nosso *housekeeping* gene HPRT, entre as

amostras tratadas e não tratadas. Foi detectado que não havia diferença estatística pelo teste T student entre as médias com o p-valor 0,05.

Ao fim, foi realizado o teste T de student pareado entre os diferentes grupos de tratamentos e as células não tratadas (MOCK) de cada janela de tempo, p-valor foi 0,05.

#### 4.10 Microscopia confocal

Em todos os experimentos,  $1 \times 10^5$  células DF-1 por poço, foram semeadas em placas de 24 poços contendo lamínulas (12 x 0,11 mm), que foram previamente esterilizadas com álcool 70 e depois lavadas com água Milli-Q. Após alcançarem 50% de confluência os poços foram transfectados com um, dois ou três dos plasmídeos descritos acima, de modo ao total de material genético inserido nas células contidas em cada poço não ultrapassasse 750ng por poço. Após transfectadas esperou-se 48h para recuperação das células e expressão das proteínas de interesse. Assim, estas células foram lavadas com PBS e fixadas com paraformaldeído a 4% seguido por permeabilização com Triton X-100 a 0,1% diluído em PBS a 0°C.

Lavadas com PBS novamente e incubadas com os anticorpos primários indicados acima diluídos 1: 1000 em solução de PBS/BSA (0,5% de albumina bovina sérica, BSA, diluída em PBS), durante 2 h a temperatura ambiente. Após o período de incubação, foram realizadas 3 lavagens com 5 minutos cada solução PBS/BSA. Após o bloqueio, as células foram incubadas com anticorpos secundários diluídos 1: 500 em PBS/BSA durante 1 h a temperatura ambiente. Após, lavadas novamente como descrito acima e depois incubadas com 4', 6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) diluído 1: 10000 em água deionizada por 10 minutos, e lavado novamente como descrito acima, porém com água deionizada. Após esse processo, as lamínulas eram retiradas das placas de 24 poços e transferidas para lâminas para montagem com *Vectashield* (*Vector Laboratories*) e selagem das lamínulas com esmalte incolor. As imagens das lâminas foram capturadas usando microscópios confocal *Leica SP5* (*Leica microsystems*, Mannheim – Germany) e analisadas, contrastadas e fundidas usando o software do microscópio.

#### 4.11 Co-Imunoprecipitação (co-IP)

#### 4.11.1 Soluções

Para realização do co-IP foi necessário o preparo prévio de algumas soluções e reagentes como:

RIPA (150mMol de NaCl, 50mM Tris-HCl pH 8.0, 1% NP40 ou 1% IGEPAL, 0,5% Deoxycholate, 0,1% SDS e água deionizada),

Proteínas G sepharose (Amersham, Cl-48). Para prepará-las, na solução 50% v/v de proteína G que foi utilizada na reação de imunoprecipitação. Após pesada a quantia necessária (1g gera de 4 a 5 mL de 50% v/v de proteína G). Ressuspendeu-se o pó em água destilada, prosseguindo com uma nova ressuspensão da suspensão da resina em 20% de volume de etanol, centrifugou-se em 500 RPM por 30 segundos. Descartou-se o sobrenadante e adicionou-se 50% de volume água deionizada, misturou-se gentilmente com leve toques com os dedos no tubo, centrifugou-se novamente descartando o sobrenadante, e repetindo o processo por mais três vezes. Seguida por uma última lavagem com RIPA e ressuspendeu-se no RIPA adicionando 50% do volume do tampão.

- Tampão de corrida 1x (25mMol de Tris, 190mMol Glicina, 0,1%SDS pH 8,3).
- 1x Tampão de transferência (25mMol de Tris, 190mMol Glicina, 20% metanol pH 8,3).
- 0,1% Tris-buffered salino com Tween-20 (TBST 20mMol Tris, pH7,5, 150mMol NaCl, 0,1%Tween 20).
- Gel de empilhamento: 4,1 mL de água deionizada, 1mL 30% de acrilamida mix, 0,75mL Tris-Cl (1Mol, pH 6,8), 0,06mL SDS 10%, 0,06mL persulfato de amônio 10%, 0,006mL TEMED, totalizando um volume de 6mL.
- Gel de revelação: 5,9 mL de água deionizada, 5 mL 30% de acrilamida mix, 3,8mL Tris-Cl (1Mol, pH 6,8), 0,15mL SDS 10%, 0,15mL persulfato de amônio 10%, 0,006mL TEMED, totalizando um volume de 15mL.
- Solução de Bloqueio, 2,5g de leite desnatado 50mL Tween 20 TBST, q.s.p.

#### 4.11.2 Preparo das amostras

Para experimentos de co-IP,  $1 \times 10^6$  células de DF-1 foram semeadas por poço, em placas de 6 poços 24h antes da transfecção. As células foram mantidas em estufa com 5% CO<sub>2</sub> a 37°C até atingirem de 70 a 80% de confluência.

As células DF-1 foram transfectadas, com as diferentes duplas de –V5 e –FLAG como descritas na Tabela 3, cada poço recebeu 2000 µg de material genético, sendo a cada 1 µg DNA foi usado 3µl de lipofectamina. A transfecção ocorreu como descrito no item Plasmídeo e transfecção, seguindo as proporcionalidades da área transfectada, sendo utilizada 500 µl de solução de transfecção.

**Tabela 3. Plasmídeos utilizados na transfecção para o ensaio de co-imunoprecipitação utilizados a 1000 ug por poço.**

Plasmídeos	Tipo	PESO <sup>1</sup>
chADAP2-V5	Teste	43,89 kDa <sup>2</sup>
chMAVS- FLAG	Teste	68,87 kDa <sup>2</sup>
Vazio-FLAG	Controle Negativo	1,01 kDa <sup>3</sup>
Vazio-V5	Controle Negativo	1,42 kDa <sup>3</sup>
chLGP2-FLAG	Controle Positivo	78,05 kDa <sup>2</sup>
BCV-V5	Controle Positivo	37,42 kDa <sup>4</sup>

**Legenda:** 1) Peso em quilo Daltons (kDa), inclui o peso da tag. 2) Peso da proteína foi obtida no site UNIProt.(CONSORTIUM, T. U., 2018; MORGAT et al., 2019) 3-) Peso das Tags FLAG (DYKDDDDK,1,01 kDa) e V5 (GKPIPPLLGLDST, 1,42 kDa)(LIFE SCIENCE, 2020) 4) Peso da proteína viral obtida na literatura (SAMSON; LEVESLEY; RUSSELL, 1991).

Fonte: Scagion, 2020

Após 48h de expressão, as células foram colocadas em gelo e lavadas duas vezes com PBS a 4°C. Removeu o PBS e adicionou-se 500 µl de RIPA com 1x de inibidor de protease (Promega, cat. N.º G6521) a 4°C, com um auxílio de um *cell scraper* raspou-se as células de cada poço, passando essa solução de células lisadas através de uma agulha de seringa com 25G por pelo menos seis vezes, após este processo lavou o poço novamente com 200µl de RIPA repetindo o processo descrito acima, por fim combinando as duas soluções.

As soluções de células lisadas foram centrifugadas por 1200 rpm por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo microtubo, e a obteve a solução denominada lisado total. Para aumentar a recuperação de proteínas, o pellet deixado

no microtubo anterior foi ressuspendido com um pequeno volume de RIPA com 1x de inibidor a 4°C, repetindo o processo de centrifugação e por fim combinando com o respectivo sobrenadante. Durante este passo o lisado total foi armazenado em freezer -80°C.

Adicionou-se 1µL de anticorpo anti FLAG a 500 µL de lisado total, sendo incubado agitador/ homogeneizador de tubos a 4°C por 2 horas. Após este período, adicionou-se 30 µL 50% v/v de proteína G sendo incubado no agitador/ homogeneizador a 4°C por 4 hora. Centrifugou esta solução a 3000 RPM por 30 segundos, descartou-se o sobrenadante, lavando o pellet contendo o complexo imunológico de interesse com 500 µL RIPA com 1x de inibidor a 4°C, repetindo o processo de centrifugação e lavagem por mais 3 vezes. O pellet foi removido com o auxílio de uma agulha de 25G e ressuspendido com as *beads*, tampão de carregamento Laemmli's 2x (Biorad, cat. n.º 1610747) e 10% β- mercaptoetanol. Antes da aplicação em gel as amostras foram fervidas por 2 minutos.

#### 4.11.3 Eletroforese de Gel SDS-Page

As soluções dos géis de empilhamento e revelação foram preparadas, 5µl de ladder (Kaleidoscope Standards #1610375, 10kDa-250kDa) foi aplicado no primeiro poço e 15µl das amostras nos poços seguintes. Após a aplicação das amostras, realizou-se a eletroforese com 100V durante 60 minutos. Ao final da reação, transferiu-se o gel para tampão de transferência durante 10 a 15 minutos para equilibrá-lo.

#### 4.11.4 Western Blotting

As interações proteicas foram testadas por *Western Blot*. Assim, as proteínas que foram separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), foram transferidas para membranas de nitrocelulose através do Trans-Blot Turbo, utilizando o programa Mixed MW duas vezes.

Após finalizada a transferência, a membrana foi mergulhada na solução de bloqueio, *overnight* a TA e deixada em um agitador basculante. No dia seguinte, retirou-se a solução de bloqueio e adicionou-se uma nova contendo os anticorpos primários (anti-V5) em uma proporção 1:1000, por 6 horas a TA em um agitador basculante.

Após este passo a membrana foi lavada 4 vezes com 0,1%TBST com Tween 20 por 10 minutos cada a TA. Por último, adicionou-se solução de bloqueio com anticorpos secundários anti-coelho na proporção 1:10000, incubando-se por 45 minutos a TA no escuro. A membrana foi lavada 4 vezes com 0,1%TBST com Tween 20 por 10 minutos cada a TA, no escuro. Dessa maneira as imagens puderam ser visualizadas e analisadas no programa do equipamento Odyssey CLx Imager (LI-COR Biosciences UK Ltd. -Cambridge /United Kingdom).

#### 4.12 Ensaio para detecção de capacidade antiviral

Para avaliar a capacidade antiviral de chADAP2, placas de 24 poços contendo lamínulas (12 x 0,11 mm) foram preparadas previamente com  $2 \times 10^5$  células DF-1. Quando estas atingiram uma confluência de 60%, metade dos poços foi transfectadas com o plasmídeo do gene ADAP2-V5, com 650 ng de DNA por poço e a outra metade foi utilizada como grupo controle.

Vinte quatro horas após a transfecção, todas as células DF-1, transfectadas e não transfectadas foram infectadas com AIV (H9N2) a um MOI de 1, com um período de adsorção de 3 horas. O vírus não ligado foi removido por lavagem com meio de cultura e após este procedimento as células foram mantidas em estufa com 5% CO<sub>2</sub> a 37° C por 48h.

Após este período, foi realizado uma marcação indireta com anticorpos contendo fluoróforos descritos acima e prosseguiu-se com a análise das imagens, a qual foi realizada por microscopia confocal, com as células contidas em cada poço como descrito no item Microscopia confocal.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Caracterização molecular pelas análises de bioinformática

As informações disponíveis em diversos bancos de dados sobre a proteína ADAP2 foram analisadas em relação às semelhanças entre as informações das proteínas produzidas em aves e em mamíferos. Arquitetura genômica juntamente com o loci relativos em torno do gene ADAP2 presente em frangos, patos, camundongos

e humanos são observadas na Figura 11A. Em geral os genes que flanqueiam o ADAP2 são semelhantes nas quatro espécies analisadas com pequenas diferenças, como por exemplo o gene *Tefm* localizado anteriormente ao ADAP2 em camundongos e mamíferos, que está ausente nas duas aves.

Apesar de todas as espécies analisadas possuírem os genes ATAD5 e CRLF3. O RNF135, anteriormente conhecida como Riplet, está ausente em galinhas, presente nos dois mamíferos analisados e a sua presença em patos ainda está sendo averiguada, sendo identificada na Figura 11A como ENSAPLG 00000006987.

Na região sintênica apontada na Figura 11A, percebe-se uma variação estrutural no cromossomo 17 dos humanos, quando comparado com as outras 3 espécies. Este fato foi evidenciado pelo cromossomo humano ter apresentado um pseudogene de SUZ12 próximo do ADAP2, além do gene que realmente expressa o SUZ12 localizado no mesmo cromossomo 11, porém em uma outra região (cromossomo humano 17: 31,895,174-31,955,978) onde encontram-se genes como UTPS6 anterior a ele e após ao SUZ12 temos RHOT1, RHBDL3, ZNF207 e C17orf75 visualizados aqui nas outras espécies. Em galinhas, o gene RHOT1 é vizinho de ADAP2 (Figura 11A).

Uma representação esquemática comparando o tamanho da proteína ADAP2 com seus principais domínios Arf-GAP e as duas plaquistrinas (PH-like) demonstrou variação entre as espécies analisadas (Figura 11B). A proteína ADAP2 de patos apresentou o maior tamanho 432 aminoácidos (aa). Já a sequência de aminoácido de galinha apresentou 364 aa e as sequências dos dois mamíferos um pouco maior com 381 aa.

Os domínios Arf-GAP e PH-like apresentaram diferenças de tamanho e distribuição dos domínios, desta maneira foi avaliado ao longo das sequências dos aa das 4 espécies analisadas. Dessa maneira, os aa dos diferentes domínios (Arf-GAP, PH1 e PH2) da proteína ADAP2 foram separados e alinhados, sendo apresentados na

Figura 12. As quatro espécies também apresentaram diferenças nas sequências de seus domínios, sendo a PH1 a mais conservada com 70 aa idênticos nas quatro sequências, seguida por Arf-GAP com 64 aa idênticos e PH2 sendo o domínio mais variável com 51 aa idênticos.



Na

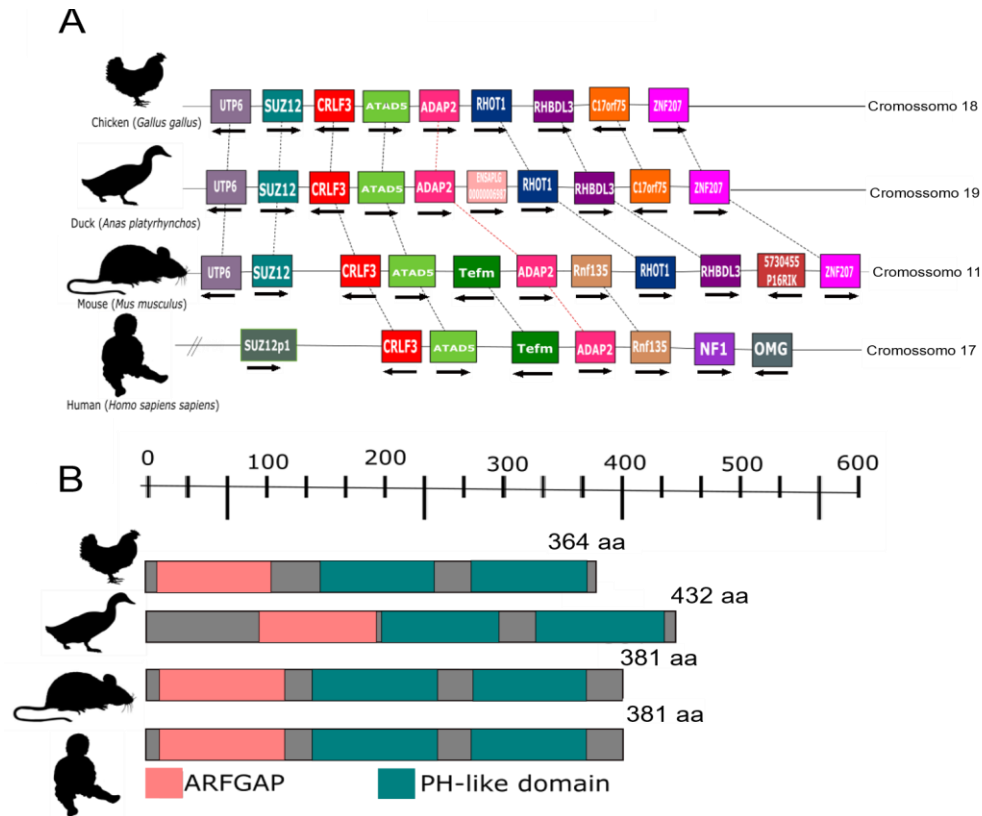
Figura 12A, pode-se observar que o primeiro aa do domínio Arf-GAP é uma lisina (K) em todas as espécies com exceção de patos, que tem como primeiro aa do domínio uma cisteína (C), com uma região de 18 aa a menos quando comparado com galinha e 19 aa a menos quando comparado com camundongos e humanos, esta região possui a seguinte sequência K \* - LLEL\* \* \* - - GNGRCAD, onde asterisco (\*) são os sítios em que os aa variam e o traço (-) representam deleções ou adição de aa nas sequências. Contudo, o domínio Arf-GAP não é o único que possui uma região deletada. O segundo domínio de plaquistrina (

Figura 12C), presente em galinha apresenta 8 aa a menos quando comparado às demais sequências, o motivo NYVKEGYM está presente na sequência de patos enquanto um motivo NYLKQGFm se apresenta conservado em mamíferos.

Ao longo de todos os três domínios foram observadas variações, sendo algumas como já foram relatadas, classes específicos, sendo o domínio PH2 com maior número de variações conservadas por classe com 20 aa, seguido por Arf-GAP com 16 aa e por último o domínio mais conservado da proteína ADAP2, PH1 com 10 aa classe-específicos. Por fim, os domínios Arf-GAP, PH1 e PH2 de galinha foram analisados no MEGA7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016) usando o modelo baseado em matriz JTT (JONES; TAYLOR; THORNTON, 1992), afim de acessarmos o valor da homologia entre as diferentes sequências dos domínios, em patos a homologia foi de 89%, 91% e 83%, respectivamente. Enquanto ao compararmos os domínios Arf-GAP, PH1 e PH2 de galinhas e humanos, foi apresentada uma homologia de 39%, 63% e 19%, respectivamente (

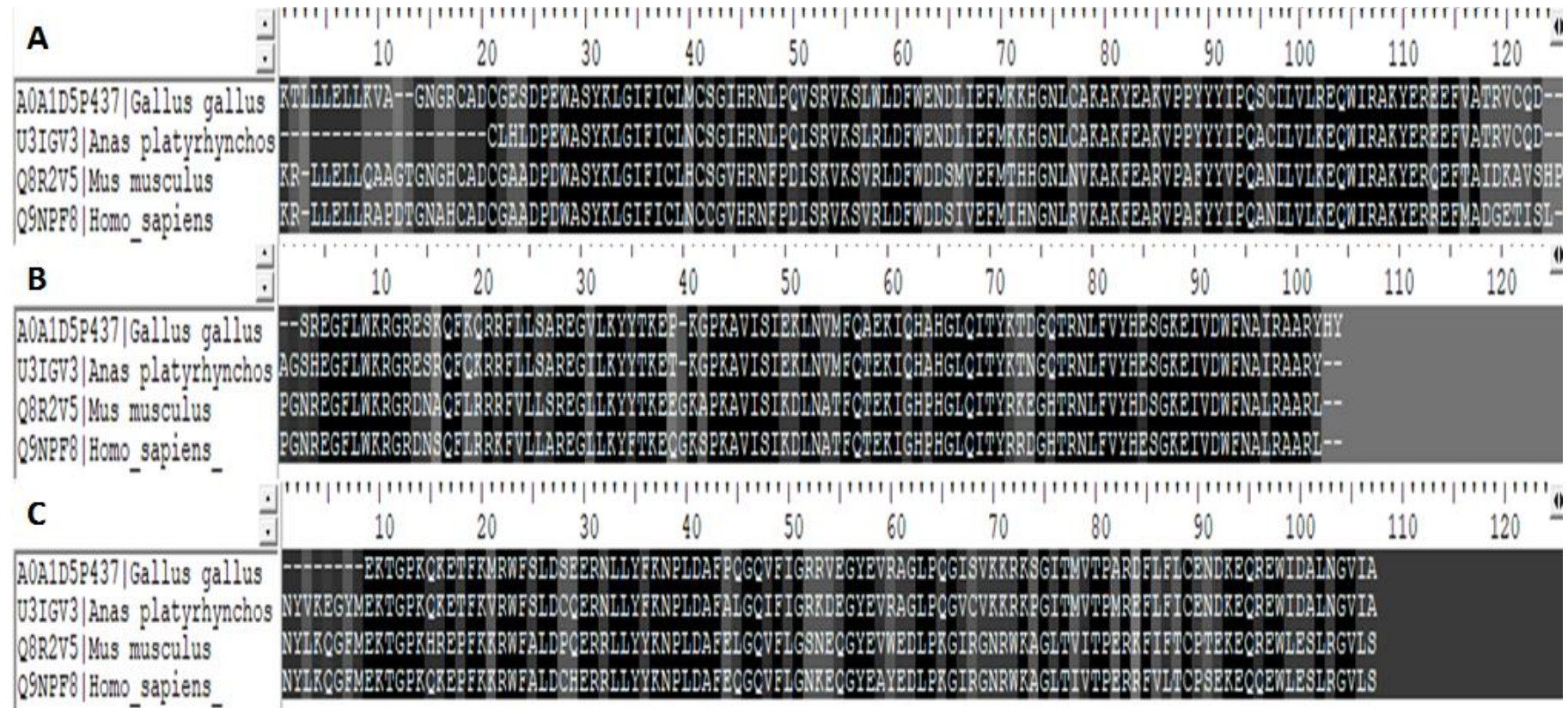
Quadro 2).

Figura 11. Comparação entre as seqüências de aminoácidos ADAP2 de aves e mamíferos.



**Legenda:** A) Arquitetura genômica juntamente com loci relativos em torno do gene ADAP2 de galinha, pato, camundongo e humano. B) Esquema da estrutura primária da proteína ADAP2 mostrando o tamanho e os domínios ArfGAP e PH que compõem a proteína nas quatro diferentes espécies. Abreviações de genes usadas na figura: **UTP6**, Small Subunit Processome Component, **SUZ12**, Polycomb Repressive Complex 2 Subunit, **CRLF3**, Cytokine Receptor Like Factor 3, **ATAD5**, ATPase Family, AAA Domain Containing 5, **TEFM**, Transcription Elongation Factor Mitochondrial, **ADAP2**, ArfGAP With Dual PH Domains 2, **RHOT1**, Ras Homolog Family Member T1, **RNF135**, Ring Finger Protein 135, **RHBDL3**, Rhomboid Like 3, **C17orf75**, Chromosome 17 Open Reading Frame 75, **ZNF207**, Zinc Finger Protein 207, **SUZ12P1**, Polycomb Repressive Complex 2 Subunit Pseudogene 1, **NF1**, Neurofibromin 1, **OMG**, Oligodendrocyte Myelin Glycoprotein. Fonte: Scagion, 2020

**Figura 12** Comparação das seqüências de aminoácidos dos diferentes domínios de ADAP2



**Legenda:** Alinhamento da seqüência de aminoácidos de ADAP2 em galinha, pato, camundongo e humano. A) Domínio Arf-GAP. B) Domínio PH-like um. (C) Domínio PH-like dois. As diferentes tonalidades do preto ao cinza claro, indicam o quão conservado este aa é nas quatro sequencias analisadas, sendo quanto mais escuro mais conservado o aa daquele sítio. Fonte: Scagion, 2020.

Sequências de aminoácidos de espécies das mesmas classes foram mais similares entre si, portanto foi construída uma árvore filogenética incluindo as sequências da proteína ADAP2 disponíveis de aves, mamíferos e répteis. Para avaliar se as sequências da mesma classe continuariam a ser mais semelhantes. As sequências foram divididas em dois grandes grupos, um formado por mamíferos e outro por aves e répteis (Figura 13). Como esperado as sequências referentes à classe Reptilia foram agrupadas em um cluster separado das sequências das aves.

A sequência de *Gallus gallus*, apresentou uma maior identidade com os demais membros da família dos Galiformes apresentando 87% de identidade do grupo (Figura 13), o grupo mais próximo destes os dos Anseriformes, sendo que *Gallus gallus* e *Anas platyrhynchos* apresentaram as menores similaridades com uma identidade de 96% (Quadro 3). A sequência de *Gallus gallus* apresentou identidade de 60% quando comparada com a de *Alligator mississippiensis* (Quadro 3). Enquanto as sequências que apresentaram as menores identidades genética com *Gallus gallus*, de apenas 23% e 30% foram as sequências de *Pteropus vampyrus* e a *Homo sapiens*, respectivamente (Quadro 3).

**Quadro 2. Estimativas de identidade entre seqüências de aminoácidos do dos diferentes domínios do gene ADAP2.**

		Arf-GAP				PH1				PH2			
Espécies		1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4
1	A0A1D5P437 Gallus gallus		0,04	0,12	0,13		0,03	0,09	0,09		0,05	0,15	0,16
2	U3IGV3 Anas platyrhynchos	89%		0,12	0,13	91%		0,09	0,08	83%		0,14	0,15
3	Q8R2V5 Mus musculus	41%	46%		0,05	61%	61%		0,03	19%	22%		0,05
4	Q9NPF8 Homo sapiens	39%	46%	82%		63%	63%	90%		19%	20%	80%	

**Legenda:** As estimativas de erro padrão são mostradas na parte superior da diagonal. As análises foram conduzidas usando o modelo baseado em matriz JTT (JONES; TAYLOR; THORNTON, 1992). A variação da taxa entre sites foi modelada com uma distribuição gama (parâmetro de forma = 1). A análise envolveu 4 seqüências de aminoácidos, dividida em 3 domínios totalizando 12 regiões. Todas as posições com menos de 95% de cobertura do site foram eliminadas. Ou seja, menos de 5% de intervalos de alinhamento, dados ausentes e bases ambíguas foram permitidos em qualquer posição. Foi observado um total de 103 posições para o domínio Arf-GAP, seguido por 99 posições para os domínios PH1 e PH2 no conjunto de dados final. As análises evolutivas foram realizadas no MEGA7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016).

Fonte: Scagion, 2020

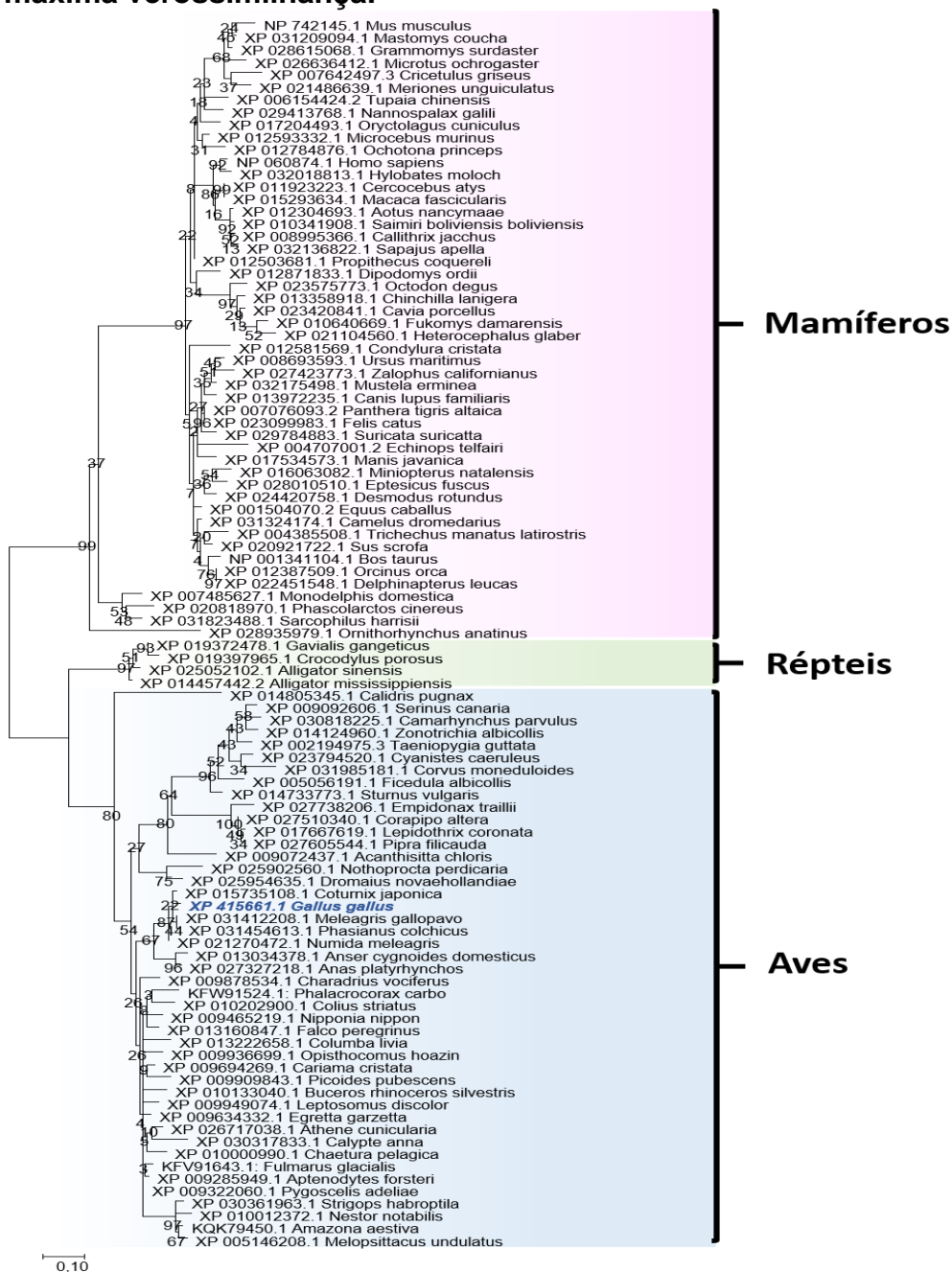
**Quadro 3. Estimativas de distâncias genéticas entre sequências de aminoácidos do gene ADAP2.**

Ordem	Nomes das Sequências	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Aves	1 XP 027327218.1 <i>Anas platyrhynchos</i>		0,02	0,03	<b>0,03</b>	0,02	0,05	0,09	0,08	0,08	0,10	0,09	0,08
	2 XP 009285949.1 <i>Aptenodytes forsteri</i>	0,11		0,02	<b>0,03</b>	0,02	0,05	0,09	0,08	0,09	0,10	0,09	0,09
	3 XP 013222658.1 <i>Columba livia</i>	0,14	0,07		<b>0,03</b>	0,03	0,06	0,09	0,08	0,09	0,10	0,09	0,09
	<b>4 XP 415661.1 <i>Gallus gallus</i></b>	<b>0,14</b>	<b>0,14</b>	<b>0,17</b>		<b>0,01</b>	<b>0,06</b>	<b>0,09</b>	<b>0,08</b>	<b>0,09</b>	<b>0,10</b>	<b>0,09</b>	<b>0,09</b>
	5 XP 021270473.1 <i>Numida meleagris</i>	0,12	0,12	0,16	<b>0,04</b>		0,06	0,09	0,09	0,09	0,10	0,09	0,09
Répteis	6 XP 019349919.1 <i>Alligator mississippiensis</i>	0,38	0,37	0,39	<b>0,40</b>	0,41		0,08	0,08	0,08	0,09	0,08	0,08
Mamíferos	7 NP 060874.1 <i>Homo sapiens</i>	0,65	0,69	0,74	<b>0,70</b>	0,72	0,61		0,03	0,01	0,04	0,02	0,03
	8 XP 024420758.1 <i>Desmodus rotundus</i>	0,60	0,61	0,65	<b>0,64</b>	0,65	0,56	0,13		0,03	0,03	0,03	0,03
	9 XP 024206441.1 <i>Pan troglodytes</i>	0,63	0,67	0,72	<b>0,68</b>	0,70	0,60	0,01	0,14		0,04	0,01	0,03
	10 XP 023386146.1 <i>Pteropus vampyrus</i>	0,72	0,76	0,82	<b>0,77</b>	0,80	0,68	0,19	0,15	0,19		0,04	0,04
	11 XP 014974479.2 <i>Macaca mulatta</i>	0,63	0,67	0,72	<b>0,68</b>	0,70	0,60	0,04	0,14	0,03	0,19		0,03
	12 NP 742145.1 <i>Mus musculus</i>	0,60	0,66	0,70	<b>0,65</b>	0,68	0,59	0,18	0,17	0,18	0,21	0,17	

**Legenda:** As análises foram conduzidas usando o modelo baseado em matriz JTT (JONES; TAYLOR; THORNTON, 1992). A variação da taxa entre sites foi modelada com uma distribuição gama (parâmetro de forma = 1). A análise envolveu 12 sequências de aminoácidos. Todas as posições com menos de 95% de cobertura do site foram eliminadas. Ou seja, menos de 5% de intervalos de alinhamento, dados ausentes e bases ambíguas foram permitidos em qualquer posição. Foi observado um total de 232 posições no conjunto de dados final. As análises evolutivas foram realizadas no MEGA7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016).

Fonte: Scagion, 2020

**Figura 13. Análise molecular filogenética do gene ADAP2 pelo método da máxima verossimilhança.**



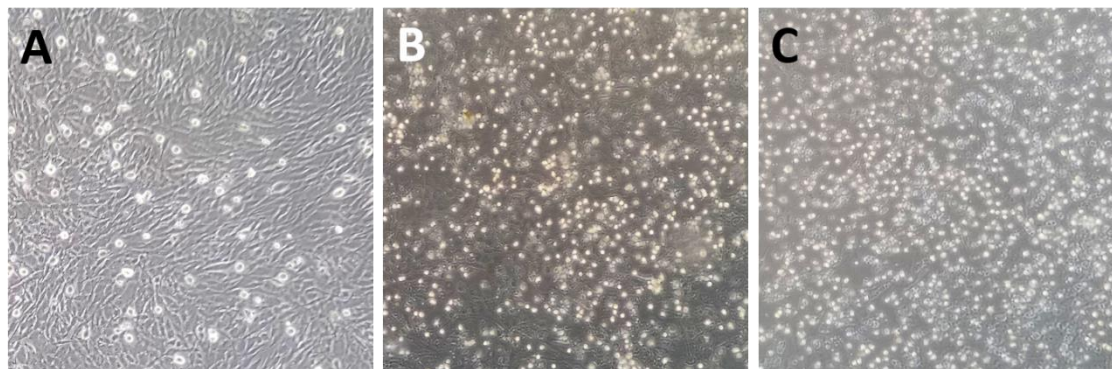
**Legenda:** A história evolutiva foi inferida usando o método de máxima verossimilhança, baseado no modelo baseado em matriz JTT (JONES; TAYLOR; THORNTON, 1992). A árvore com a maior probabilidade de log (-3940,83) é mostrada. A porcentagem de árvores nas quais a taxa associada se agrupou é mostrada ao lado dos galhos. As árvores iniciais para a pesquisa heurística foram obtidas automaticamente aplicando os algoritmos Neighbor-Join e BioNJ a uma matriz de distâncias em pares estimadas usando um modelo JTT e, em seguida, selecionando a topologia com valor de probabilidade de log superior. A análise envolveu 99 sequências de aminoácidos. Todas as posições com menos de 95% de cobertura do site foram eliminadas. Ou seja, menos de 5% de intervalos de alinhamento, dados ausentes e bases ambíguas foram permitidos em qualquer posição (FELSENSTEIN, 1985). Havia um total de 137 posições no conjunto de dados final. As análises evolutivas foram realizadas no MEGA7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016).

Fonte: Scagion, 2020

## 5.2 Quantificação da expressão de ADAP2 em células DF-1 após a infecção viral

Após a multiplicação do vírus, o líquido alantoide (LA) do vírus H5N2 LPAI e do vírus H2N1 LPAI apresentaram 64 unidades hemaglutinantes (HAU) e 128 HAU, respectivamente. As células DF-1 infectadas com ambos os vírus apresentaram arredondamento e morte celular (Figura 14A-C). A titulação viral dos vírus H5N2 e H2N1 nas células foi de 6,34 e 6,67 log de 50% de doses infectantes médias em cultivo celular por mL ( $\log_{10}TCID_{50}/mL$ ), respectivamente.

**Figura 14. Cultivo celular DF-1 visualizado no microscópio de luz com contraste de fase 48h pós infecção (aumento 400x).**



**Legenda:** A) Células DF-1 não infectadas, B) Células DF-1 infectadas com H5N2. C) Células DF-1 infectadas com H2N1.

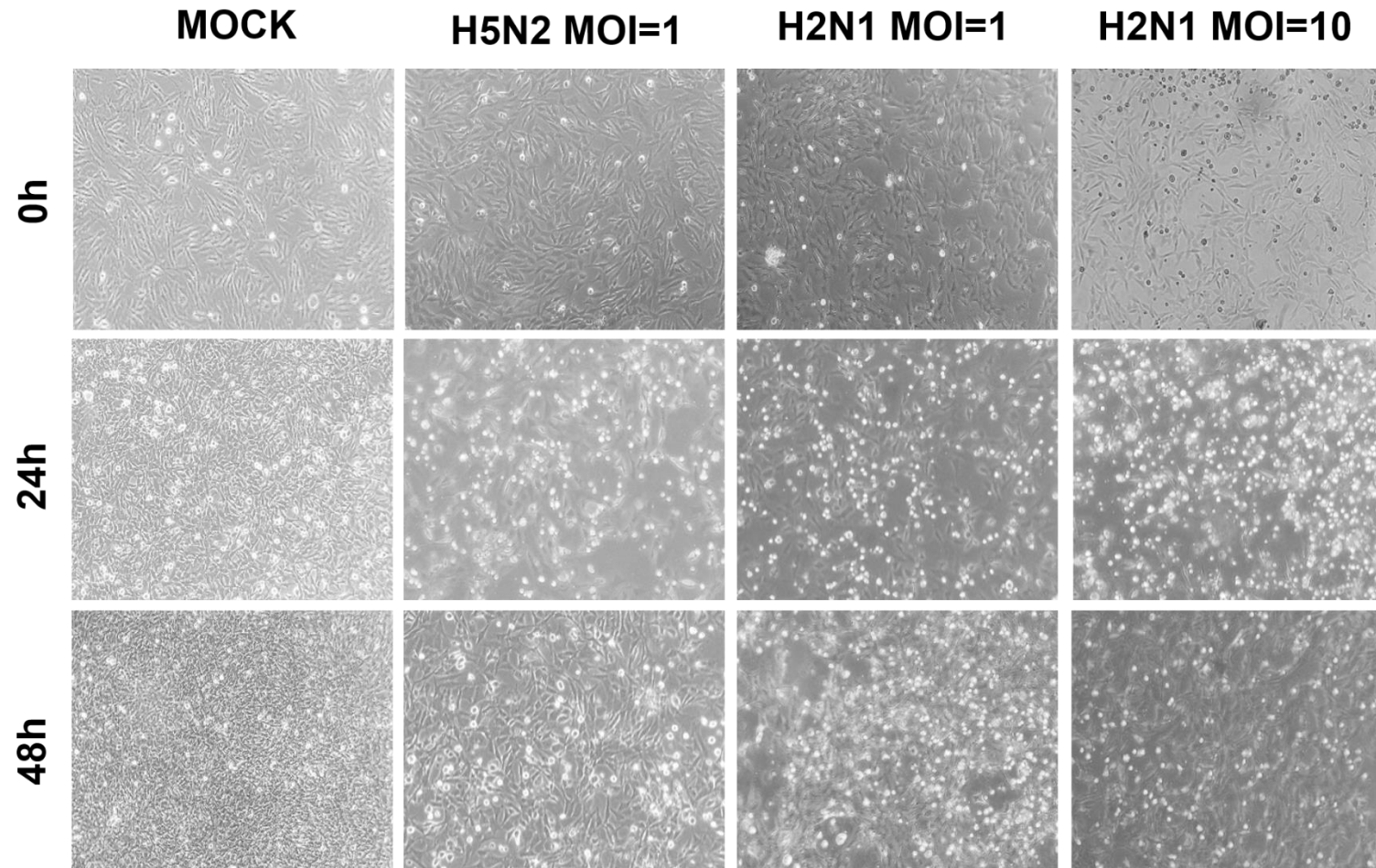
Fonte: Scagion, 2020

Não se observou no microscópio de luz nenhuma diferença nas células não tratadas (MOCK) e as células infectadas no início do experimento (0h) para a quantificação da expressão de ADAP2 em células DF-1 (Figura 15). Após 24h de infecção, as células infectadas com H5N2 MOI=1 e H2N1 MOI=1 apresentaram um ligeiro aumento de morte celular ao compará-las com as células MOCK. Contudo, o efeito H2N1 MOI=10 apresentou um aumento de morte celular bem mais pronunciado e um arredondamento mais evidente neste período (Figura 15).

As células infectadas com H5N2, parecem ter recuperado a forma fibroblástica normal, no intervalo de 24 a 48 horas (Figura 15). Já as células infectadas com H2N1 MOI=1 apresentaram arredondamento e morte celular bem mais acentuado após 48h, enquanto H2N1 MOI=10 apresentou uma recuperação das células, contudo menos acentuada que a de H5N2.



Figura 15. Células DF-1 não infectadas e após infecção com diferentes vírus (H5N2 e H2N1) com diferentes concentrações virais (MOI=1 ou 10) após 0h, 24h e 48h observadas no microscópio de luz com contraste (aumento 400x).

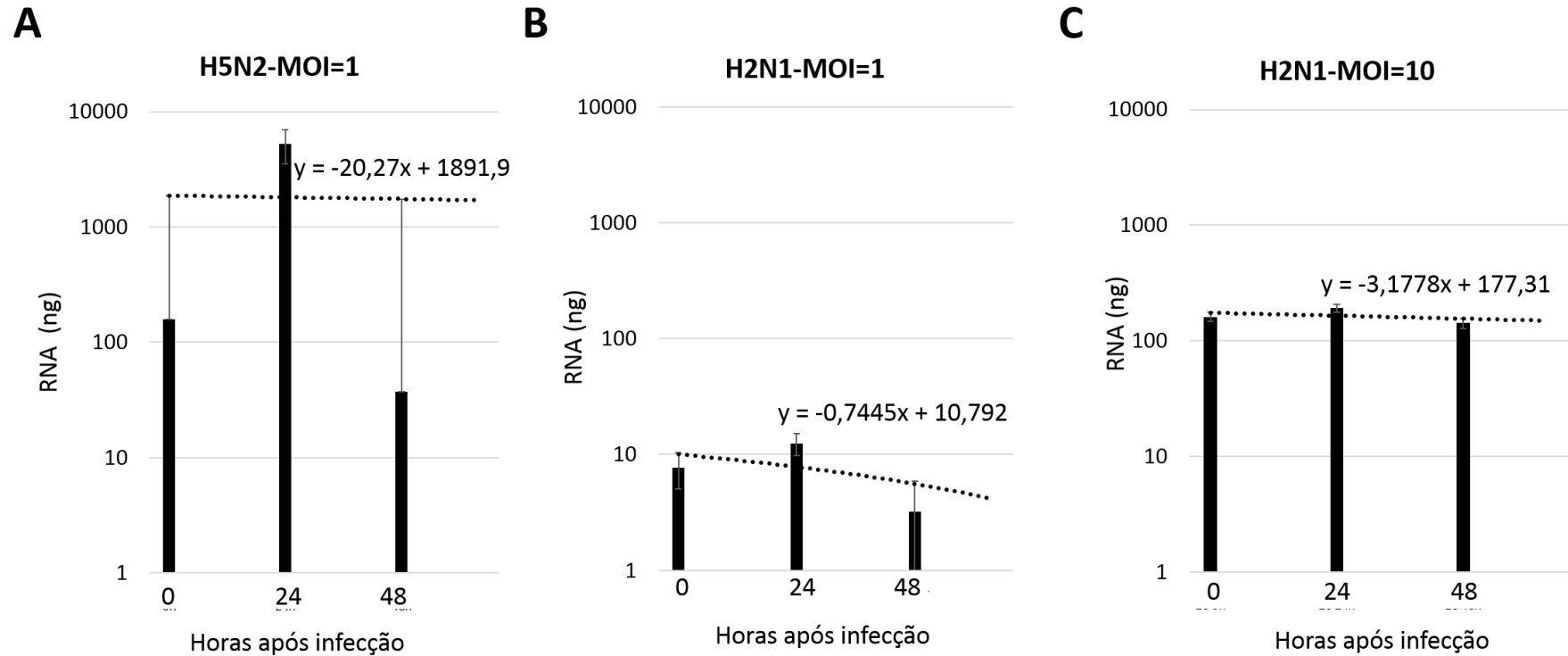


Fonte: Scagion, 2020

A detecção AIV por RT-qPCR foi realizada em todas as amostras após os diferentes tratamentos. Como o esperado, não foi detectado RNA do AIV nas células do grupo MOCK, enquanto as células infectadas com os vírus H5N2 e H2N1 nas diferentes concentrações, foram positivas.

A maior concentração de RNA viral foi detectada nas culturas infectadas com o vírus H5N2 com a concentração de MOI-1. Estas células apresentaram concentrações em escala logarítmica de  $10^{2,2}$ ,  $10^{3,7}$  e  $10^{1,6}$  ng de RNA viral em 0, 24 e 48 horas após a infecção (Figura 16A). Sendo o pico no período de 24h com um Cq médio (Cqm) de 16,5. A concentração detectada após a infecção com o vírus H2N1 de MOI-1 variou em torno de 10 ng durante todo o período com uma concentração um pouco maior em 24h após a infecção (Figura 16B), com um maior Cqm de 27,4 no período de 48h. Já as células infectadas com o vírus H2N1 com MOI-10 apresentaram a concentração em torno de 100ng durante todo o período (Figura 16C), com as concentrações em escala logarítmica de  $10^{2,21}$ ,  $10^{2,28}$  e  $10^{2,15}$  ng de RNA viral no período pós infecção de 0, 24 e 48 horas.

Figura 16. Variação da concentração RNA viral (ng) ao longo dos diferentes períodos dos experimentos.



**Legenda:** A) Quantificação de RNA detectado do LPAIV subtipo H5N2, B) Concentração de RNA detectado do LPAIV subtipo H2N1 com MOI=1 e C) Concentração de RNA detectado do LPAIV subtipo H2N1 com MOI=10.

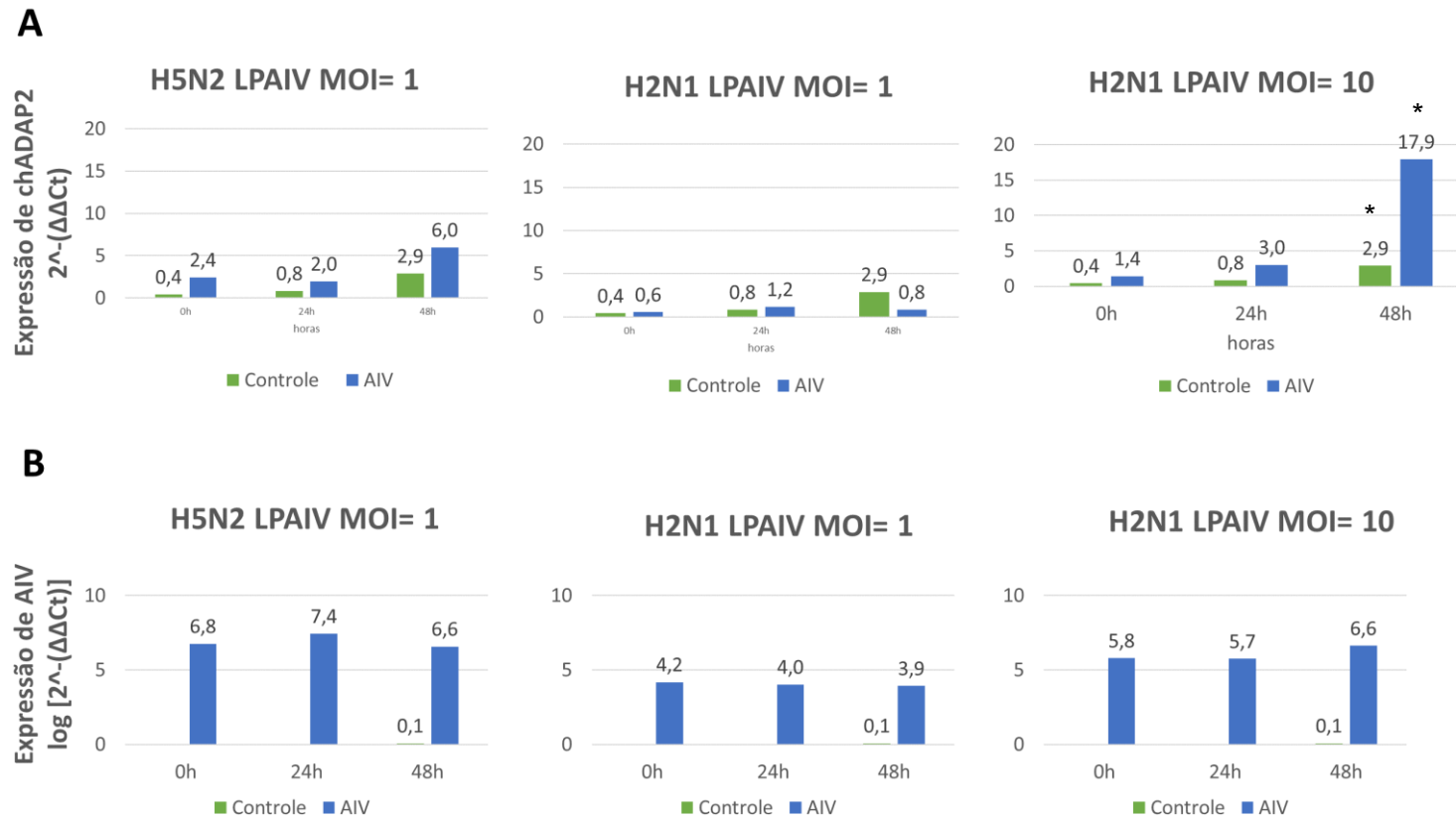
Fonte: Scagion, 2020

A curva padrão com os primers específicos para o gene ADAP2 apresentou uma eficiência no valor de 105% com um slope de -3,31. A detecção dos genes HPRT, chADAP2, NP de AIV de todas as amostras, e as suas informações da quantificação estão contidas no Apêndice 1 Quadro 5 e Quadro 6.

Nas células infectadas com AIV de baixa patogenicidade foi observado um padrão de aumento da expressão gênica do chADAP2 mesmo que sutil nas células infectadas tanto com o vírus H5N2 quanto com o vírus H2N1, quando comparadas às células não infectadas (Figura 17A). As células infectadas com o vírus H5N2 apresentaram um aumento de 2,4; 2 e 6 na expressão do gene ADAP2 em comparação ao MOCK em 0, 24 e 48 horas pós infecção, respectivamente. Já as células infectadas com H2N1 MOI=1 não houve um aumento importante na expressão de chADAP2 em 0 e 24 horas pós infecção, respectivamente. Enquanto no período de 48 horas pós infecção houve uma diminuição na expressão gênica de chADAP2.

Um aumento na expressão de chADAP2 após 0, 24 e 48 horas de infecção, respectivamente foi observado nas células infectadas com H2N1 MOI=10, especialmente em 48h de 17,9 vezes, quando houve diferença estatística, ( $P < 0.05$ ). A quantificação relativa do gene NP de AIV também demonstrou que houve uma maior expressão do vírus de influenza nas células infectadas com H5N2 (MOI=1) e H2N1 (MOI =10), com aumento de expressão entre 5,7 a 7,4 vezes (Figura 17B). Já as células infectadas com H2N1 e MOI de 1, a expressão gênica aumentou entre 3,9 a 4,2 vezes quando comparada ao grupo controle.

**Figura 17. Quantificação da expressão relativa dos genes chADAP2 e M de AIV em células DF-1 em diferentes tempos de infecção por AIV.**



**Legenda:** A expressão relativa foi calculada pelo método  $2^{-(\Delta\Delta Cq)}$  e  $\log 2^{-(\Delta\Delta Cq)}$ . Gráfico das porcentagens da expressão relativa de A) ADAP2, (\*) coluna com asterisco apresentou diferença estatística e B) AIV das células infectadas com H5N2-MOI=1, H2N1-MOI=1 e H2N1-MOI=10. O Cq de 41 foi utilizado para calcular a expressão de AIV no grupo controle, uma vez que todas as amostras apresentaram Cq indeterminado por serem negativas.

Fonte: Scagion, 2020

### 5.3 Localização de chADAP2 e outras proteínas no citoplasma celular

A expressão de chADAP2 (em vermelho) foi observada na região citoplasmática, que segue do entorno do núcleo até a região da borda citoplasmática (Figura 18A). A expressão de chMAVS também foi observada principalmente na região citoplasmática com uma maior concentração no entorno da região nuclear. A sobreposição (*merge*) das imagens mostrou a co-localização destas duas proteínas (em amarelo) distribuídas na área citoplasmática.

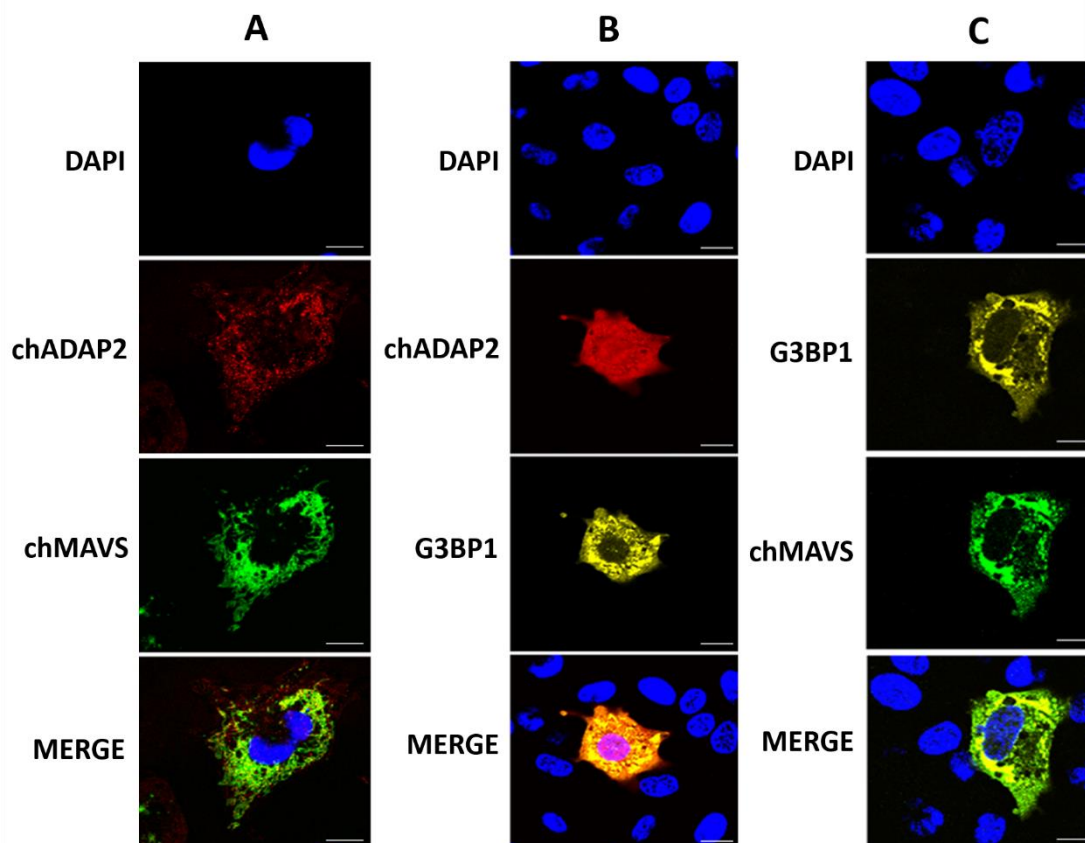
As células com expressão de chADAP2 (em vermelho) e G3BP1 (em amarelo) também foram localizadas na região citoplasmática das células transfectadas indicado em laranja nas imagens sobrepostas (Figura 18B). Foi também possível observar uma expressão de chADAP2 por toda célula inclusive na região do núcleo diferente da primeira transfecção evidenciado por regiões róseas quando as imagens são sobrepostas. Além disso, foi possível visualizar uma diferença nos tamanhos dos grânulos de estresse e que apesar de estarem distribuídos por toda a célula apresentam uma concentração bem menor na região nuclear, e uma diminuição na borda da célula, sendo observada uma maior concentração na região intermediária do citoplasma.

A sobreposição das imagens das células transfectadas com chMAVS (em verde) e G3BP1 (em amarelo) evidenciou um alto grau de co-localização destas duas proteínas na região citoplasmática no entorno do núcleo, indicado em verde claro (Figura 18C). Foi observada uma diferença no tamanho dos grânulos de estresse, porém uma maior concentração destes grânulos juntamente com proteína chMAVS na região perinuclear.

Finalmente, a expressão das três proteínas foi observada nas células DF-1 transfectadas com os três plasmídeos, Figura 19 (chADAP2, chMAVS e G3BP1). Nestas imagens a marcação da proteína chADAP2 novamente pode ser observada por toda a célula, com uma diferença sutil, mas ainda perceptível de concentração maior na região citoplasmática e ainda se observa que estas proteínas se localizam nas bordas das células diferentemente da proteína chMAVS, que apresenta concentração na região perinuclear. As três proteínas apresentaram a expressão predominantemente citoplasmática e uma co-localização mais evidente das proteínas

chMAVS e G3BP1. Porém, ainda sim, foi possível perceber regiões, que apresentaram a co-localização dos três marcadores.

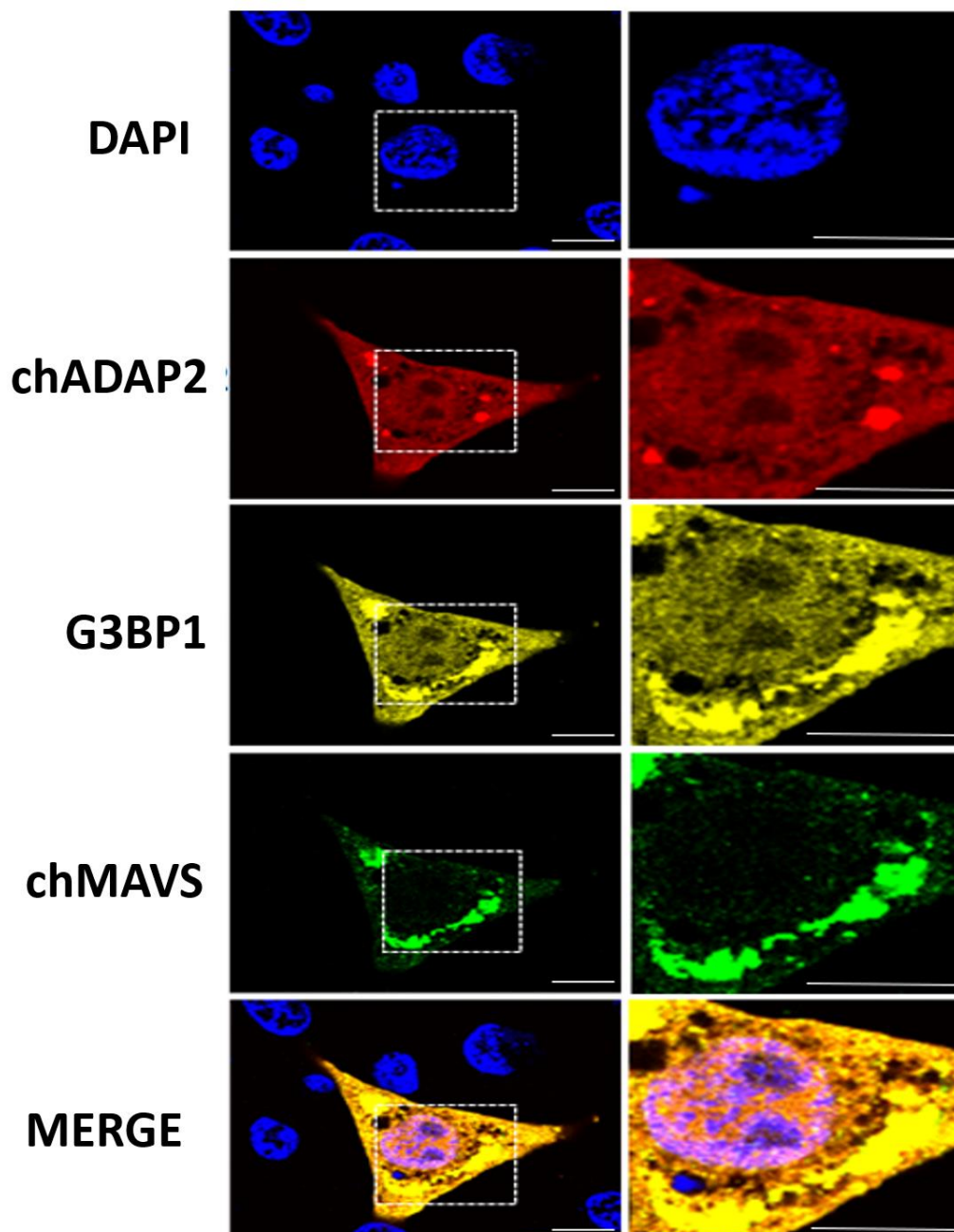
**Figura 18.** Imagens obtidas por microscopia confocal de células DF-1 transfectadas com diferentes plasmídeos contendo os genes ADAP2, MAVS e G3BP1.



**Legenda:** chADAP2 (vermelho), chMAVS (em verde) e G3BP1 (amarelo). Os núcleos foram corados com DAPI e são mostrados em azul. No canto inferior direito de cada quadro a linha branca corresponde a uma escala de 10 $\mu$ m. A) Células DF-1 expressando as proteínas chADAP2 e chMAVS, marcadas em vermelho e verde respectivamente, sendo que a co-localizam é evidenciada em amarelo. B) SG em amarelo, com concentrações em torno do núcleo de diversos tamanhos, ao co-localizar com chADAP2, vê-se regiões em laranja. A terceira coluna apresenta SG associado ao chMAVS. C) Esses grânulos de G3BP1 com chMAVS que possuem uma forte co-localização e podem ser visualizados em um tom de amarelo mais claro.

**Fonte:** Scagion, 2020.

**Figura 19.** Imagens obtidas por microscopia confocal de células DF-1 transfectadas com diferentes plasmídeos contendo os genes chADAP2, chMAVS e G3BP1 (grânulos de estresse), indicando associação entre as duas proteínas e SG.



**Legenda:** Após 48h de expressão dos plasmídeos, as células foram fixadas e marcadas com anticorpos: GeneTex V5 produzido em coelho para ADAP2-V5 e Sigma anti-Flag produzido em mouse para chMAVS-Flag, seguido de marcação com anticorpos secundários conjugados cromóforos, Alexa 568 (vermelho) contra coelho para ADAP2 e Alexa 488 (verde) contra o camundongo para chMAVS. A coloração por DAPI foi usada para os núcleos que são mostrados em azul. Escala (10 $\mu$ m) representada por linha branca no canto inferior direito de cada quadro. Quadrados brancos tracejados na coluna esquerda são mostrados ampliados na coluna direita. Os grânulos podem ser visualizados no citoplasma das células ao redor do núcleo nos quadros de chADAP2, G3BP1 e chMAVS. A sobreposição das imagens mostra que esses grânulos são co-localizados.

Fonte: Scagion, 2020

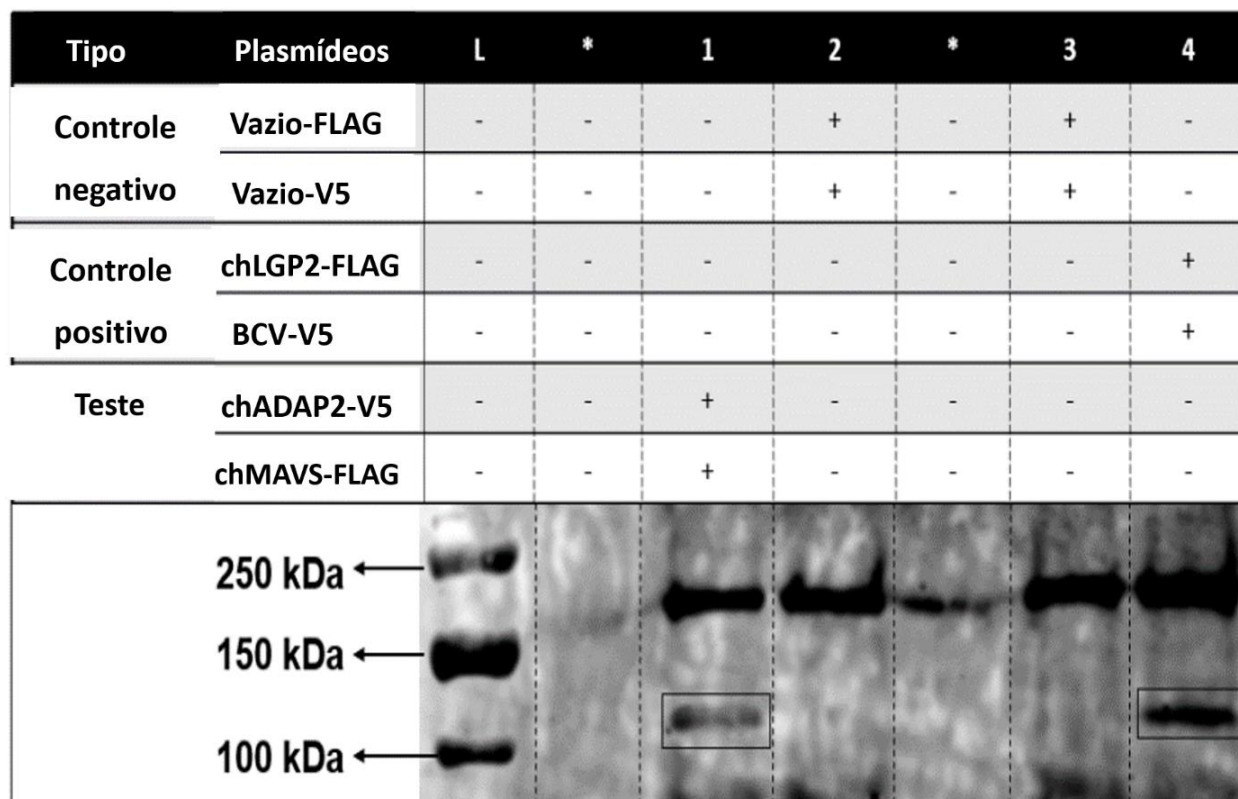


#### 5.4 Interação química da proteína chADAP2 com outras proteínas da resposta inata

Para confirmar a interação química entre as proteínas chMAVS e o chADAP2 quando expressas dentro das células DF-1, foi realizado um teste de co-imunoprecipitação. Os plasmídeos contendo as proteínas tags FLAG (DYKDDDDK, 1,01 kDa) e V5 (GKPIPNNPLLGLDST, 1,42 kDa) para marcação com anticorpos foram transfectados em células DF-1. Sendo os plasmídeos que contendo as proteínas chLGP2-Flag e BC-V-V5 foram utilizados como controles positivos, enquanto os plasmídeos vazios (Vazio-Flag e Vazio-V5) funcionaram como o controle negativo.

A Figura 20 mostra que a co-imunoprecipitação foi um sucesso. Uma banda fraca na altura esperada de 112,76kDa (soma do peso molecular de chADAP2 e chMAVS) foi observada, o que confirmou a interação entre chADAP2 e chMAVS pelo *western blotting* (Figura 20, coluna 1). Os controles negativos do ensaio não apresentaram nenhuma banda na altura esperada, o que confirmou que a interação entre as proteínas de interesse não foi devido a região das Tags (Figura 20, colunas 2 e 3). Já o controle positivo do ensaio da co-imunoprecipitação apresentou uma banda na altura exata do peso 115,43 kDa referente à soma do peso molecular dos plasmídeos contendo os genes chLGP2-FLG e BCV-V5 (Figura 20, coluna 4). Contudo, ainda foi possível observar bandas inespecíficas, com o peso superior às bandas de interesse, no entanto como estas bandas também foram observadas nos controles negativos, provavelmente foram complexos proteicos formados com a interação das tags.

**Figura 20.** Resultados obtidos a partir da co-imunoprecipitação das proteínas MAVS e chADAP2 em células DF-1 transfectadas.



**Legenda:** Na parte superior da figura encontram-se os plasmídeos utilizados na transfecção das células DF-1 para cada amostra ( com uma amostra por coluna), na parte inferior do quadro encontra-se imagem da membrana de nitrocelulose obtida após teste de *western blotting* da co-imunoprecipitação (fotografado com o scanner de membrana ODYSSEY CLX). L-Ladder, interação entre as duas proteínas de galinha ADAP2 e MAVS é evidenciada pela banda mostrada 1- chADAP2 + MAVS, 2 e 3 - Controle negativos células transfectadas com os plasmídeos vazios), 4- controle positivo (chLGP2-Flag e BC-V-V5), \* colunas vazias, quadros pretos nas colunas 1 e 4 evidenciam as bandas de interação das proteínas.

Fonte: Scagion, 2020

### 5.5 Avaliação do potencial antiviral de chADAP2

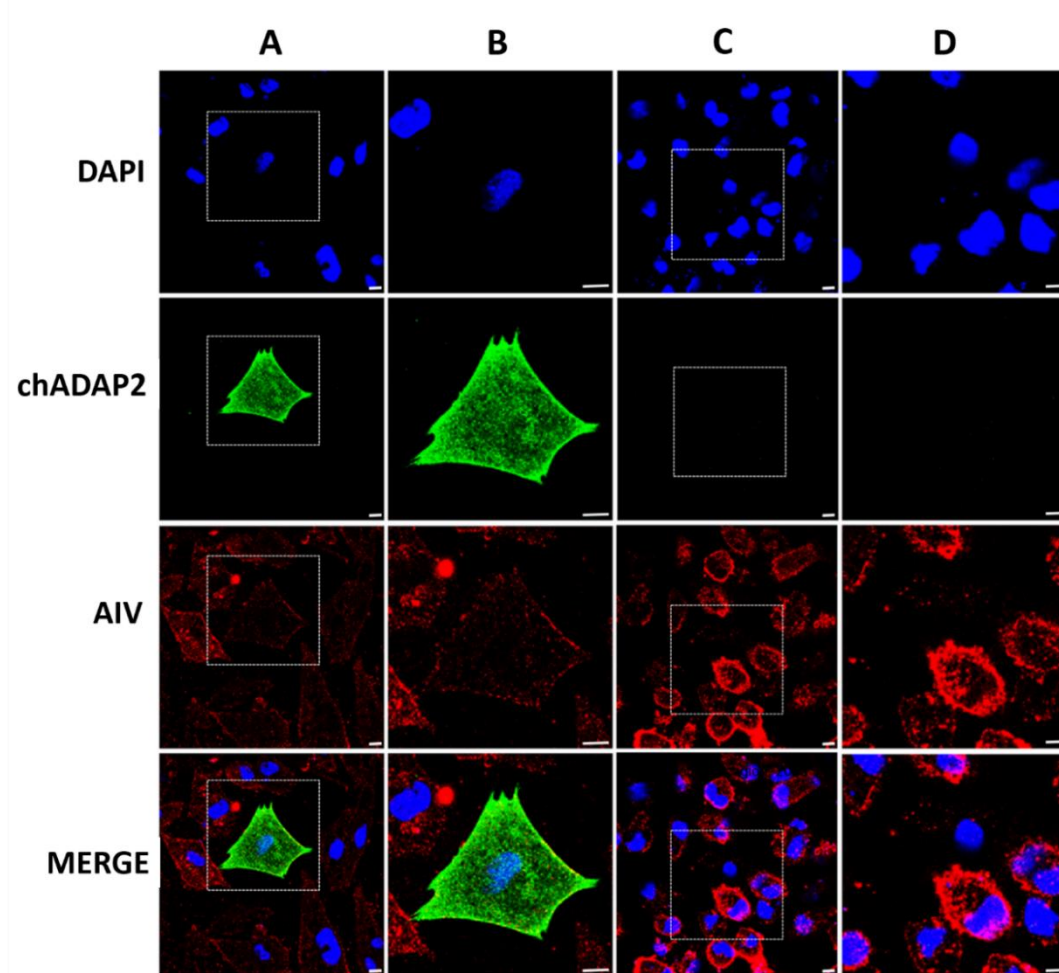
Para verificar se o chADAP2 também desempenha um papel antiviral em células aviárias, foi realizado um experimento utilizando-se células DF-1 transfectadas e não transfectadas com chADAP2 desafiadas com AIV de baixa patogenicidade (H9N2) e estas células foram observadas sob microscopia confocal (Figura 21). Na coluna A e B da Figura 21, encontram-se imagens de células transfectadas com o plasmídeo tendo o gene chADAP2, enquanto nas colunas C e D são relativas às células não transfectadas com o plasmídeo.

As células expressando o chADAP2 (verde) aparentaram estar menos suscetíveis à infecção viral, em vista da menor marcação da proteína NP viral nessas

células (vermelho) quando comparadas às células não transfectadas com chADAP2. Nas células (Figura 21A-B) desafiadas com influenza, foi observada a expressão da proteína chADAP2 em toda a célula, inclusive na região nuclear, com maior intensidade na borda celular. Estas células transfectadas pareceram manter a morfologia natural da linhagem celular DF-1, enquanto as células que expressaram menos chADAP2 apresentaram uma maior intensidade de marcação de proteína viral.

Nas imagens das células não transfectadas com o plasmídeo chADAP2, uma maior intensidade de marcação de proteínas de vírus de influenza foi evidenciada em toda a célula, porém mais concentrada na borda celular (Figura 21C-D). Além disso, foi observado um alto grau de arredondamento na morfologia celular, indicativo de morte celular.

**Figura 21. Imagens obtidas por microscopia confocal da avaliação do papel antiviral em células DF-1 que expressaram a proteína chADAP2**



**Legenda:** Células DF-1 transfectadas com chADAP2 após 24 horas de expressão, foram infectadas com o vírus de influenza (H9N2). As células foram observadas após 48 horas de infecção, e fixadas e preparadas para a imunofluorescência indireta. Os núcleos foram marcados com DAPI e são mostrados em azul. As linhas brancas no canto inferior de cada quadro representam uma escala de 10 $\mu$ m. As colunas B e D mostram a ampliação das imagens selecionadas pelos quadrados brancos tracejados das colunas A e C, respectivamente. A e B) As células transfectadas com chADAP2 (verde) conservaram a forma natural das células DF-1 e apresentaram menor detecção do vírus de influenza (vermelho). C) e D) As células DF-1 não transfectadas com chADAP2 apresentaram uma morfologia mais arredondada e uma maior detecção do vírus de influenza. Fonte: Scagion, 2020

## 6. DISCUSSÃO

Avanços significativos no conhecimento global sobre imunologia em todas as espécies têm ocorrido ao longo das últimas décadas. Em um estudo prévio utilizando um *screening* de RNA de interferência de genoma humano total identificaram 226 genes reguladores da via de sinalização RIG-I importantes para produção de interferon beta (PULLOOR et al., 2014). Entre estes genes foi encontrado o ADAP2, que também já havia sido identificado como uma proteína que interagia com NEMO, todas estas pesquisas desenvolvidas em células humanas (FENNER; SCANNELL; PREHN, 2010). Embora a expansão de informação tenha ocorrido também sobre a imunologia aviária, a função de diversos genes permanece ainda desconhecida (MAGOR et al., 2013; SANTHAKUMAR et al., 2017). Nesse sentido nosso trabalho contribuiu para a extensão do conhecimento sobre a imunologia das aves, pois foi o primeiro a investigar a ação do gene ADAP2 de galinhas na resposta imune inata em células aviárias.

Nosso estudo identificou diferenças no tamanho, tipos e organizações dos principais domínios (Arf-GAP, PH1 e PH2) da região sintênica do gene ADAP2 quando comparamos as sequências de duas espécies de aves (galinha e pato) e duas espécies de mamíferos (humanos e camundongos) por análises de bioinformática. Embora o tamanho da região sintênica do gene ADAP2 tenha sido variável entre as espécies, os domínios Arf-GAP, PH1 e PH2 apresentaram uma homologia maior entre as espécies aviárias quando comparadas com as espécies de mamíferos. Esta similaridade entre proteínas pertencentes a mesma classe taxonômica, também já foi verificada em outras proteínas da resposta imune inata como MAVS, interferon lambda, interferon gama (SCHULTZ; KASPERS; STAEHELI, 2004; REUTER et al., 2014; SUN, Y. et al., 2019)

A análise filogenética utilizou das sequências de classes de aves, reptilia e mamífera do gene ADAP2 disponíveis no *genbank*. Dividindo as sequências de aves e mamíferos em dois clados distintos. Além disso, as sequências das espécies de galiformes mostrou-se mais próximas a dos anseriformes. Estes dados são semelhantes a estudos anteriores realizados com outros genes da resposta imune antiviral, pois não foram realizados outros estudos com ADAP2. Em estudo de 2016, a análise filogenética do gene MAVS, onde sequências de mamíferos e aves foram separadas em grupos distintos, enquanto que a sequência de patos foi agrupada com

sequências de galinha (LI, H. et al., 2016). Novamente, uma estrutura semelhante da árvore produzida neste estudo foi visualizada em uma análise filogenética do IFN $\gamma$  de 2004, onde houve uma separação entre os grupos de aves e mamíferos mais uma vez. E ainda neste estudo de 2004, foi observada uma associação dos grupos espécies pertencentes a galiformes (galinha, perus, codornas) sendo o ramo irmão de patos anseriformes (SCHULTZ; KASPERS; STAEHELI, 2004). As espécies de aves apresentaram uma pequena distância evolutiva, enquanto este valor foi acima de 0,40 quando comparado com répteis e mamíferos.

Após identificarmos diferenças nas análises *in silico* do ADAP2 entre diferentes classes taxonômicas, investigamos a expressão das proteínas chADAP2 selvagem em células DF-1, frente as infecções com duas estirpes LPAIV. Para iniciar os experimentos verificamos se nossos vírus eram capazes de gerar algum efeito citopático em nossas células DF-1, a fim de acompanhar a evolução do experimento na microscopia de luz. As células DF-1 infectadas com os LPAIV (H5N2 e H2N1) apresentaram um efeito citopático característico à infecção causada por estes vírus. Estes achados estão de acordo com estudos anteriores que demonstraram efeitos semelhantes de diferentes linhagens celulares infectadas com AIV como DF -1, QT-6, FEG, MDCK e VERO, necessitando em todos estes da adição de tripsina no meio, como também realizado no nosso estudo (ZEINAB et al.; KANG et al., 2006; SHAN et al., 2010; SHAHSAVANDI et al., 2013)

No nosso estudo, houve aumento na expressão de chADAP2 nas células DF-1 em todos os tempos após infecção independente da concentração viral utilizada, exceto nas células infectadas com o MOI igual 1 de H2N1 no período de 48h. A baixa expressão de chADAP2 poderia ter sido causada pela alta taxa de mortalidade celular verificada neste tratamento em questão. A expressão de ADAP2 foi significativamente maior quando utilizada uma carga viral maior para a infecção das células. O aumento da expressão de ADAP2 pode estar ligado a resposta antiviral das células DF-1, junto com o IFN $\beta$ , que também é capaz de produzir efeito antiviral contra AIV em células DF-1 (QU et al., 2013). E o como já foi demonstrado em um experimento anterior com células HT1080 tratadas com IFN $\beta$  purificado, obtiveram um aumento na expressão de ADAP2, em conjunto com outras ISGs detectados por quantificação em RT-qPCR, o que indica a participação deste gene na via de resposta antiviral (SHU et al., 2015).

Foi sugerido também que o ADAP2 humano poderia atuar como uma proteína *scaffold* que integra diferentes partes da via RIG-I, e mediar a produção de interferon

do tipo I, o que levaria a célula a um potente estado antiviral (BIST et al., 2017). O aumento da expressão de chADAP2 foi correlacionado com a diminuição da intensidade do sinal de marcação do AIV. Resultados semelhantes foram encontrados em estudo anterior, utilizando-se células de mamíferos onde foi comprovado que o ADAP2 também teve um efeito protetor contra o vírus da dengue (DENV) e o vírus da estomatite vesicular (VSV), diminuindo à sua replicação. O mesmo efeito não pôde ser observado na replicação do coxsackievirus B (CVB) ou do vírus Sendai (SeV), esse fato pode estar associado ao método de entrada de vírus na célula hospedeira (SHU et al., 2015). A infecção pelo AIV se inicia quando os vírus se ligam às terminações glicinas do ácido siálico (SA) na superfície das células hospedeiras, através do domínio de ligação ao receptor glicoproteico de superfície do HA. A interação entre essas proteínas é um fator determinante importante da gama de hospedeiros. Logo, os vírus da influenza humana se ligam preferencialmente a um terminal SA ligado à galactose por uma ligação  $\alpha 2,6$ , enquanto os vírus da gripe aviária se ligam preferencialmente à ligação SA  $\alpha 2,3$  com a galactose (CONNOR et al., 1994; ITO et al., 1998; SHINYA et al., 2006). Após a ligação, o vírus pode entrar na célula por via endocítica mediada por clatrina ou independente de clatrina e caveolina (LAKADAMYALI; RUST; ZHUANG, 2004; RUST et al., 2004). O DENV e o VSV entram nas células dos mamíferos normalmente por uma via mediada pela clatrina (SUN, X. et al., 2005; VAN DER SCHAAR et al., 2008; MIRE; WHITE; WHITT, 2010; ACOSTA; CASTILLA; DAMONTE, 2011).

Já no caso do CVB a entrada do vírus em células não polarizadas ocorre por uma via independente de clatrina, que não requer entrega específica aos compartimentos endossômicos para o desnudamento (PATEL; COYNE; BERGELSON, 2009). Já com o SeV, a fusão da partícula viral ocorre na superfície da célula hospedeira e não depende de entrega específica aos compartimentos endossômicos para sua entrada; esse vírus possui proteínas de fusão independentes de pH e, portanto, pode penetrar nas células através da fusão direta com a membrana plasmática (FAN; SEFTON, 1978; MARSH; HELENIUS, 2006). Nossos resultados, cooperam juntamente com esses dados anteriores, sugerindo que o ADAP2 pode afetar vírus que requerem entrada em um compartimento endossômico.

Além disso, parece ter havido uma diferença de expressão relacionada à estirpe viral utilizada para a infecção, quando utilizamos amostras virais não adaptadas ou adaptadas às aves domésticas. Quando comparamos a mesma carga

viral, a expressão de ADAP2 foi maior após infecção com o vírus H5N2, que tem origem de perus, e menos evidente após a infecção com o H2N1 tem origem de amostras de aves silvestres. De fato, a origem dos vírus está relacionada a capacidade de a adaptação do vírus em aves domésticas, que também influencia a sua replicação (DEJESUS et al., 2016; PANTIN-JACKWOOD et al., 2016; PANTIN-JACKWOOD et al., 2017). Por exemplo, os vírus H9N2 LPAI isolados de galinhas são extremamente adaptados e precisam de uma carga viral menor para se replicar e ser transmitido para aves de contato (BELSER et al., 2020; KARIITHI et al., 2020). Por isso, optamos em utilizar o vírus H9N2 LPAIV isolado de galinhas para os experimentos subsequentes.

A fim de compreender melhor a função desta proteína em células fibroblásticas de galinha, a associação do chADAP2 com outras proteínas da cascata de resposta imune inata como chMAVS e G3BP1 (marcador para grânulos de estresse) em células DF-1 também foi avaliada. A proteína chMAVS apresentou um padrão de distribuição mitocondrial nas células DF-1, que se assemelha a distribuição *MitoTracker Red* um marcador da distribuição de mitocôndrias utilizado na mesma linhagem celular em outros estudos (CHEUNG et al., 2020; XIAO et al., 2020). E ainda, a distribuição da expressão de chMAVS também foi observada, que se assemelha a expressão das MAVS humana em células HEK293, e das MAVS de patos em células DF-1 e fibroblastos de embriões patos (SETH et al., 2005; LI, H. et al., 2016; CHEUNG et al., 2020; XIAO et al., 2020).

A superexpressão da proteína chG3BP1 foi capaz de induzir a formação de SGs, como já relatado em mamíferos. Os grânulos no nosso estudo variaram em tamanho, que parece ocorrer devido às características intrínsecas dos SGs no período da dinâmica de formação e dissociação destes grânulos (ANDERSON; KEDERSHA, 2008; KEDERSHA, N.; IVANOV; ANDERSON, 2013). Os grânulos foram observados em toda a região citoplasmática, em concordância com os dados mostrados em outros estudos em células HeLa, Cos-7 linhagem celular advinda de rim *Cercopithecus aethiops* e DF-1 (SUN, Y. et al., 2018; KIM, S. S.-Y.; SZE; LAM, 2019).

A interação entre chMAVS e chG3BP1 também pode ser observada no nosso estudo. A expressão dos SGs parece impactar na distribuição celular de MAVS. O padrão filamentososo mitocondrial que foi observado aqui neste estudo e em outros estudos com a proteína MAVS, parece ter sido modificado para um padrão mais granular quando ocorre a expressão dos SGs, apesar da localização perinuclear ter



sido semelhante (VARGA et al., 2011; FUNG et al., 2013; SANCHEZ-APARICIO et al., 2017; HWANG et al., 2019).

A co-localização e a interação entre chADAP2 e chMAVS em células DF-1 (fibroblastos imortalizados de galinha) foi comprovada pela técnica Co-IP. A interação entre o complexo ADAP2, MAVS-NEMO-TBK1-IRF3 em células de mamíferos já foi relatada (BIST et al., 2017). O ADAP2 em células de mamíferos atua na via do interferon realizando a ligação entre o MAVS com as moléculas posteriores na via de sinalização como NEMO e TBK1. Além de interagir com TBK1, NEMO e IRF3 (BIST et al., 2017). Nosso estudo indicou que o ADAP2 em humanos e galinhas aparentam ter a mesma função na via do interferon, no âmbito da proteína chMAVS.

Uma forte co-localização de SG (G3BP1) e chMAVS também foi observada. A proteína adaptadora MAVS interage com os PRRs na detecção viral, ativando esta proteína para formar estruturas semelhantes a príons e subsequentemente ativa os complexos NEMO-TBK1 e IRF3, que causa a ativação da expressão IFN do tipo I (KAWAI et al., 2005; MEYLAN et al., 2005; SETH et al., 2005; XU, L.-G. et al., 2005; HOU et al., 2011). Além da resposta antiviral e respostas inflamatórias, a MAVS também regula outras vias e processos como apoptose, dinâmica mitocondrial e autofagia (BELGNAOUI; PAZ; HISCOTT, 2011). Dados anteriores evidenciaram que infecções virais também podem trazer respostas da via de estresse, o que incluem a formação de SG que promove a agregação com as MAVS nas mitocôndrias, simultaneamente com o início de respostas antivirais inatas por meio de PRRs como RIG-I e MDA5, culminando na ativação da via de sinalização de IFN tipo I (ONOMOTO et al., 2014; YONEYAMA; JOGI; ONOMOTO, 2016).

A co-localização de chADAP2, chMAVS e SG pode ser indicativo de que os chMAVS podem se ligar a proteínas que modulam a resposta antiviral, e que chADAP2 e SG possam atuar como plataforma de sinalização, auxiliando na resposta a infecção viral. A interação entre a via de sinalização de estresse dos SG e a resposta antiviral podem explicar porque os vírus inibem a formação dos grânulos de estresse (LU et al., 1995; ISENI et al., 2002; TAKEUCHI et al., 2008; PIOTROWSKA et al., 2010; KHAPERSKYY; HATCHETTE; MCCORMICK, 2012; ONOMOTO et al., 2012).

O potencial antiviral de ADAP2 em células DF-1 também foi investigado. Nossos resultados mostraram que chADAP2 tem um efeito protetor contra o H9N2 LPAIV. As células aviárias que super expressaram a proteína chADAP2 apresentaram um menor grau de infecção, ou seja, um menor acúmulo de proteínas virais no interior

da célula. A ausência de uma quantificação das partículas virais viáveis nas células com os diferentes tratamentos de nosso ensaio antiviral limitou a conclusão sobre o potencial antiviral de chADAP2. Interessante observar que as células infectadas super expressaram chADAP2 principalmente na borda celular, diferentemente da sua distribuição celular nas células não infectadas. Apesar de pouco ser sabido sobre a distribuição da proteína ADAP2 em mamíferos, sua informação em células de galinha anteriormente ao presente estudo era inexistente. Ainda no estudo desenvolvido por Shu e colaboradores foi observado que o ADAP2 está presente no enrugamento das membranas plasmáticas ricos em actina, e que a sua expressão serviria para melhorar a macropinocitose em células expostas aos IFN do tipo I e que isso alteraria o tráfego de partículas virais como DENV e VSV de entrada para impedir sua entrega aos endossomos tardios de Rab7. Nesse sentido a mudança de localização celular, diante de uma infecção viral por AIV sugerem ativação de um mecanismo semelhante nas células DF-1 (SHU et al., 2015).

A compreensão da localização subcelular de proteínas auxiliou no entendimento das funções desenvolvidas por estas, pois fornece o contexto fisiológico para sua função, como também já foi demonstrado em estudos prévios (SHI et al., 2008; SANCHEZ-APARICIO et al., 2017; YANG, Y. et al., 2019), assim como o potencial antiviral de ADAP2 em células humanas para os vírus VSV e DENV já havia sido detectado e quantificado (SHU et al., 2015; BIST et al., 2017). Ainda assim, nossos dados indicam uma atividade semelhante do ADAP2 de galinha e humanos, além de verificarmos uma atividade protetora do chADAP2 no ensaio antiviral.

## 7. CONCLUSÕES

Este foi o primeiro estudo a investigar a ação do gene chADAP2 na resposta imune inata nas células DF-1 (fibroblastos de galinhas). Apesar da baixa homologia entre os domínios de ADAP2 de aves e mamíferos, bem como alta divergência genética por análises de bioinformática, nossos resultados indicam que o chADAP2 apresenta uma função semelhante ao seu análogo em mamíferos. Nosso estudo demonstrou que as células DF-1 apresentaram um aumento na expressão do ADAP2 em diferentes tempos pós infecção com os vírus de influenza LPAIV com uma variação relacionada à carga viral e à origem do vírus. A expressão de ADAP2 foi maior em vírus adaptados às células de galinha do vírus de origem de perus (também galináceo) em relação ao outro vírus isolado de amostras de aves silvestres, quando utilizada a mesma carga viral de desafio. A interação entre chADAP2 e chMAVS da imunidade inata também foi identificada. A co-localização e co-imunoprecipitação de chADAP2 e chMAVS sugerem que a via para expressão de IFN é semelhante entre galinhas e humanos, apesar de componentes inexistentes (RIG-I) e outros divergentes, como IRF7. Enquanto a co-localização e co-imunoprecipitação entre chADAP2 e os grânulos de estresse com chMAVS sugerem uma interação entre a via de imunidade antiviral e a via de produção dos grânulos de estresse. Por fim, a atividade antiviral do chADAP2 foi demonstrada com o aumento da expressão da proteína chADAP2 e diminuição da expressão da proteína viral em células DF-1 após a infecção com o vírus da influenza aviária LPAIV do subtipo H9N2. Contudo, serão necessários estudos quantitativos para avaliar a carga viral expressa além da viabilidade destas partículas virais em células tratadas com a chADAP2 para a confirmação deste efeito antiviral. Futuros estudos com o silenciamento do gene chADAP2 serão interessantes para confirmar esta função gênica nestas e em outras células aviárias. Este novo conhecimento sobre a resposta imune inata permitirá o desenvolvimento de ferramentas para o controle de infecções virais em aves.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Imunologia celular e molecular*. 8ª edição. **Rio de**, v., n., p., 2012.
- ABRESCIA, N. G.; BAMFORD, D. H.; GRIMES, J. M.; STUART, D. I. Structure unifies the viral universe. **Annual review of biochemistry**, v. 81, n., p., 2012.
- ACOSTA, E. G.; CASTILLA, V.; DAMONTE, E. B. Infectious dengue-1 virus entry into mosquito C6/36 cells. **Virus research**, v. 160, n. 1-2, p. 173-179, 2011.
- AGGENSTEINER, M.; REISER, G. Expression of the brain-specific membrane adapter protein p42IP4/centaurin  $\alpha$ , a Ins (1, 3, 4, 5) P4/PtdIns (3, 4, 5) P3 binding protein, in developing rat brain. **Developmental brain research**, v. 142, n. 1, p. 77-87, 2003.
- AGUILAR, R. Pandemia de gripe Sinaloa 1918-1919 [Internet]. **Elementos: Ciencia y cultura**, v. 9, n. 047, p. 37-43, 2002.
- AHLQUIST, P. RNA-dependent RNA polymerases, viruses, and RNA silencing. **Science**, v. 296, n. 5571, p. 1270-1273, 2002.
- AIR, G. M.; LAVER, W. G. The neuraminidase of influenza virus. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 6, n. 4, p. 341-356, 1989.
- AIZER, A.; KALO, A.; KAFRI, P.; SHRAGA, A.; BEN-YISHAY, R.; JACOB, A.; KINOR, N.; SHAV-TAL, Y. Quantifying mRNA targeting to P-bodies in living human cells reveals their dual role in mRNA decay and storage. **J Cell Sci**, v. 127, n. 20, p. 4443-4456, 2014.
- AKARSU, H.; BURMEISTER, W. P.; PETOSA, C.; PETIT, I.; MÜLLER, C. W.; RUIGROK, R. W.; BAUDIN, F. Crystal structure of the M1 protein-binding domain of the influenza A virus nuclear export protein (NEP/NS2). **The EMBO journal**, v. 22, n. 18, p. 4646-4655, 2003.
- AKTER, S.; KHAN, M.; JAHAN, M.; KARIM, M.; ISLAM, M. Histomorphological study of the lymphoid tissues of broiler chickens. **Bangladesh Journal of Veterinary Medicine**, v. 4, n. 2, p. 87-92, 2006.
- ALEXANDER, D. J. A review of avian influenza in different bird species. **Veterinary microbiology**, v. 74, n. 1-2, p. 3-13, 2000.
- ALVES, L. R. **Caracterização funcional de complexos mRNA-proteínas**. 2010.
- ANDERSON, P.; KEDERSHA, N. 壽 Visibly stressed: the role of eIF2, TIA-1, and stress granules in protein translation. **Cell stress & chaperones**, v. 7, n. 2, p. 213, 2002.
- ANDERSON, P.; KEDERSHA, N. RNA granules. **The Journal of cell biology**, v. 172, n. 6, p. 803-808, 2006.

ANDERSON, P.; KEDERSHA, N. Stress granules: the Tao of RNA triage. **Trends in biochemical sciences**, v. 33, n. 3, p. 141-150, 2008.

ANDERSON, P.; KEDERSHA, N. RNA granules: post-transcriptional and epigenetic modulators of gene expression. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 10, n. 6, p. 430, 2009.

ANDREJEVA, J.; CHILDS, K.; YOUNG, D.; CARLOS, T.; STOCK, N.; GOODBOURN, S.; RANDALL, R. The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, mda-5, and inhibit its activation of the IFN- $\beta$  promoter. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 49, p. 17264-17269, 2004.

ANTONELLI, G.; PISTELLO, M. Virology: a scientific discipline facing new challenges. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 25, n. 2, p. 133-135, 2019.

AU, W.-C.; MOORE, P. A.; LOWTHER, W.; JUANG, Y.-T.; PITHA, P. M. Identification of a member of the interferon regulatory factor family that binds to the interferon-stimulated response element and activates expression of interferon-induced genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 25, p. 11657-11661, 1995.

AYORA-TALAVERA, G. Influenza: Historia de una enfermedad. **Revista Biomédica**, v. 10, n. 1, p. 57-61, 1999.

BAEZ, M.; TAUSSIG, R.; ZAZRA, J. J.; YOUNG, J. F.; PALESE, P.; REISFELD, A.; SKALKA, A. M. Complete nucleotide sequence of the influenza A/PR/8/34 virus NS gene and comparison with the NS genes of the A/Udorn/72 and A/FPV/Rostock/34 strains. **Nucleic Acids Research**, v. 8, n. 23, p. 5845-5858, 1980.

BARBEE, S. A.; ESTES, P. S.; CZIKO, A.-M.; HILLEBRAND, J.; LUEDEMAN, R. A.; COLLIER, J. M.; JOHNSON, N.; HOWLETT, I. C.; GENG, C.; UEDA, R. Staufen-and FMRP-containing neuronal RNPs are structurally and functionally related to somatic P bodies. **Neuron**, v. 52, n. 6, p. 997-1009, 2006.

BARBER, M. R.; ALDRIDGE, J. R.; WEBSTER, R. G.; MAGOR, K. E. Association of RIG-I with innate immunity of ducks to influenza. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 13, p. 5913-5918, 2010.

BARJESTEHEH, N.; TAHA-ABDELAZIZ, K.; KULKARNI, R. R.; SHARIF, S. Innate antiviral responses are induced by TLR3 and TLR4 ligands in chicken tracheal epithelial cells: Communication between epithelial cells and macrophages. **Virology**, v. 534, n., p. 132-142, 2019.

BARJESTEHEH, N.; O'DOWD, K.; VAHEDI, S. M. Antiviral responses against chicken respiratory infections: Focus on avian influenza virus and infectious bronchitis virus. **Cytokine**, v. 127, n., p. 154961, 2020.

BELGNAOUI, S. M.; PAZ, S.; HISCOTT, J. Orchestrating the interferon antiviral response through the mitochondrial antiviral signaling (MAVS) adapter. **Current opinion in immunology**, v. 23, n. 5, p. 564-572, 2011.

BELSER, J. A.; SUN, X.; BROCK, N.; PAPPAS, C.; PULIT-PENALOZA, J. A.; ZENG, H.; JANG, Y.; JONES, J.; CARNEY, P. J.; CHANG, J. Genetically and antigenically divergent influenza A (H9N2) viruses exhibit differential replication and transmission phenotypes in mammalian models. **Journal of virology**, v., n., p., 2020.

BENSON, S. D.; BAMFORD, J. K.; BAMFORD, D. H.; BURNETT, R. M. Does common architecture reveal a viral lineage spanning all three domains of life? **Molecular cell**, v. 16, n. 5, p. 673-685, 2004.

BERLANGA, J. J.; VENTOSO, I.; HARDING, H. P.; DENG, J.; RON, D.; SONENBERG, N.; CARRASCO, L.; DE HARO, C. Antiviral effect of the mammalian translation initiation factor 2 $\alpha$  kinase GCN2 against RNA viruses. **The EMBO journal**, v. 25, n. 8, p. 1730-1740, 2006.

BERTRAM, S.; GLOWACKA, I.; STEFFEN, I.; KÜHL, A.; PÖHLMANN, S. Novel insights into proteolytic cleavage of influenza virus hemagglutinin. **Reviews in medical virology**, v. 20, n. 5, p. 298-310, 2010.

BERTRAND, S.; CRISCUOLO, F.; FAIVRE, B.; SORCI, G. Immune activation increases susceptibility to oxidative tissue damage in zebra finches. **Functional Ecology**, v. 20, n. 6, p. 1022-1027, 2006.

BIOSYSTEMS, A. **MagMAX Sample Preparation System**: secondary title: Applied Biosystems, 2008. 2019.

BIST, P.; KIM, S. S.-Y.; PULLOOR, N. K.; MCCAFFREY, K.; NAIR, S. K.; LIU, Y.; LIN, R.; KRISHNAN, M. N. ArfGAP Domain-Containing Protein 2 (ADAP2) Integrates Upstream and Downstream Modules of RIG-I Signaling and Facilitates Type I Interferon Production. **Molecular and cellular biology**, v. 37, n. 6, p. e00537-00516, 2017.

BODEWES, R.; KUIKEN, T. Changing role of wild birds in the epidemiology of avian influenza A viruses. In: (Ed.). **Advances in virus research**: Elsevier, 2018. v.100, p.279-307.

BORGHESE, F.; MICHIELS, T. The leader protein of cardioviruses inhibits stress granule assembly. **Journal of virology**, v. 85, n. 18, p. 9614-9622, 2011.

BOS, T. J.; DAVIS, A. R.; NAYAK, D. P. NH<sub>2</sub>-terminal hydrophobic region of influenza virus neuraminidase provides the signal function in translocation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 81, n. 8, p. 2327-2331, 1984.

BÖTTCHER, E.; MATROSOVICH, T.; BEYERLE, M.; KLENK, H.-D.; GARTEN, W.; MATROSOVICH, M. Proteolytic activation of influenza viruses by serine proteases TMPRSS2 and HAT from human airway epithelium. **Journal of virology**, v. 80, n. 19, p. 9896-9898, 2006.

BOUVIER, N. M.; PALESE, P. The biology of influenza viruses. **Vaccine**, v. 26, n., p. D49-D53, 2008.

BOYD, A.; PHILBIN, V.; SMITH, A. **Conserved and distinct aspects of the avian Toll-like receptor (TLR) system: implications for transmission and control of bird-borne zoonoses**: secondary title: Portland Press Limited, 2007.

BRANTIS-DE-CARVALHO, C. E.; BOLDRIN, P. E. G.; SILVA JÚNIOR, W. A.; RAHAL, P.; TAJARA, E. H.; CARRARO, D. M.; CAMARGO, A. A.; ZANELLI, C. F.; VALENTINI, S. R. Papel da proteína Mx1 na resposta a interferons e no processo neoplásico. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32, n. 3, p. 287-295, 2012.

BROWNLIE, R.; ZHU, J.; ALLAN, B.; MUTWIRI, G. K.; BABIUK, L. A.; POTTER, A.; GRIEBEL, P. Chicken TLR21 acts as a functional homologue to mammalian TLR9 in the recognition of CpG oligodeoxynucleotides. **Molecular immunology**, v. 46, n. 15, p. 3163-3170, 2009.

BROWNLIE, R.; ALLAN, B. Avian toll-like receptors. **Cell and tissue research**, v. 343, n. 1, p. 121-130, 2011.

BRUNOTTE, L.; FLIES, J.; BOLTE, H.; REUTHER, P.; VREEDE, F.; SCHWEMMLE, M. The nuclear export protein of H5N1 influenza A viruses recruits Matrix 1 (M1) protein to the viral ribonucleoprotein to mediate nuclear export. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 29, p. 20067-20077, 2014.

BUCHAN, J. R.; MUHLRAD, D.; PARKER, R. P bodies promote stress granule assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. **The Journal of cell biology**, v. 183, n. 3, p. 441-455, 2008.

BUCHAN, J. R.; PARKER, R. Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation. **Molecular cell**, v. 36, n. 6, p. 932-941, 2009.

BUI, M.; WHITTAKER, G.; HELENIUS, A. Effect of M1 protein and low pH on nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins. **Journal of virology**, v. 70, n. 12, p. 8391-8401, 1996.

BULGIN, R.; ARBELOA, A.; GOULDING, D.; DOUGAN, G.; CREPIN, V. F.; RAYMOND, B.; FRANKEL, G. The T3SS effector EspT defines a new category of invasive enteropathogenic *E. coli* (EPEC) which form intracellular actin pedestals. **PLoS pathogens**, v. 5, n. 12, p. e1000683, 2009.

BULLOUGH, P. A.; HUGHSON, F. M.; SKEHEL, J. J.; WILEY, D. C. Structure of influenza haemagglutinin at the pH of membrane fusion. **Nature**, v. 371, n. 6492, p. 37-43, 1994.

BURRELL, C. J.; HOWARD, C. R.; MURPHY, F. A. Chapter 25 - Orthomyxoviruses. In: Burrell, C. J., Howard, C. R., *et al* (Ed.). **Fenner and White's Medical Virology (Fifth Edition)**. London: Academic Press, 2017, p.355-365.

CAILLAUD, A.; HOVANESSIAN, A. G.; LEVY, D. E.; MARIÉ, I. J. Regulatory serine residues mediate phosphorylation-dependent and phosphorylation-independent activation of interferon regulatory factor 7. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 18, p. 17671-17677, 2005.

CARRAT, F.; FLAHAULT, A. Influenza vaccine: the challenge of antigenic drift. **Vaccine**, v. 25, n. 39-40, p. 6852-6862, 2007.

CASTRUCCI, M. R.; DONATELLI, I.; SIDOLI, L.; BARIGAZZI, G.; KAWAOKA, Y.; WEBSTER, R. G. Genetic reassortment between avian and human influenza A viruses in Italian pigs. **Virology**, v. 193, n. 1, p. 503-506, 1993.

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, C. D. C. **Avian Influenza in Birds**: secondary title, 2017. 2020.

CHAISRI, U.; CHAICUMPA, W. Evolution of therapeutic antibodies, influenza virus biology, influenza, and influenza immunotherapy. **BioMed research international**, v. 2018, n., p., 2018.

CHAN, S.-W.; EGAN, P. A. Hepatitis C virus envelope proteins regulate CHOP via induction of the unfolded protein response. **The FASEB Journal**, v. 19, n. 11, p. 1510-1512, 2005.

CHEN, J.; LEE, K. H.; STEINHAEUER, D. A.; STEVENS, D. J.; SKEHEL, J. J.; WILEY, D. C. Structure of the hemagglutinin precursor cleavage site, a determinant of influenza pathogenicity and the origin of the labile conformation. **Cell**, v. 95, n. 3, p. 409-417, 1998.

CHEN, R.; HOLMES, E. C. Avian influenza virus exhibits rapid evolutionary dynamics. **Molecular biology and evolution**, v. 23, n. 12, p. 2336-2341, 2006.

CHEN, S.; CHENG, A.; WANG, M. Innate sensing of viruses by pattern recognition receptors in birds. **Veterinary research**, v. 44, n. 1, p. 82, 2013.

CHEN, W.; CALVO, P. A.; MALIDE, D.; GIBBS, J.; SCHUBERT, U.; BACIK, I.; BASTA, S.; O'NEILL, R.; SCHICKLI, J.; PALESE, P. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. **Nature medicine**, v. 7, n. 12, p. 1306-1312, 2001.

CHENG, G.; FENG, Z.; HE, B. Herpes simplex virus 1 infection activates the endoplasmic reticulum resident kinase PERK and mediates eIF-2 $\alpha$  dephosphorylation by the  $\gamma$ 134.5 protein. **Journal of virology**, v. 79, n. 3, p. 1379-1388, 2005.

CHENG, Y.; ZHU, W.; DING, C.; NIU, Q.; WANG, H.; YAN, Y.; SUN, J. IRF7 Is Involved in Both STING and MAVS Mediating IFN- $\beta$  Signaling in IRF3-Lacking Chickens. **The Journal of Immunology**, v. 203, n. 7, p. 1930-1942, 2019.

CHEUNG, P.-H. H.; LEE, T.-W. T.; KEW, C.; CHEN, H.; YUEN, K.-Y.; CHAN, C.-P.; JIN, D.-Y. Virus subtype-specific suppression of MAVS aggregation and activation by PB1-F2 protein of influenza A (H7N9) virus. **PLoS pathogens**, v. 16, n. 6, p. e1008611, 2020.



CHIANG, C.; CHEN, G.-W.; SHIH, S.-R. Mutations at alternative 5' splice sites of M1 mRNA negatively affect influenza A virus viability and growth rate. **Journal of virology**, v. 82, n. 21, p. 10873-10886, 2008.

CHILDS, K.; STOCK, N.; ROSS, C.; ANDREJEVA, J.; HILTON, L.; SKINNER, M.; RANDALL, R.; GOODBOURN, S. mda-5, but not RIG-I, is a common target for paramyxovirus V proteins. **Virology**, v. 359, n. 1, p. 190-200, 2007.

CLAVARINO, G.; CLÁUDIO, N.; COUDERC, T.; DALET, A.; JUDITH, D.; CAMOSSETO, V.; SCHMIDT, E. K.; WENGER, T.; LECUIT, M.; GATTI, E. Induction of GADD34 is necessary for dsRNA-dependent interferon- $\beta$  production and participates in the control of Chikungunya virus infection. **PLoS pathogens**, v. 8, n. 5, p., 2012.

CLIFFORD, M.; TWIGG, J.; UPTON, C. Evidence for a novel gene associated with human influenza A viruses. **Virol J**, v. 6, n. 1, p. 198, 2009.

COLLER, J.; PARKER, R. Eukaryotic mRNA decapping. **Annual review of biochemistry**, v. 73, n. 1, p. 861-890, 2004.

COLLER, J.; PARKER, R. General translational repression by activators of mRNA decapping. **Cell**, v. 122, n. 6, p. 875-886, 2005.

CONG, F.; LIU, X.; HAN, Z.; SHAO, Y.; KONG, X.; LIU, S. Transcriptome analysis of chicken kidney tissues following coronavirus avian infectious bronchitis virus infection. **BMC genomics**, v. 14, n. 1, p. 1, 2013.

CONNOR, R. J.; KAWAOKA, Y.; WEBSTER, R. G.; PAULSON, J. C. Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates. **Virology**, v. 205, n. 1, p. 17-23, 1994.

CONSORTIUM, I. C. G. S. Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. **Nature**, v. 432, n. 7018, p. 695, 2004.

CONSORTIUM, T. U. UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, p. D506-D515, 2018.

CORMICAN, P.; LLOYD, A. T.; DOWNING, T.; CONNELL, S. J.; BRADLEY, D.; O'FARRELLY, C. The avian Toll-Like receptor pathway—Subtle differences amidst general conformity. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 33, n. 9, p. 967-973, 2009.

COSWIG, L. T. Metapneumovirus aviario: suscetibilidade em diferentes sistemas celulares e produção de anticorpos monoclonais. v., n., p., 2008.

COUCEIRO, J.; DE ALBUQUERQUE, M. Viroses respiratórias. **SANTOS, NS de O**, v., n., p., 2015.

DANIELS, R.; KUROWSKI, B.; JOHNSON, A. E.; HEBERT, D. N. N-linked glycans direct the cotranslational folding pathway of influenza hemagglutinin. **Molecular cell**, v. 11, n. 1, p. 79-90, 2003.

DAVISON, F. Chapter 1 - The Importance of the Avian Immune System and its Unique Features. In: Schat, K. A., Kaspers, B., *et al* (Ed.). **Avian Immunology (Second Edition)**. Boston: Academic Press, 2014, p.1-9.

DEJESUS, E.; COSTA-HURTADO, M.; SMITH, D.; LEE, D.-H.; SPACKMAN, E.; KAPCZYNSKI, D. R.; TORCHETTI, M. K.; KILLIAN, M. L.; SUAREZ, D. L.; SWAYNE, D. E. Changes in adaptation of H5N2 highly pathogenic avian influenza H5 clade 2.3.4.4 viruses in chickens and mallards. **Virology**, v. 499, n., p. 52-64, 2016.

DIAS, A.; BOUVIER, D.; CRÉPIN, T.; MCCARTHY, A. A.; HART, D. J.; BAUDIN, F.; CUSACK, S.; RUIGROK, R. W. The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit. **Nature**, v. 458, n. 7240, p. 914-918, 2009.

DIXIT, E.; BOULANT, S.; ZHANG, Y.; LEE, A. S.; ODENDALL, C.; SHUM, B.; HACOHEN, N.; CHEN, Z. J.; WHELAN, S. P.; FRANSEN, M. Peroxisomes are signaling platforms for antiviral innate immunity. **Cell**, v. 141, n. 4, p. 668-681, 2010.

DOU, D.; DA SILVA, D. V.; NORDHOLM, J.; WANG, H.; DANIELS, R. Type II transmembrane domain hydrophobicity dictates the cotranslational dependence for inversion. **Molecular biology of the cell**, v. 25, n. 21, p. 3363-3374, 2014.

DURZYŃSKA, J.; GOŹDZICKA-JÓZEFIAK, A. Viruses and cells intertwined since the dawn of evolution. **Virology**, v. 12, n. 1, p. 169, 2015.

ELLIS, T. M.; BARRY BOUSFIELD, R.; BISSETT, L. A.; DYRTING, K. C.; LUK, G. S.; TSIM, S.; STURM-RAMIREZ, K.; WEBSTER, R. G.; GUAN, Y.; PEIRIS, J. M. Investigation of outbreaks of highly pathogenic H5N1 avian influenza in waterfowl and wild birds in Hong Kong in late 2002. **Avian Pathology**, v. 33, n. 5, p. 492-505, 2004.

ELTON, D.; TILEY, L.; DIGARD, P. Molecular mechanisms of influenza virus transcription. **Recent Res Dev Virol**, v. 4, n., p. 121-146, 2002.

ENGELHARDT, O. G.; FODOR, E. Functional association between viral and cellular transcription during influenza virus infection. **Reviews in medical virology**, v. 16, n. 5, p. 329-345, 2006.

ERF, G. Cell-mediated immunity in poultry. **Poultry science**, v. 83, n. 4, p. 580-590, 2004.

EVSEEV, D.; MAGOR, K. E. Innate immune responses to avian influenza viruses in ducks and chickens. **Veterinary sciences**, v. 6, n. 1, p. 5, 2019.

EWENSON, E. L.; ZANN, R. A.; FLANNERY, G. R. Body condition and immune response in wild zebra finches: effects of capture, confinement and captive-rearing. **Naturwissenschaften**, v. 88, n. 9, p. 391-394, 2001.

FAN, D. P.; SEFTON, B. M. The entry into host cells of Sindbis virus, vesicular stomatitis virus and Sendai virus. **Cell**, v. 15, n. 3, p. 985-992, 1978.

FELLAH, J. S.; JAFFREDO, T.; NAGY, N.; DUNON, D. Chapter 3 - Development of the Avian Immune System. In: Schat, K. A., Kaspers, B., *et al* (Ed.). **Avian Immunology (Second Edition)**. Boston: Academic Press, 2014, p.45-63.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, n. 4, p. 783-791, 1985.

FENG, Q.; HATO, S. V.; LANGEREIS, M. A.; ZOLL, J.; VIRGEN-SLANE, R.; PEISLEY, A.; HUR, S.; SEMLER, B. L.; VAN RIJ, R. P.; VAN KUPPEVELD, F. J. MDA5 detects the double-stranded RNA replicative form in picornavirus-infected cells. **Cell reports**, v. 2, n. 5, p. 1187-1196, 2012.

FENNER, B. J.; SCANNELL, M.; PREHN, J. H. Expanding the substantial interactome of NEMO using protein microarrays. **PloS one**, v. 5, n. 1, p. e8799, 2010.

FENSTERL, V.; SEN, G. C. Interferons and viral infections. **Biofactors**, v. 35, n. 1, p. 14-20, 2009.

FINNEN, R. L.; ZHU, M.; LI, J.; ROMO, D.; BANFIELD, B. W. Herpes simplex virus 2 virion host shutoff endoribonuclease activity is required to disrupt stress granule formation. **Journal of virology**, v. 90, n. 17, p. 7943-7955, 2016.

FIRTH, A. E.; BRIERLEY, I. Non-canonical translation in RNA viruses. **The Journal of general virology**, v. 93, n. Pt 7, p. 1385, 2012.

FODOR, E.; BROWNLEE, G. G. Influenza virus replication. In: (Ed.). **Perspectives in Medical Virology**: Elsevier, 2002. v.7, p.1-29.

FORTERRE, P. The origin of viruses and their possible roles in major evolutionary transitions. **Virus research**, v. 117, n. 1, p. 5-16, 2006.

FOSTER, D. Development of a spontaneously immortalized chicken embryo fibroblastic cell line. **Virology**, v. 248, n. 2, p. 305-311, 1998.

FOSTER, D. N.; FOSTER, L. K. **Immortalized cell lines for virus growth**: secondary title: Google Patents, 1997.

FUJIMURA, K.; KANO, F.; MURATA, M. Identification of PCBP2, a facilitator of IRES-mediated translation, as a novel constituent of stress granules and processing bodies. **Rna**, v. 14, n. 3, p. 425-431, 2008.

FUNG, G.; NG, C. S.; ZHANG, J.; SHI, J.; WONG, J.; PIESIK, P.; HAN, L.; CHU, F.; JAGDEO, J.; JAN, E. Production of a dominant-negative fragment due to G3BP1 cleavage contributes to the disruption of mitochondria-associated protective stress granules during CVB3 infection. **PloS one**, v. 8, n. 11, p., 2013.

GACK, M. U.; SHIN, Y. C.; JOO, C.-H.; URANO, T.; LIANG, C.; SUN, L.; TAKEUCHI, O.; AKIRA, S.; CHEN, Z.; INOUE, S. TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is

essential for RIG-I-mediated antiviral activity. **Nature**, v. 446, n. 7138, p. 916-920, 2007.

GARCIA, M.; MEURS, E.; ESTEBAN, M. The dsRNA protein kinase PKR: virus and cell control. **Biochimie**, v. 89, n. 6-7, p. 799-811, 2007.

GARTEN, W.; KLENK, H.-D. Characterization of the carboxypeptidase involved in the proteolytic cleavage of the influenza haemagglutinin. **Journal of General Virology**, v. 64, n. 10, p. 2127-2137, 1983.

GE, M.; COHEN, J. S.; BROWN, H. A.; FREED, J. H. ADP Ribosylation Factor 6 Binding to Phosphatidylinositol 4, 5-Bisphosphate-Containing Vesicles Creates Defects in the Bilayer Structure: An Electron Spin Resonance Study. **Biophysical journal**, v. 81, n. 2, p. 994-1005, 2001.

GENOVESE, K. J.; HE, H.; SWAGGERTY, C. L.; KOGUT, M. H. The avian heterophil. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 41, n. 3, p. 334-340, 2013.

GEORGE, C. X.; RAMASWAMI, G.; LI, J. B.; SAMUEL, C. E. Editing of cellular self-RNAs by adenosine deaminase ADAR1 suppresses innate immune stress responses. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291, n. 12, p. 6158-6168, 2016.

GILKS, N.; KEDERSHA, N.; AYODELE, M.; SHEN, L.; STOECKLIN, G.; DEMBER, L. M.; ANDERSON, P. Stress granule assembly is mediated by prion-like aggregation of TIA-1. **Molecular biology of the cell**, v. 15, n. 12, p. 5383-5398, 2004.

GITLIN, L.; BARCHET, W.; GILFILLAN, S.; CELLA, M.; BEUTLER, B.; FLAVELL, R. A.; DIAMOND, M. S.; COLONNA, M. Essential role of mda-5 in type I IFN responses to polyriboinosinic: polyribocytidylic acid and encephalomyocarditis picornavirus. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 22, p. 8459-8464, 2006.

GOOSSENS, K. E.; WARD, A. C.; LOWENTHAL, J. W.; BEAN, A. G. Chicken interferons, their receptors and interferon-stimulated genes. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 41, n. 3, p. 370-376, 2013.

GOOSSENS, K. E.; KARPALA, A. J.; WARD, A.; BEAN, A. G. Characterisation of chicken ZAP. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 46, n. 2, p. 373-381, 2014.

GOOSSENS, K. E.; KARPALA, A. J.; ROHRINGER, A.; WARD, A.; BEAN, A. G. Characterisation of chicken viperin. **Molecular immunology**, v. 63, n. 2, p. 373-380, 2015.

GRANT, C. E.; VASA, M. Z.; DEELEY, R. G. cIRF-3, a new member of the interferon regulatory factor (IRF) family that is rapidly and transiently induced by dsRNA. **Nucleic Acids Research**, v. 23, n. 12, p. 2137-2146, 1995.

GREENSPAN, D.; PALESE, P.; KRYSTAL, M. Two nuclear location signals in the influenza virus NS1 nonstructural protein. **Journal of virology**, v. 62, n. 8, p. 3020-3026, 1988.

HAMMONDS-ODIE, L. P.; JACKSON, T. R.; PROFIT, A. A.; BLADER, I. J.; TURCK, C. W.; PRESTWICH, G. D.; THEIBERT, A. B. Identification and Cloning of Centaurin- $\alpha$  A NOVEL PHOSPHATIDYLINOSITOL 3, 4, 5-TRISPHOSPHATE-BINDING PROTEIN FROM RAT BRAIN. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 31, p. 18859-18868, 1996.

HANCK, T.; STRICKER, R.; SEDEHIZADE, F.; REISER, G. Identification of gene structure and subcellular localization of human centaurin  $\alpha$ 2, and p42IP4, a family of two highly homologous, Ins 1, 3, 4, 5-P4-/PtdIns 3, 4, 5-P3-binding, adapter proteins. **Journal of neurochemistry**, v. 88, n. 2, p. 326-336, 2004.

HE, K. R.; ISRAEL, A. Complementation cloning of NEMO, a component of the I $\kappa$ B kinase complex essential for NF- $\kappa$ B activation. **Cell**, v. 93, n., p. 1231-1240, 1998.

HEIDARI, M.; SARSON, A. J.; HUEBNER, M.; SHARIF, S.; KIREEV, D.; ZHOU, H. Marek's disease virus-induced immunosuppression: array analysis of chicken immune response gene expression profiling. **Viral immunology**, v. 23, n. 3, p. 309-319, 2010.

HELLGREN, O.; EKBLUM, R. Evolution of a cluster of innate immune genes ( $\beta$ -defensins) along the ancestral lines of chicken and zebra finch. **Immunome research**, v. 6, n. 1, p. 3, 2010.

HENAO-MEJIA, J.; LIU, Y.; PARK, I.-W.; ZHANG, J.; SANFORD, J.; HE, J. J. Suppression of HIV-1 Nef translation by Sam68 mutant-induced stress granules and nef mRNA sequestration. **Molecular cell**, v. 33, n. 1, p. 87-96, 2009.

HIGGS, R.; CORMICAN, P.; CAHALANE, S.; ALLAN, B.; LLOYD, A. T.; MEADE, K.; JAMES, T.; LYNN, D. J.; BABIUK, L. A.; O'FARRELLY, C. Induction of a novel chicken Toll-like receptor following *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. **Infection and immunity**, v. 74, n. 3, p. 1692-1698, 2006.

HINSHAW, V.; WEBSTER, R.; BEAN, W.; SRIRAM, G. The ecology of influenza viruses in ducks and analysis of influenza viruses with monoclonal antibodies. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 3, n. 1-2, p. 155-164, 1980.

HINSHAW, V.; WEBSTER, R.; EASTERDAY, B.; BEAN, W. J. Replication of avian influenza A viruses in mammals. **Infection and immunity**, v. 34, n. 2, p. 354-361, 1981.

HOLMES, L.; CAMPBELL, S.; DE LONG, S.; SACHS, A.; ASHE, M. Loss of translational control in yeast compromised for the major mRNA decay pathway. **Molecular and cellular biology**, v. 24, n. 7, p. 2998-3010, 2004.

HONDA, A.; NOGAMI, M.; YOKOZEKI, T.; YAMAZAKI, M.; NAKAMURA, H.; WATANABE, H.; KAWAMOTO, K.; NAKAYAMA, K.; MORRIS, A. J.; FROHMAN, M. A. Phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase  $\alpha$  is a downstream effector of the small G protein ARF6 in membrane ruffle formation. **Cell**, v. 99, n. 5, p. 521-532, 1999.

HONDA, K.; YANAI, H.; NEGISHI, H.; ASAGIRI, M.; SATO, M.; MIZUTANI, T.; SHIMADA, N.; OHBA, Y.; TAKAOKA, A.; YOSHIDA, N. IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. **Nature**, v. 434, n. 7034, p. 772, 2005.

HONDA, K.; TAKAOKA, A.; TANIGUCHI, T. Type I interferon gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors. **Immunity**, v. 25, n. 3, p. 349-360, 2006.

HONDA, K.; TANIGUCHI, T. IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 9, p. 644, 2006.

HOU, F.; SUN, L.; ZHENG, H.; SKAUG, B.; JIANG, Q.-X.; CHEN, Z. J. MAVS forms functional prion-like aggregates to activate and propagate antiviral innate immune response. **Cell**, v. 146, n. 3, p. 448-461, 2011.

HUANG, B.; QI, Z. T.; XU, Z.; NIE, P. Global characterization of interferon regulatory factor (IRF) genes in vertebrates: glimpse of the diversification in evolution. **BMC immunology**, v. 11, n. 1, p. 22, 2010.

HUANG, R. T.; ROTT, R.; KLENK, H.-D. Influenza viruses cause hemolysis and fusion of cells. **Virology**, v. 110, n. 1, p. 243-247, 1981.

HUANG, S.; CHEN, J.; CHEN, Q.; WANG, H.; YAO, Y.; CHEN, J.; CHEN, Z. A second CRM1-dependent nuclear export signal in the influenza A virus NS2 protein contributes to the nuclear export of viral ribonucleoproteins. **Journal of virology**, v. 87, n. 2, p. 767-778, 2013.

HULL, J. D.; GILMORE, R.; LAMB, R. A. Integration of a small integral membrane protein, M2, of influenza virus into the endoplasmic reticulum: analysis of the internal signal-anchor domain of a protein with an ectoplasmic NH<sub>2</sub> terminus. **The Journal of cell biology**, v. 106, n. 5, p. 1489-1498, 1988.

HUO, H.; ZHAO, L.; WANG, D.; CHEN, X.; CHEN, H. LGP2 plays a critical role in MDA5-mediated antiviral activity against duck enteritis virus. **Molecular immunology**, v. 116, n., p. 160-166, 2019.

HUSAIN, M.; CHEUNG, C.-Y. Histone deacetylase 6 inhibits influenza A virus release by downregulating the trafficking of viral components to the plasma membrane via its substrate, acetylated microtubules. **Journal of virology**, v. 88, n. 19, p. 11229-11239, 2014.

HUTCHINSON, E.; FODOR, E. Nuclear import of the influenza A virus transcriptional machinery. **Vaccine**, v. 30, n. 51, p. 7353-7358, 2012.

HUTTEN, S.; KEHLENBACH, R. H. CRM1-mediated nuclear export: to the pore and beyond. **Trends in cell biology**, v. 17, n. 4, p. 193-201, 2007.

HWANG, M. S.; BOULANGER, J.; HOWE, J. D.; ALBECKA, A.; PASCHE, M.; MUREŞAN, L.; MODIS, Y. MAVS polymers smaller than 80 nm induce mitochondrial membrane remodeling and interferon signaling. **The FEBS journal**, v. 286, n. 8, p. 1543-1560, 2019.

ICTV, I. C. O. T. O. V. **Virus Taxonomy: 2018b Release**: secondary title, 2018. 2020.

INGLIS, S. C.; GETHING, M.-J.; BROWN, C. M. Relationship between the messenger RNAs transcribed from two overlapping genes of influenza virus. **Nucleic Acids Research**, v. 8, n. 16, p. 3575-3590, 1980.

INGLIS, S. C.; BROWN, C. M. Spliced and unspliced RNAs encoded by virion RNA segment 7 of influenza virus. **Nucleic Acids Research**, v. 9, n. 12, p. 2727-2740, 1981.

ISAACS, A.; LINDENMANN, J.; VALENTINE, R. C. Pillars Article: Virus Interference. II. Some Properties of Interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 1957. 147: 268–273. **The Journal of Immunology**, v. 195, n. 5, p. 1921-1926, 2015.

ISENI, F.; GARCIN, D.; NISHIO, M.; KEDERSHA, N.; ANDERSON, P.; KOLAKOFSKY, D. Sendai virus trailer RNA binds TIAR, a cellular protein involved in virus-induced apoptosis. **The EMBO journal**, v. 21, n. 19, p. 5141-5150, 2002.

ITO, T.; COUCEIRO, J. N. S.; KELM, S.; BAUM, L. G.; KRAUSS, S.; CASTRUCCI, M. R.; DONATELLI, I.; KIDA, H.; PAULSON, J. C.; WEBSTER, R. G. Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. **Journal of virology**, v. 72, n. 9, p. 7367-7373, 1998.

IVANOV, P. A.; CHUDINOVA, E. M.; NADEZHINA, E. S. Disruption of microtubules inhibits cytoplasmic ribonucleoprotein stress granule formation. **Experimental cell research**, v. 290, n. 2, p. 227-233, 2003.

IWASAKI, A.; PILLAI, P. S. Innate immunity to influenza virus infection. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 5, p. 315-328, 2014.

JACKSON, D.; LAMB, R. A. The influenza A virus spliced messenger RNA M mRNA3 is not required for viral replication in tissue culture. **The Journal of general virology**, v. 89, n. 0 12, p. 3097, 2008.

JAGGER, B.; WISE, H.; KASH, J.; WALTERS, K.-A.; WILLS, N.; XIAO, Y.-L.; DUNFEE, R.; SCHWARTZMAN, L.; OZINSKY, A.; BELL, G. An overlapping protein-coding region in influenza A virus segment 3 modulates the host response. **Science**, v. 337, n. 6091, p. 199-204, 2012.

JAIN, S.; WHEELER, J. R.; WALTERS, R. W.; AGRAWAL, A.; BARSIC, A.; PARKER, R. ATPase-modulated stress granules contain a diverse proteome and substructure. **Cell**, v. 164, n. 3, p. 487-498, 2016.

JAN, E.; MOHR, I.; WALSH, D. A cap-to-tail guide to mRNA translation strategies in virus-infected cells. **Annual review of virology**, v. 3, n., p. 283-307, 2016.

JANG, H.-J.; LEE, H.-J.; KANG, K. S.; SONG, K.-D.; KIM, T.-H.; SONG, C.-S.; PARK, M. N. Molecular responses to the influenza A virus in chicken trachea-derived cells. **Poultry science**, v. 94, n. 6, p. 1190-1201, 2015.

JIAO, P.; WEI, L.; SONG, Y.; CUI, J.; ZHANG, S.; HAN, F.; YUAN, R.; LIAO, M. Molecular cloning and immune responsive expression of LGP2 gene, a pivotal member of the RLR gene family from Muscovy duck *Cairina moschata*. **Poultry science**, v. 94, n. 6, p. 1170-1176, 2015.

JONES, D. T.; TAYLOR, W. R.; THORNTON, J. M. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. **Bioinformatics**, v. 8, n. 3, p. 275-282, 1992.

JUANG, Y.-T.; LOWTHER, W.; KELLUM, M.; AU, W.-C.; LIN, R.; HISCOTT, J.; PITHA, P. Primary activation of interferon A and interferon B gene transcription by interferon regulatory factor 3. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 95, n. 17, p. 9837-9842, 1998.

JULKUNEN, I.; MELÉN, K.; NYQVIST, M.; PIRHONEN, J.; SARENEVA, T.; MATIKAINEN, S. Inflammatory responses in influenza A virus infection. **Vaccine**, v. 19, n., p. S32-S37, 2000.

JUUL-MADSEN, H. R.; VIERTLBOECK, B.; SMITH, A. L.; GÖBEL, T. W. Avian innate immune responses. **Avian immunology**, v., n., p. 129-158, 2008.

JUUL-MADSEN, H. R.; VIERTLBÖECK, B.; HÄRTLE, S.; SMITH, A. L.; GÖBEL, T. W. Chapter 7 - Innate Immune Responses. In: Schat, K. A., Kaspers, B., *et al* (Ed.). **Avian Immunology (Second Edition)**. Boston: Academic Press, 2014, p.121-147.

KAHN, R. A.; BRUFORD, E.; INOUE, H.; LOGSDON, J. M.; NIE, Z.; PREMONT, R. T.; RANDAZZO, P. A.; SATAKE, M.; THEIBERT, A. B.; ZAPP, M. L. Consensus nomenclature for the human ArfGAP domain-containing proteins. **The Journal of cell biology**, v. 182, n. 6, p. 1039-1044, 2008.

KAISER, P.; POH, T. Y.; ROTHWELL, L.; AVERY, S.; BALU, S.; PATHANIA, U. S.; HUGHES, S.; GOODCHILD, M.; MORRELL, S.; WATSON, M. A genomic analysis of chicken cytokines and chemokines. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 25, n. 8, p. 467-484, 2005.

KAISER, P. Advances in avian immunology—prospects for disease control: a review. **Avian Pathology**, v. 39, n. 5, p. 309-324, 2010.

KAISER, P. The long view: a bright past, a brighter future? Forty years of chicken immunology pre-and post-genome. **Avian Pathology**, v. 41, n. 6, p. 511-518, 2012.



KANG, W.; PANG, W.; HAO, J.; ZHAO, D. Isolation of avian influenza virus (H9N2) from emu in China. **Irish veterinary journal**, v. 59, n. 3, p. 148, 2006.

KARIITHI, H. M.; WELCH, C. N.; FERREIRA, H. L.; PUSCH, E. A.; ATEYA, L. O.; BINEPAL, Y. S.; APOPO, A. A.; DULU, T. D.; AFONSO, C. L.; SUAREZ, D. L. Genetic characterization and pathogenesis of the first H9N2 low pathogenic avian influenza viruses isolated from chickens in Kenyan live bird markets. **Infection, genetics and evolution**, v. 78, n., p. 104074, 2020.

KARPALA, A. J.; MORRIS, K. R.; BROADWAY, M. M.; MCWATERS, P. G.; O'NEIL, T. E.; GOOSSENS, K. E.; LOWENTHAL, J. W.; BEAN, A. G. Molecular cloning, expression, and characterization of chicken IFN- $\lambda$ . **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 28, n. 6, p. 341-350, 2008.

KARPALA, A. J.; STEWART, C.; MCKAY, J.; LOWENTHAL, J. W.; BEAN, A. G. Characterization of chicken Mda5 activity: regulation of IFN- $\beta$  in the absence of RIG-I functionality. **The Journal of Immunology**, v. 186, n. 9, p. 5397-5405, 2011.

KATO, H.; TAKEUCHI, O.; SATO, S.; YONEYAMA, M.; YAMAMOTO, M.; MATSUI, K.; UEMATSU, S.; JUNG, A.; KAWAI, T.; ISHII, K. J. Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. **Nature**, v. 441, n. 7089, p. 101, 2006.

KATO, H.; TAKEUCHI, O.; MIKAMO-SATOH, E.; HIRAI, R.; KAWAI, T.; MATSUSHITA, K.; HIIRAGI, A.; DERMODY, T. S.; FUJITA, T.; AKIRA, S. Length-dependent recognition of double-stranded ribonucleic acids by retinoic acid-inducible gene-I and melanoma differentiation-associated gene 5. **Journal of Experimental Medicine**, v. 205, n. 7, p. 1601-1610, 2008.

KATO, H.; TAKAHASHI, K.; FUJITA, T. RIG-I-like receptors: cytoplasmic sensors for non-self RNA. **Immunological reviews**, v. 243, n. 1, p. 91-98, 2011.

KAWAI, T.; TAKAHASHI, K.; SATO, S.; COBAN, C.; KUMAR, H.; KATO, H.; ISHII, K. J.; TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. IPS-1, an adaptor triggering RIG-I- and Mda5-mediated type I interferon induction. **Nat Immunol**, v. 6, n. 10, p. 981-988, 2005.

KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. **Nature immunology**, v. 11, n. 5, p. 373-384, 2010.

KAWAOKA, Y. **Influenza virology: current topics**: Caister Academic Press, 2006  
KEDERSHA, N.; CHO, M. R.; LI, W.; YACONO, P. W.; CHEN, S.; GILKS, N.; GOLAN, D. E.; ANDERSON, P. Dynamic shuttling of TIA-1 accompanies the recruitment of mRNA to mammalian stress granules. **The Journal of cell biology**, v. 151, n. 6, p. 1257-1268, 2000.

KEDERSHA, N.; STOECKLIN, G.; AYODELE, M.; YACONO, P.; LYKKE-ANDERSEN, J.; FRITZLER, M. J.; SCHEUNER, D.; KAUFMAN, R. J.; GOLAN, D. E.; ANDERSON, P. Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. **The Journal of cell biology**, v. 169, n. 6, p. 871-884, 2005.

KEDERSHA, N.; ANDERSON, P. Mammalian stress granules and processing bodies. **Methods in enzymology**, v. 431, n., p. 61-81, 2007.

KEDERSHA, N.; IVANOV, P.; ANDERSON, P. Stress granules and cell signaling: more than just a passing phase? **Trends in biochemical sciences**, v. 38, n. 10, p. 494-506, 2013.

KEDERSHA, N. L.; GUPTA, M.; LI, W.; MILLER, I.; ANDERSON, P. RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 $\alpha$  to the assembly of mammalian stress granules. **The Journal of cell biology**, v. 147, n. 7, p. 1431-1442, 1999.

KEINER, B.; MAENZ, B.; WAGNER, R.; CATTOLI, G.; CAPUA, I.; KLENK, H.-D. Intracellular distribution of NS1 correlates with the infectivity and interferon antagonism of an avian influenza virus (H7N1). **Journal of virology**, v. 84, n. 22, p. 11858-11865, 2010.

KHAMPEERATHUCH, T.; MUDSAK, A.; SRIKOK, S.; VANNAMAHAXAY, S.; CHOTINUN, S.; CHUAMMITRI, P. Differential gene expression in heterophils isolated from commercial hybrid and Thai indigenous broiler chickens under quercetin supplementation. **Journal of Applied Animal Research**, v. 46, n. 1, p. 804-812, 2018.

KHAPERSKYY, D. A.; HATCHETTE, T. F.; MCCORMICK, C. Influenza A virus inhibits cytoplasmic stress granule formation. **The FASEB Journal**, v. 26, n. 4, p. 1629-1639, 2012.

KHAPERSKYY, D. A.; EMARA, M. M.; JOHNSTON, B. P.; ANDERSON, P.; HATCHETTE, T. F.; MCCORMICK, C. Influenza a virus host shutoff disables antiviral stress-induced translation arrest. **PLoS pathogens**, v. 10, n. 7, p., 2014.

KILLIAN, M. L. Hemagglutination assay for the avian influenza virus. In: (Ed.). **Avian influenza virus**: Springer, 2008, p.47-52.

KIM, S. S.-Y.; SZE, L.; LAM, K.-P. The stress granule protein G3BP1 binds viral dsRNA and RIG-I to enhance interferon- $\beta$  response. **Journal of Biological Chemistry**, v. 294, n. 16, p. 6430-6438, 2019.

KIM, W. J.; BACK, S. H.; KIM, V.; RYU, I.; JANG, S. K. Sequestration of TRAF2 into stress granules interrupts tumor necrosis factor signaling under stress conditions. **Molecular and cellular biology**, v. 25, n. 6, p. 2450-2462, 2005.

KLENK, H.-D.; ROTT, R.; ORLICH, M.; BLÖDORN, J. Activation of influenza A viruses by trypsin treatment. **Virology**, v. 68, n. 2, p. 426-439, 1975.

KNIGHT, K. L. Restricted VH gene usage and generation of antibody diversity in rabbit. **Annual review of immunology**, v. 10, n. 1, p. 593-616, 1992.

KOBAYASHI, A.; VOON, D. C.-C.; KODERA, N.; ANDO, T.; WONG, R. W. Direct visualization of avian influenza H5N1 hemagglutinin precursor and its conformational change by high-speed atomic force microscopy. v., n., p.

KOMAR, A. A.; HATZOGLOU, M. Internal ribosome entry sites in cellular mRNAs: mystery of their existence. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 25, p. 23425-23428, 2005.

KOONIN, E. V. Virology: Gulliver among the lilliputians. **Current Biology**, v. 15, n. 5, p. R167-R169, 2005.

KUHN, J. H.; WOLF, Y. I.; KRUPOVIC, M.; ZHANG, Y.-Z.; MAES, P.; DOLJA, V. V.; KOONIN, E. V. **Classify viruses—the gain is worth the pain**: secondary title: Nature Publishing Group, 2019.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. **Molecular biology and evolution**, v. 33, n. 7, p. 1870-1874, 2016.

LA SCOLA, B.; AUDIC, S.; ROBERT, C.; JUNGANG, L.; DE LAMBALLERIE, X.; DRANCOURT, M.; BIRTLES, R.; CLAVERIE, J.-M.; RAOULT, D. A giant virus in amoebae. **Science**, v. 299, n. 5615, p. 2033-2033, 2003.

LIDLAW, S. M.; ROBEY, R.; DAVIES, M.; GIOTIS, E. S.; ROSS, C.; BUTTIGIEG, K.; GOODBOURN, S.; SKINNER, M. A. Genetic screen of a mutant poxvirus library identifies an ankyrin repeat protein involved in blocking induction of avian type I interferon. **Journal of virology**, v. 87, n. 9, p. 5041-5052, 2013.

LAKADAMYALI, M.; RUST, M. J.; ZHUANG, X. Endocytosis of influenza viruses. **Microbes and infection**, v. 6, n. 10, p. 929-936, 2004.

LAM, T. T.-Y.; WANG, J.; SHEN, Y.; ZHOU, B.; DUAN, L.; CHEUNG, C.-L.; MA, C.; LYCETT, S. J.; LEUNG, C. Y.-H.; CHEN, X. The genesis and source of the H7N9 influenza viruses causing human infections in China. **Nature**, v. 502, n. 7470, p. 241-244, 2013.

LAMB, R. A.; LAI, C.-J. Sequence of interrupted and uninterrupted mRNAs and cloned DNA coding for the two overlapping nonstructural proteins of influenza virus. **Cell**, v. 21, n. 2, p. 475-485, 1980.

LAMB, R. A.; LAI, C.-J.; CHOPPIN, P. W. Sequences of mRNAs derived from genome RNA segment 7 of influenza virus: colinear and interrupted mRNAs code for overlapping proteins. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 78, n. 7, p. 4170-4174, 1981.

LAMB, R. A.; CHOPPIN, P. W. Identification of a second protein (M2) encoded by RNA segment 7 of influenza virus. **Virology**, v. 112, n. 2, p. 729-737, 1981.

LANGEREIS, M. A.; FENG, Q.; VAN KUPPEVELD, F. J. MDA5 localizes to stress granules, but this localization is not required for the induction of type I interferon. **Journal of virology**, v. 87, n. 11, p. 6314-6325, 2013.

LAZAROWITZ, S. G.; COMPANS, R. W.; CHOPPIN, P. W. Influenza virus structural and nonstructural proteins in infected cells and their plasma membranes. **Virology**, v. 46, n. 3, p. 830-843, 1971.

LÉCUYER, E.; YOSHIDA, H.; PARTHASARATHY, N.; ALM, C.; BABAK, T.; CEROVINA, T.; HUGHES, T. R.; TOMANCAK, P.; KRAUSE, H. M. Global analysis of mRNA localization reveals a prominent role in organizing cellular architecture and function. **Cell**, v. 131, n. 1, p. 174-187, 2007.

LEE, C.-W.; JUNG, K.; JADHAO, S.; SUAREZ, D. Evaluation of chicken-origin (DF-1) and quail-origin (QT-6) fibroblast cell lines for replication of avian influenza viruses. **Journal of virological methods**, v. 153, n. 1, p. 22-28, 2008.

LEE, D.-H.; CRIADO, M. F.; SWAYNE, D. E. Pathobiological Origins and Evolutionary History of Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses. **Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine**, v., n., p. a038679, 2020.

LENEVA, I. A.; GOLOUBEVA, O.; FENTON, R. J.; TISDALE, M.; WEBSTER, R. G. Efficacy of zanamivir against avian influenza A viruses that possess genes encoding H5N1 internal proteins and are pathogenic in mammals. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 45, n. 4, p. 1216-1224, 2001.

LI, H.; ZHAI, Y.; FAN, Y.; CHEN, H.; ZHANG, A.; JIN, H.; LUO, R. Molecular cloning and functional characterization of duck mitochondrial antiviral-signaling protein (MAVS). **Developmental & Comparative Immunology**, v. 56, n., p. 1-6, 2016.

LI, S.; WANG, L.; BERMAN, M.; KONG, Y.-Y.; DORF, M. E. Mapping a dynamic innate immunity protein interaction network regulating type I interferon production. **Immunity**, v. 35, n. 3, p. 426-440, 2011.

LI, Y. R.; KING, O. D.; SHORTER, J.; GITLER, A. D. Stress granules as crucibles of ALS pathogenesis. **Journal of cell biology**, v. 201, n. 3, p. 361-372, 2013.

LIFE SCIENCE, M. **Tags and Tag Antibodies**: secondary title, 2020. 2020.

LIN, R.; HEYLBROECK, C.; PITHA, P. M.; HISCOTT, J. Virus-dependent phosphorylation of the IRF-3 transcription factor regulates nuclear translocation, transactivation potential, and proteasome-mediated degradation. **Molecular and cellular biology**, v. 18, n. 5, p. 2986-2996, 1998.

LIN, Y.; PROTTER, D. S.; ROSEN, M. K.; PARKER, R. Formation and maturation of phase-separated liquid droplets by RNA-binding proteins. **Molecular cell**, v. 60, n. 2, p. 208-219, 2015.

LINIGER, M.; SUMMERFIELD, A.; ZIMMER, G.; MCCULLOUGH, K. C.; RUGGLI, N. Chicken cells sense influenza A virus infection through MDA5 and CARDIF signaling involving LGP2. **Journal of virology**, v. 86, n. 2, p. 705-717, 2012.

LIPKIND, M.; SHIHMANTER, E.; SHOHAM, D. Further Characterization of H 7 N 7 Avian Influenza Virus Isolated from Migrating Starlings Wintering in Israel. **Zentralblatt für Veterinärmedizin Reihe B**, v. 29, n. 7, p. 566-572, 1982.

LIU, D. **Molecular detection of foodborne pathogens**: CRC press, 2009  
LIU, S.; CHEN, J.; CAI, X.; WU, J.; CHEN, X.; WU, Y.-T.; SUN, L.; CHEN, Z. J. MAVS recruits multiple ubiquitin E3 ligases to activate antiviral signaling cascades. **Elife**, v. 2, n., p. e00785, 2013.

LIU, S.; CAI, X.; WU, J.; CONG, Q.; CHEN, X.; LI, T.; DU, F.; REN, J.; WU, Y.-T.; GRISHIN, N. V. Phosphorylation of innate immune adaptor proteins MAVS, STING, and TRIF induces IRF3 activation. **Science**, v. 347, n. 6227, p. aaa2630, 2015.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2-  $\Delta\Delta CT$  method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, 2001.

LOSCHI, M.; LEISHMAN, C. C.; BERARDONE, N.; BOCCACCIO, G. L. Dynein and kinesin regulate stress-granule and P-body dynamics. **Journal of cell science**, v. 122, n. 21, p. 3973-3982, 2009.

LU, Y.; WAMBACH, M.; KATZE, M. G.; KRUG, R. M. Binding of the influenza virus NS1 protein to double-stranded RNA inhibits the activation of the protein kinase that phosphorylates the eIF-2 translation initiation factor. **Virology**, v. 214, n. 1, p. 222-228, 1995.

LWOFF, A. The concept of virus. **Microbiology**, v. 17, n. 2, p. 239-253, 1957.

MA, K.; ROY, A.-M. M.; WHITTAKER, G. R. Nuclear export of influenza virus ribonucleoproteins: identification of an export intermediate at the nuclear periphery. **Virology**, v. 282, n. 2, p. 215-220, 2001.

MA, W.; KAHN, R. E.; RICHT, J. A. The pig as a mixing vessel for influenza viruses: human and veterinary implications. **Journal of molecular and genetic medicine: an international journal of biomedical research**, v. 3, n. 1, p. 158, 2009.

MACLACHLAN, N.; DUBOVI, E. **Chapter 21: Orthomyxoviridae**: secondary title: Fenner's Veterinary Virology, 4th edn. Saint Louis, MO: Academic Press, 2011.

MAEDA, T.; KAWASAKI, K.; OHNISHI, S.-L. Interaction of influenza virus hemagglutinin with target membrane lipids is a key step in virus-induced hemolysis and fusion at pH 5.2. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 78, n. 7, p. 4133-4137, 1981.

MAGOR, K. E.; MIRANZO NAVARRO, D.; BARBER, M. R. W.; PETKAU, K.; FLEMING-CANEPA, X.; BLYTH, G. A. D.; BLAINE, A. H. Defense genes missing from the flight division. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 41, n. 3, p. 377-388, 2013.

MAIR, C. M.; LUDWIG, K.; HERRMANN, A.; SIEBEN, C. Receptor binding and pH stability—how influenza A virus hemagglutinin affects host-specific virus infection. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1838, n. 4, p. 1153-1168, 2014.

MANIVANNAN, P.; SIDDIQUI, M. A.; MALATHI, K. RNase L amplifies Interferon signaling by inducing PKR-mediated antiviral stress granules. **bioRxiv**, v., n., p., 2020.

MAO, A.-P.; LI, S.; ZHONG, B.; LI, Y.; YAN, J.; LI, Q.; TENG, C.; SHU, H.-B. Virus-triggered ubiquitination of TRAF3/6 by cIAP1/2 is essential for induction of interferon- $\beta$  (IFN- $\beta$ ) and cellular antiviral response. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 13, p. 9470-9476, 2010.

MAPA. **INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 50, DE 24 DE SETEMBRO DE 2013**: secondary title, 2013, 6 p.

MARJUKI, H.; GORNITZKY, A.; MARATHE, B. M.; ILYUSHINA, N. A.; ALDRIDGE, J. R.; DESAI, G.; WEBBY, R. J.; WEBSTER, R. G. Influenza A virus-induced early activation of ERK and PI3K mediates V-ATPase-dependent intracellular pH change required for fusion. **Cellular microbiology**, v. 13, n. 4, p. 587-601, 2011.

MARKOWSKA, M.; MAJEWSKI, P. M.; SKWARŁO-SOŃTA, K. Avian biological clock—Immune system relationship. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 66, n., p. 130-138, 2017.

MARSH, M.; HELENIUS, A. Virus entry: open sesame. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 729-740, 2006.

MARTIN, K.; HELENIUS, A. Transport of incoming influenza virus nucleocapsids into the nucleus. **Journal of virology**, v. 65, n. 1, p. 232-244, 1991.

MARTIN, K.; HELENIUS, A. Nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins: the viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import. **Cell**, v. 67, n. 1, p. 117-130, 1991.

MARTIN, K. C.; EPHRUSSI, A. mRNA localization: gene expression in the spatial dimension. **Cell**, v. 136, n. 4, p. 719-730, 2009.

MARTINI, M. C. Avaliação in vitro da atividade antiviral de extratos de plantas frente ao metapneumovirus aviário (AMPV) e vírus respiratório sincicial bovino (BRSV). v., n., p., 2010.

MATROSOVICH, M. N.; MATROSOVICH, T. Y.; GRAY, T.; ROBERTS, N. A.; KLENK, H.-D. Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 13, p. 4620-4624, 2004.

MATSUKI, H.; TAKAHASHI, M.; HIGUCHI, M.; MAKOKHA, G. N.; OIE, M.; FUJII, M. Both G 3 BP 1 and G 3 BP 2 contribute to stress granule formation. **Genes to cells**, v. 18, n. 2, p. 135-146, 2013.

MAURER-STROH, S.; LEE, R. T.; GUNALAN, V.; EISENHABER, F. The highly pathogenic H7N3 avian influenza strain from July 2012 in Mexico acquired an extended cleavage site through recombination with host 28S rRNA. **Virology**, v. 10, n. 1, p. 139, 2013.

MCCARTNEY, S. A.; THACKRAY, L. B.; GITLIN, L.; GILFILLAN, S.; VIRGIN IV, H. W.; COLONNA, M. MDA-5 recognition of a murine norovirus. **PLoS pathogens**, v. 4, n. 7, p. e1000108, 2008.

MCCORMICK, C.; KHAPERSKY, D. A. Translation inhibition and stress granules in the antiviral immune response. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 10, p. 647, 2017.

MCEWEN, E.; KEDERSHA, N.; SONG, B.; SCHEUNER, D.; GILKS, N.; HAN, A.; CHEN, J.-J.; ANDERSON, P.; KAUFMAN, R. J. Heme-regulated inhibitor kinase-mediated phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 inhibits translation, induces stress granule formation, and mediates survival upon arsenite exposure. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 17, p. 16925-16933, 2005.

MEADE, K. G.; HIGGS, R.; LLOYD, A. T.; GILES, S.; O'FARRELLY, C. Differential antimicrobial peptide gene expression patterns during early chicken embryological development. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 33, n. 4, p. 516-524, 2009.

MEHLE, A. Unusual influenza A viruses in bats. **Viruses**, v. 6, n. 9, p. 3438-3449, 2014.

MEMORANDUM, W. A revision of the system of nomenclature for influenza viruses: a WHO memorandum. **Bull World Health Organ**, v. 58, n., p. 585-591, 1980.

MENA, I.; NELSON, M. I.; QUEZADA-MONROY, F.; DUTTA, J.; CORTES-FERNÁNDEZ, R.; LARA-PUENTE, J. H.; CASTRO-PERALTA, F.; CUNHA, L. F.; TROVÃO, N. S.; LOZANO-DUBERNARD, B. Origins of the 2009 H1N1 influenza pandemic in swine in Mexico. **Elife**, v. 5, n., p. e16777, 2016.

MERCER, J.; HELENIUS, A. Virus entry by macropinocytosis. **Nature cell biology**, v. 11, n. 5, p. 510-520, 2009.

MEYLAN, E.; CURRAN, J.; HOFMANN, K.; MORADPOUR, D. Cardif is an adaptor protein in the RIG-I antiviral pathway and is targeted by hepatitis C virus. **Nature**, v. 437, n. 7062, p. 1167, 2005.

MIRE, C. E.; WHITE, J. M.; WHITT, M. A. A spatio-temporal analysis of matrix protein and nucleocapsid trafficking during vesicular stomatitis virus uncoating. **PLoS pathogens**, v. 6, n. 7, p. e1000994, 2010.

MOMOSE, F.; BASLER, C. F.; O'NEILL, R. E.; IWAMATSU, A.; PALESE, P.; NAGATA, K. Cellular splicing factor RAF-2p48/NPI-5/BAT1/UAP56 interacts with the

influenza virus nucleoprotein and enhances viral RNA synthesis. **Journal of virology**, v. 75, n. 4, p. 1899-1908, 2001.

MOORE, M.; OWEN, J. Chromosome marker studies on the development of the haemopoietic system in the chick embryo. **Nature**, v. 208, n. 5014, p. 956, 1965.

MOORE, M.; OWEN, J. Experimental studies on the development of the thymus. **Journal of Experimental Medicine**, v. 126, n. 4, p. 715-726, 1967.

MORGAN, I.; KELLY, A. Epidemiology of an avian influenza outbreak in Victoria in 1985. **Australian veterinary journal**, v. 67, n. 4, p. 125-128, 1990.

MORGAT, A.; LOMBARDOT, T.; COUDERT, E.; AXELSEN, K.; NETO, T. B.; GEHANT, S.; BANSAL, P.; BOLLEMAN, J.; GASTEIGER, E.; DE CASTRO, E.; BARATIN, D.; POZZATO, M.; XENARIOS, I.; POUX, S.; REDASCHI, N.; BRIDGE, A.; CONSORTIUM, T. U. Enzyme annotation in UniProtKB using Rhea. **Bioinformatics**, v., n., p., 2019.

MOSTAFA, A.; ABDELWHAB, E. M.; METTENLEITER, T. C.; PLESCHKA, S. Zoonotic potential of influenza A viruses: a comprehensive overview. **Viruses**, v. 10, n. 9, p. 497, 2018.

MUNIER, S.; LARCHER, T.; CORMIER-ALINE, F.; SOUBIEUX, D.; SU, B.; GUIGAND, L.; LABROSSE, B.; CHEREL, Y.; QUÉRÉ, P.; MARC, D. A genetically engineered waterfowl influenza virus with a deletion in the stalk of the neuraminidase has increased virulence for chickens. **Journal of virology**, v. 84, n. 2, p. 940-952, 2010.

MUNIR, S.; KAPUR, V. Regulation of host cell transcriptional physiology by the avian pneumovirus provides key insights into host-pathogen interactions. **Journal of virology**, v. 77, n. 8, p. 4899-4910, 2003.

MUNIR, S.; SHARMA, J. M.; KAPUR, V. Transcriptional response of avian cells to infection with Newcastle disease virus. **Virus research**, v. 107, n. 1, p. 103-108, 2005.

MURAMOTO, Y.; NODA, T.; KAWAKAMI, E.; AKKINA, R.; KAWAOKA, Y. Identification of novel influenza A virus proteins translated from PA mRNA. **Journal of virology**, v. 87, n. 5, p. 2455-2462, 2013.

NAITO, T.; KIYASU, Y.; SUGIYAMA, K.; KIMURA, A.; NAKANO, R.; MATSUKAGE, A.; NAGATA, K. An influenza virus replicon system in yeast identified Tat-SF1 as a stimulatory host factor for viral RNA synthesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 46, p. 18235-18240, 2007.

NAKHAEI, P.; MESPLEDE, T.; SOLIS, M.; SUN, Q.; ZHAO, T.; YANG, L.; CHUANG, T.-H.; WARE, C. F.; LIN, R.; HISCOTT, J. The E3 ubiquitin ligase Triad3A negatively regulates the RIG-I/MAVS signaling pathway by targeting TRAF3 for degradation. **PLoS pathogens**, v. 5, n. 11, p. e1000650, 2009.



NALLAGATLA, S. R.; TORONEY, R.; BEVILACQUA, P. C. Regulation of innate immunity through RNA structure and the protein kinase PKR. **Current opinion in structural biology**, v. 21, n. 1, p. 119-127, 2011.

NALLAR, R.; PAPP, Z.; LEIGHTON, F. A.; EPP, T.; PASICK, J.; BERHANE, Y.; LINDSAY, R.; SOOS, C. Ecological determinants of Avian Influenza Virus, West Nile Virus, and Avian Paramyxovirus infection and antibody status in blue-winged teal (*Anas Discors*) in the Canadian prairies. **Journal of wildlife diseases**, v. 52, n. 1, p. 33-46, 2016.

NAYAK, D. P.; HUI, E. K.-W.; BARMAN, S. Assembly and budding of influenza virus. **Virus research**, v. 106, n. 2, p. 147-165, 2004.

NBBJ. **Revitalizing Research**: secondary title: NBBJ, 2019. 2019.

NEERUKONDA, S. N.; KATNENI, U. Avian Pattern Recognition Receptor Sensing and Signaling. **Veterinary sciences**, v. 7, n. 1, p. 14, 2020.

NELSON, M. I.; HOLMES, E. C. The evolution of epidemic influenza. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, n. 3, p. 196-205, 2007.

NERREN, J. R.; SWAGGERTY, C. L.; MACKINNON, K. M.; GENOVESE, K. J.; HE, H.; PEVZNER, I.; KOGUT, M. H. Differential mRNA expression of the avian-specific toll-like receptor 15 between heterophils from *Salmonella*-susceptible and-resistant chickens. **Immunogenetics**, v. 61, n. 1, p. 71-77, 2009.

NERREN, J. R.; HE, H.; GENOVESE, K.; KOGUT, M. H. Expression of the avian-specific toll-like receptor 15 in chicken heterophils is mediated by gram-negative and gram-positive bacteria, but not TLR agonists. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 136, n. 1, p. 151-156, 2010.

NESTOROWICZ, A.; KAWAOKA, Y.; BEAN, W. J.; WEBSTER, R. G. Molecular analysis of the hemagglutinin genes of Australian H7N7 influenza viruses: role of passerine birds in maintenance or transmission? **Virology**, v. 160, n. 2, p. 411-418, 1987.

NEUMANN, G.; HUGHES, M. T.; KAWAOKA, Y. Influenza A virus NS2 protein mediates vRNP nuclear export through NES-independent interaction with hCRM1. **The EMBO journal**, v. 19, n. 24, p. 6751-6758, 2000.

NING, S.; PAGANO, J.; BARBER, G. IRF7: activation, regulation, modification and function. **Genes and immunity**, v. 12, n. 6, p. 399, 2011.

NUÑEZ, I. A.; ROSS, T. M. A review of H5Nx avian influenza viruses. **Therapeutic advances in vaccines and immunotherapy**, v. 7, n., p. 2515135518821625, 2019.

O'BRIEN, T. R.; PROKUNINA-OLSSON, L.; DONNELLY, R. P. IFN- $\lambda$ 4: the paradoxical new member of the interferon lambda family. **Journal of Interferon & Cytokine Research**, v. 34, n. 11, p. 829-838, 2014.

OFFLU. **Influenza A Cleavage Sites:** secondary title.  
[http://www.offlu.net/fileadmin/home/en/resource-centre/pdf/Influenza\\_A\\_Cleavage\\_Sites.pdf](http://www.offlu.net/fileadmin/home/en/resource-centre/pdf/Influenza_A_Cleavage_Sites.pdf)  
 OIE, 2020. 2020.

OIE. **Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals: Avian Influenza:** secondary title: World Organization for Animal Health Paris, France, 2016.

OLÁH, I.; NAGY, N. Retrospection to discovery of bursal function and recognition of avian dendritic cells; past and present. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 41, n. 3, p. 310-315, 2013.

OLÁH, I.; NAGY, N.; VERVELDE, L. Structure of the avian lymphoid system. In: (Ed.). **Avian immunology:** Elsevier, 2014, p.11-44.

ONOMOTO, K.; JOGI, M.; YOO, J.-S.; NARITA, R.; MORIMOTO, S.; TAKEMURA, A.; SAMBHARA, S.; KAWAGUCHI, A.; OSARI, S.; NAGATA, K. Critical role of an antiviral stress granule containing RIG-I and PKR in viral detection and innate immunity. **PloS one**, v. 7, n. 8, p. e43031, 2012.

ONOMOTO, K.; YONEYAMA, M.; FUNG, G.; KATO, H.; FUJITA, T. Antiviral innate immunity and stress granule responses. **Trends in immunology**, v. 35, n. 9, p. 420-428, 2014.

OSHIUMI, H.; MIYASHITA, M.; INOUE, N.; OKABE, M.; MATSUMOTO, M.; SEYA, T. The ubiquitin ligase Riplet is essential for RIG-I-dependent innate immune responses to RNA virus infection. **Cell host & microbe**, v. 8, n. 6, p. 496-509, 2010.

PALESE, P.; SCHULMAN, J. L. Mapping of the influenza virus genome: identification of the hemagglutinin and the neuraminidase genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 73, n. 6, p. 2142-2146, 1976.

PALESE, P. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. **Fields virology**, v., n., p. 1647-1689, 2007.

PANTIN-JACKWOOD, M. J.; COSTA-HURTADO, M.; SHEPHERD, E.; DEJESUS, E.; SMITH, D.; SPACKMAN, E.; KAPCZYNSKI, D. R.; SUAREZ, D. L.; STALLKNECHT, D. E.; SWAYNE, D. E. Pathogenicity and transmission of H5 and H7 highly pathogenic avian influenza viruses in mallards. **Journal of virology**, v. 90, n. 21, p. 9967-9982, 2016.

PANTIN-JACKWOOD, M. J.; STEPHENS, C. B.; BERTRAN, K.; SWAYNE, D. E.; SPACKMAN, E. The pathogenesis of H7N8 low and highly pathogenic avian influenza viruses from the United States 2016 outbreak in chickens, turkeys and mallards. **PloS one**, v. 12, n. 5, p. e0177265, 2017.

PARKER, R.; SHETH, U. P bodies and the control of mRNA translation and degradation. **Molecular cell**, v. 25, n. 5, p. 635-646, 2007.

PASICK, J.; HANDEL, K.; ROBINSON, J.; COPPS, J.; RIDD, D.; HILLS, K.; KEHLER, H.; COTTAM-BIRT, C.; NEUFELD, J.; BERHANE, Y. Intersegmental recombination

between the haemagglutinin and matrix genes was responsible for the emergence of a highly pathogenic H7N3 avian influenza virus in British Columbia. **Journal of General Virology**, v. 86, n. 3, p. 727-731, 2005.

PATEL, K. P.; COYNE, C. B.; BERGELSON, J. M. Dynamin-and lipid raft-dependent entry of decay-accelerating factor (DAF)-binding and non-DAF-binding coxsackieviruses into nonpolarized cells. **Journal of virology**, v. 83, n. 21, p. 11064-11077, 2009.

PEROVAL, M. Y.; BOYD, A. C.; YOUNG, J. R.; SMITH, A. L. A critical role for MAPK signalling pathways in the transcriptional regulation of toll like receptors. **PloS one**, v. 8, n. 2, p., 2013.

PHILIPPA, J. D.; MUNSTER, V. J.; VAN BOLHUIS, H.; BESTEBROER, T. M.; SCHAFTENAAR, W.; BEYER, W. E.; FOUCHIER, R. A.; KUIKEN, T.; OSTERHAUS, A. D. Highly pathogenic avian influenza (H7N7): vaccination of zoo birds and transmission to non-poultry species. **Vaccine**, v. 23, n. 50, p. 5743-5750, 2005.

PICHLMAIR, A.; SCHULZ, O.; TAN, C.-P.; REHWINKEL, J.; KATO, H.; TAKEUCHI, O.; AKIRA, S.; WAY, M.; SCHIAVO, G.; E SOUSA, C. R. Activation of MDA5 requires higher-order RNA structures generated during virus infection. **Journal of virology**, v. 83, n. 20, p. 10761-10769, 2009.

PIOTROWSKA, J.; HANSEN, S. J.; PARK, N.; JAMKA, K.; SARNOW, P.; GUSTIN, K. E. Stable formation of compositionally unique stress granules in virus-infected cells. **Journal of virology**, v. 84, n. 7, p. 3654-3665, 2010.

POPPER, K. **The logic of scientific discovery**: Routledge, 2005

PORTELA, A. N.; DIGARD, P. The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. **Journal of General Virology**, v. 83, n. 4, p. 723-734, 2002.

PRAKASH, A.; LEVY, D. E. Regulation of IRF7 through cell type-specific protein stability. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 342, n. 1, p. 50-56, 2006.

PROTTER, D. S.; PARKER, R. Principles and properties of stress granules. **Trends in cell biology**, v. 26, n. 9, p. 668-679, 2016.

PULLOOR, N. K.; NAIR, S.; KOSTIC, A. D.; BIST, P.; WEAVER, J. D.; RILEY, A. M.; TYAGI, R.; UCHIL, P. D.; YORK, J. D.; SNYDER, S. H. Human genome-wide RNAi screen identifies an essential role for inositol pyrophosphates in Type-I interferon response. **PLoS pathogens**, v. 10, n. 2, p. e1003981, 2014.

QU, H.; YANG, L.; MENG, S.; XU, L.; BI, Y.; JIA, X.; LI, J.; SUN, L.; LIU, W. The differential antiviral activities of chicken interferon  $\alpha$  (ChIFN- $\alpha$ ) and ChIFN- $\beta$  are related to distinct interferon-stimulated gene expression. **PloS one**, v. 8, n. 3, p. e59307, 2013.

RADHAKRISHNA, H.; AL-AWAR, O.; KHACHIKIAN, Z.; DONALDSON, J. G. ARF6 requirement for Rac ruffling suggests a role for membrane trafficking in cortical actin rearrangements. **Journal of cell science**, v. 112, n. 6, p. 855-866, 1999.

RAMASWAMI, M.; TAYLOR, J. P.; PARKER, R. Altered ribostasis: RNA-protein granules in degenerative disorders. **Cell**, v. 154, n. 4, p. 727-736, 2013.

RANDALL, R. E.; GOODBOURN, S. Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. **Journal of General Virology**, v. 89, n. 1, p. 1-47, 2008.

RANDAZZO, P. A.; INOUE, H.; BHARTI, S. Arf GAPs as regulators of the actin cytoskeleton. **Biology of the Cell**, v. 99, n. 10, p. 583-600, 2007.

RAOULT, D. The Journey from Rickettsia to Mimivirus-Studying Rickettsia may help us to understand how viruses originated and may lead us to change how we define them. **ASM News-American Society for Microbiology**, v. 71, n. 6, p. 278-284, 2005.

RAOULT, D. TRUC or the need for a new microbial classification. **Intervirology**, v. 56, n. 6, p. 349-353, 2013.

READ, E. K.; DIGARD, P. Individual influenza A virus mRNAs show differential dependence on cellular NXF1/TAP for their nuclear export. **The Journal of general virology**, v. 91, n. Pt 5, p. 1290, 2010.

REED, L.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. **Am. J. Hyg**, v. 27, n. 3, p. 493-498, 1938.

REID, A. H.; TAUBENBERGER, J. K. The origin of the 1918 pandemic influenza virus: a continuing enigma. **Journal of General Virology**, v. 84, n. 9, p. 2285-2292, 2003.

REIKINE, S.; NGUYEN, J. B.; MODIS, Y. Pattern recognition and signaling mechanisms of RIG-I and MDA5. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n., p. 342, 2014.

REINEKE, L. C.; KEDERSHA, N.; LANGEREIS, M. A.; VAN KUPPEVELD, F. J.; LLOYD, R. E. Stress granules regulate double-stranded RNA-dependent protein kinase activation through a complex containing G3BP1 and Caprin1. **MBio**, v. 6, n. 2, p. e02486-02414, 2015.

REINEKE, L. C.; LLOYD, R. E. The stress granule protein G3BP1 recruits protein kinase R to promote multiple innate immune antiviral responses. **Journal of virology**, v. 89, n. 5, p. 2575-2589, 2015.

RESA-INFANTE, P.; JORBA, N.; ZAMARREÑO, N.; FERNÁNDEZ, Y.; JUÁREZ, S.; ORTÍN, J. The host-dependent interaction of  $\alpha$ -importins with influenza PB2 polymerase subunit is required for virus RNA replication. **PloS one**, v. 3, n. 12, p., 2008.

REUTER, A.; SOUBIES, S.; HÄRTLE, S.; SCHUSSER, B.; KASPERS, B.; STAEHELI, P.; RUBBENSTROTH, D. Antiviral activity of lambda interferon in chickens. **Journal of virology**, v. 88, n. 5, p. 2835-2843, 2014.

REYNAUD, C.-A.; ANQUEZ, V.; DAHAN, A.; WEILL, J.-C. A single rearrangement event generates most of the chicken immunoglobulin light chain diversity. **Cell**, v. 40, n. 2, p. 283-291, 1985.

REYNAUD, C.-A.; DAHAN, A.; ANQUEZ, V.; WEILL, J.-C. Somatic hyperconversion diversifies the single Vh gene of the chicken with a high incidence in the D region. **Cell**, v. 59, n. 1, p. 171-183, 1989.

RICHARD, M.; FOUCHIER, R.; MONNE, I. **Mechanisms and risk factors for mutation from low to highly pathogenic avian influenza virus.**: secondary title: EFSA, 2017.

RIDLEY, A. J. Membrane ruffling and signal transduction. **Bioessays**, v. 16, n. 5, p. 321-327, 1994.

RIES, S.; KÄUFER, I.; REINACHER, M.; WEISS, E. Immunomorphologic characterization of chicken thrombocytes. **Cell and tissue research**, v. 236, n. 1, p. 1-3, 1984.

RITCHEY, M. B.; PALESE, P.; SCHULMAN, J. L. Mapping of the influenza virus genome. III. Identification of genes coding for nucleoprotein, membrane protein, and nonstructural protein. **Journal of virology**, v. 20, n. 1, p. 307-313, 1976.

ROBB, N. C.; FODOR, E. The accumulation of influenza A virus segment 7 spliced mRNAs is regulated by the NS1 protein. **Journal of General Virology**, v. 93, n. 1, p. 113-118, 2012.

RÖHM, C.; ZHOU, N.; SÜSS, J.; MACKENZIE, J.; WEBSTER, R. G. Characterization of a novel influenza hemagglutinin, H15: criteria for determination of influenza A subtypes. **Virology**, v. 217, n. 2, p. 508-516, 1996.

ROSSMANN, M. G. Structure of viruses: a short history. **Quarterly reviews of biophysics**, v. 46, n. 2, p. 133-180, 2013.

ROTHENFUSSER, S.; GOUTAGNY, N.; DIPERNA, G.; GONG, M.; MONKS, B. G.; SCHOENEMEYER, A.; YAMAMOTO, M.; AKIRA, S.; FITZGERALD, K. A. The RNA helicase Lgp2 inhibits TLR-independent sensing of viral replication by retinoic acid-inducible gene-I. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 8, p. 5260-5268, 2005.

RUE, C. A.; SUSTA, L.; CORNAX, I.; BROWN, C. C.; KAPCZYNSKI, D. R.; SUAREZ, D. L.; KING, D. J.; MILLER, P. J.; AFONSO, C. L. Virulent Newcastle disease virus elicits a strong innate immune response in chickens. **Journal of General Virology**, v. 92, n. 4, p. 931-939, 2011.

RUGGIERI, A.; DAZERT, E.; METZ, P.; HOFMANN, S.; BERGEEST, J.-P.; MAZUR, J.; BANKHEAD, P.; HIET, M.-S.; KALLIS, S.; ALVISI, G. Dynamic oscillation of

translation and stress granule formation mark the cellular response to virus infection. **Cell host & microbe**, v. 12, n. 1, p. 71-85, 2012.

RUST, M. J.; LAKADAMYALI, M.; ZHANG, F.; ZHUANG, X. Assembly of endocytic machinery around individual influenza viruses during viral entry. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 11, n. 6, p. 567, 2004.

SAHA, S. K.; PIETRAS, E. M.; HE, J. Q.; KANG, J. R.; LIU, S. Y.; OGANESYAN, G.; SHAHANGIAN, A.; ZARNEGAR, B.; SHIBA, T. L.; WANG, Y. Regulation of antiviral responses by a direct and specific interaction between TRAF3 and Cardif. **The EMBO journal**, v. 25, n. 14, p. 3257-3263, 2006.

SAMSON, A.; LEVESLEY, I.; RUSSELL, P. The 36K polypeptide synthesized in Newcastle disease virus-infected cells possesses properties predicted for the hypothesized 'V'protein. **Journal of General Virology**, v. 72, n. 7, p. 1709-1713, 1991.

SANCHEZ-APARICIO, M.; AYLLON, J.; LEO-MACIAS, A.; WOLFF, T.; GARCIA-SASTRE, A. Subcellular localizations of RIG-I, TRIM25, and MAVS complexes. **Journal of virology**, v. 91, n. 2, p. e01155-01116, 2017.

SANTHAKUMAR, D.; RUBBENSTROTH, D.; MARTINEZ-SOBRIDO, L.; MUNIR, M. Avian interferons and Their Antiviral effectors. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n., p., 2017.

SANTHAKUMAR, D.; ROHAIM, M. A. M. S.; HUSSEIN, H. A.; HAWES, P.; FERREIRA, H. L.; BEHBOUDI, S.; IQBAL, M.; NAIR, V.; ARNS, C. W.; MUNIR, M. Chicken interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 5 Antagonizes Replication of RNA Viruses. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 6794, 2018.

SANTY, L. C.; CASANOVA, J. E. Activation of ARF6 by ARNO stimulates epithelial cell migration through downstream activation of both Rac1 and phospholipase D. **The Journal of cell biology**, v. 154, n. 3, p. 599-610, 2001.

SARMENTO, L.; AFONSO, C. L.; ESTEVEZ, C.; WASILENKO, J.; PANTIN-JACKWOOD, M. Differential host gene expression in cells infected with highly pathogenic H5N1 avian influenza viruses. **Veterinary immunology and immunopathology**, v. 125, n. 3-4, p. 291-302, 2008.

SATO, M.; SUEMORI, H.; HATA, N.; ASAGIRI, M.; OGASAWARA, K.; NAKAO, K.; NAKAYA, T.; KATSUKI, M.; NOGUCHI, S.; TANAKA, N. Distinct and essential roles of transcription factors IRF-3 and IRF-7 in response to viruses for IFN- $\alpha/\beta$  gene induction. **Immunity**, v. 13, n. 4, p. 539-548, 2000.

SATOH, T.; KATO, H.; KUMAGAI, Y.; YONEYAMA, M.; SATO, S.; MATSUSHITA, K.; TSUJIMURA, T.; FUJITA, T.; AKIRA, S.; TAKEUCHI, O. LGP2 is a positive regulator of RIG-I–and MDA5-mediated antiviral responses. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 4, p. 1512-1517, 2010.

SATTERLY, N.; TSAI, P.-L.; VAN DEURSEN, J.; NUSSENZVEIG, D. R.; WANG, Y.; FARIA, P. A.; LEVAY, A.; LEVY, D. E.; FONTOURA, B. M. Influenza virus targets the

mRNA export machinery and the nuclear pore complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 6, p. 1853-1858, 2007.

SCHULTZ, U.; KASPERS, B.; STAEHELI, P. The interferon system of non-mammalian vertebrates. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 28, n. 5, p. 499-508, 2004.

SELMAN, M.; DANKAR, S. K.; FORBES, N. E.; JIA, J.-J.; BROWN, E. G. Adaptive mutation in influenza A virus non-structural gene is linked to host switching and induces a novel protein by alternative splicing. **Emerging microbes & infections**, v. 1, n. 1, p. 1-10, 2012.

SENNE, D.; PANIGRAHY, B.; KAWAOKA, Y.; PEARSON, J.; SÜSS, J.; LIPKIND, M.; KIDA, H.; WEBSTER, R. Survey of the hemagglutinin (HA) cleavage site sequence of H5 and H7 avian influenza viruses: amino acid sequence at the HA cleavage site as a marker of pathogenicity potential. **Avian diseases**, v., n., p. 425-437, 1996.

SETH, R. B.; SUN, L.; EA, C.-K.; CHEN, Z. J. Identification and characterization of MAVS, a mitochondrial antiviral signaling protein that activates NF- $\kappa$ B and IRF3. **Cell**, v. 122, n. 5, p. 669-682, 2005.

SHAHSAVANDI, S.; EBRAHIMI, M. M.; MOHAMMADI, A.; LEBAS, N. Z. Impact of chicken-origin cells on adaptation of a low pathogenic influenza virus. **Cytotechnology**, v. 65, n. 3, p. 419-424, 2013.

SHAN, S.; ELLIS, T.; FENWICK, S.; EDWARDS, J.; O'DEA, M.; PARKINSON, J. Biological and genetic characterization of a low-pathogenicity avian influenza H6N2 virus originating from a healthy Eurasian coot. **Archives of virology**, v. 155, n. 3, p. 403-409, 2010.

SHI, Y.; ZHANG, Y.-B.; ZHAO, Z.; JIANG, J.; ZHANG, Q.-Y.; GUI, J.-F. Molecular characterization and subcellular localization of *Carassius auratus* interferon regulatory factor-1. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 32, n. 2, p. 134-146, 2008.

SHIH, S.-R.; NEMEROFF, M. E.; KRUG, R. M. The choice of alternative 5' splice sites in influenza virus M1 mRNA is regulated by the viral polymerase complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 14, p. 6324-6328, 1995.

SHIH, S.-R.; SUEN, P.-C.; CHEN, Y.-S.; CHANG, S.-C. A novel spliced transcript of influenza A/WSN/33 virus. **Virus genes**, v. 17, n. 2, p. 179-183, 1998.

SHIMIZU, T.; TAKIZAWA, N.; WATANABE, K.; NAGATA, K.; KOBAYASHI, N. Crucial role of the influenza virus NS2 (NEP) C-terminal domain in M1 binding and nuclear export of vRNP. **FEBS letters**, v. 585, n. 1, p. 41-46, 2011.

SHINYA, K.; EBINA, M.; YAMADA, S.; ONO, M.; KASAI, N.; KAWAOKA, Y. Avian flu: influenza virus receptors in the human airway. **Nature**, v. 440, n. 7083, p. 435, 2006.

SHORTRIDGE, K. Pandemic influenza: a zoonosis? In: Seminars in respiratory infections, 1992, p. 11-25.

SHU, Q.; LENNEMANN, N. J.; SARKAR, S. N.; SADOVSKY, Y.; COYNE, C. B. ADAP2 is an interferon stimulated gene that restricts RNA virus entry. **PLoS pathogens**, v. 11, n. 9, p. e1005150, 2015.

SICK, C.; SCHULTZ, U.; STAEHELI, P. A family of genes coding for two serologically distinct chicken interferons. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 13, p. 7635-7639, 1996.

SICK, C.; SCHULTZ, U.; MÜNSTER, U.; MEIER, J.; KASPERS, B.; STAEHELI, P. Promoter structures and differential responses to viral and nonviral inducers of chicken type I interferon genes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 16, p. 9749-9754, 1998.

SKEHEL, J.; CROSS, K.; STEINHAEUER, D.; WILEY, D. **Influenza fusion peptides**: secondary title: Portland Press Ltd., 2001.

SKEHEL, J. J. Polypeptide synthesis in influenza virus-infected cells. **Virology**, v. 49, n. 1, p. 23-36, 1972.

SMITH, S. E.; GIBSON, M.; WASH, R.; FERRARA, F.; WRIGHT, E.; TEMPERTON, N.; KELLAM, P.; FIFE, M. Chicken interferon-inducible transmembrane protein 3 restricts influenza viruses and lyssaviruses in vitro. **Journal of virology**, v. 87, n. 23, p. 12957-12966, 2013.

SMITH, W.; ANDREWES, C. H.; LAIDLAW, P. P. A virus obtained from influenza patients. **Lancet**, v., n., p. 66-68, 1933.

SPECTOR, D. L. SnapShot: cellular bodies. **Cell**, v. 127, n. 5, p. 1071. e1071-1071. e1072, 2006.

STAINES, K.; BATRA, A.; MWANGI, W.; MAIER, H. J.; VAN BORM, S.; YOUNG, J. R.; FIFE, M.; BUTTER, C. A Versatile Panel of Reference Gene Assays for the Measurement of Chicken mRNA by Quantitative PCR. **PloS one**, v. 11, n. 8, p. e0160173, 2016.

STALLKNECHT, D. E.; BROWN, J. D. Wild bird infections and the ecology of avian influenza viruses. **Animal Influenza**, v., n., p. 153-175, 2017.

STIENEKE-GRÖBER, A.; VEY, M.; ANGLIKER, H.; SHAW, E.; THOMAS, G.; ROBERTS, C.; KLENK, H.; GARTEN, W. Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease. **The EMBO journal**, v. 11, n. 7, p. 2407-2414, 1992.

SUAREZ, D. L.; SENNE, D. A.; BANKS, J.; BROWN, I. H.; ESSEN, S. C.; LEE, C.-W.; MANVELL, R. J.; MATHIEU-BENSON, C.; MORENO, V.; PEDERSEN, J. C. Recombination resulting in virulence shift in avian influenza outbreak, Chile. **Emerging infectious diseases**, v. 10, n. 4, p. 693, 2004.



SUAREZ, D. L. Influenza A virus. **Animal Influenza**, v., n., p. 1-30, 2016.

SUN, X.; YAU, V. K.; BRIGGS, B. J.; WHITTAKER, G. R. Role of clathrin-mediated endocytosis during vesicular stomatitis virus entry into host cells. **Virology**, v. 338, n. 1, p. 53-60, 2005.

SUN, Y.; ZHANG, P.; ZHENG, H.; DONG, L.; TAN, L.; SONG, C.; QIU, X.; LIAO, Y.; MENG, C.; YU, S. Chicken RNA-binding protein T-cell internal antigen-1 contributes to stress granule formation in chicken cells and tissues. **Journal of veterinary science**, v. 19, n. 1, p. 3-12, 2018.

SUN, Y.; MAO, X.; ZHENG, H.; WU, W.; REHMAN, Z. U.; LIAO, Y.; MENG, C.; QIU, X.; TAN, L.; SONG, C. Goose MAVS functions in RIG-I-mediated IFN- $\beta$  signaling activation. **Developmental & Comparative Immunology**, v. 93, n., p. 58-65, 2019.

SWAYNE, D. E. **Animal influenza**: John Wiley & Sons, 2016

TAKEUCHI, K.; KOMATSU, T.; KITAGAWA, Y.; SADA, K.; GOTOH, B. Sendai virus C protein plays a role in restricting PKR activation by limiting the generation of intracellular double-stranded RNA. **Journal of virology**, v. 82, n. 20, p. 10102-10110, 2008.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Molecular biology and evolution**, v. 28, n. 10, p. 2731-2739, 2011.

TANG, E. D.; WANG, C.-Y. TRAF5 is a downstream target of MAVS in antiviral innate immune signaling. **PloS one**, v. 5, n. 2, p. e9172, 2010.

TANNA, C. E.; GOSS, L. B.; LUDWIG, C. G.; CHEN, P.-W. Arf GAPs as Regulators of the Actin Cytoskeleton—An Update. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 2, p. 442, 2019.

TARUN, S. Z.; WELLS, S. E.; DEARDORFF, J. A.; SACHS, A. B. Translation initiation factor eIF4G mediates in vitro poly (A) tail-dependent translation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 94, n. 17, p. 9046-9051, 1997.

TAYLOR, G. Sialidases: structures, biological significance and therapeutic potential. **Current opinion in structural biology**, v. 6, n. 6, p. 830-837, 1996.

TEIJARO, J. R. Type I interferons in viral control and immune regulation. **Current opinion in virology**, v. 16, n., p. 31-40, 2016.

TEMPERLEY, N. D.; BERLIN, S.; PATON, I. R.; GRIFFIN, D. K.; BURT, D. W. Evolution of the chicken Toll-like receptor gene family: a story of gene gain and gene loss. **BMC genomics**, v. 9, n. 1, p. 62, 2008.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting,

position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 1994.

TIZARD, I. R. **Inmunología veterinaria**: Elsevier Health Sciences, 2018  
TONG, S.; LI, Y.; RIVAILLER, P.; CONRARDY, C.; CASTILLO, D. A. A.; CHEN, L.-M.; RECUENCO, S.; ELLISON, J. A.; DAVIS, C. T.; YORK, I. A. A distinct lineage of influenza A virus from bats. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 11, p. 4269-4274, 2012.

TONG, S.; ZHU, X.; LI, Y.; SHI, M.; ZHANG, J.; BOURGEOIS, M.; YANG, H.; CHEN, X.; RECUENCO, S.; GOMEZ, J. New world bats harbor diverse influenza A viruses. **PLoS pathogens**, v. 9, n. 10, p., 2013.

TOURRIÈRE, H.; CHEBLI, K.; ZEKRI, L.; COURSELAUD, B.; BLANCHARD, J. M.; BERTRAND, E.; TAZI, J. The RasGAP-associated endoribonuclease G3BP assembles stress granules. **The Journal of cell biology**, v. 160, n. 6, p. 823-831, 2003.

VAN DER SCHAAR, H. M.; RUST, M. J.; CHEN, C.; VAN DER ENDE-METSELAAR, H.; WILSCHUT, J.; ZHUANG, X.; SMIT, J. M. Dissecting the cell entry pathway of dengue virus by single-particle tracking in living cells. **PLoS pathogens**, v. 4, n. 12, p. e1000244, 2008.

VAN DIJK, J. G.; VERHAGEN, J. H.; WILLE, M.; WALDENSTRÖM, J. Host and virus ecology as determinants of influenza A virus transmission in wild birds. **Current opinion in virology**, v. 28, n., p. 26-36, 2018.

VAN GILS, J. A.; MUNSTER, V. J.; RADERSMA, R.; LIEFHEDDER, D.; FOUCHIER, R. A.; KLAASSEN, M. Hampered foraging and migratory performance in swans infected with low-pathogenic avian influenza A virus. **PloS one**, v. 2, n. 1, p., 2007.

VAN KUPPEVELD, F.; VAN DER LOGT, J.; ANGULO, A.; VAN ZOEST, M.; QUINT, W.; NIESTERS, H.; GALAMA, J.; MELCHERS, W. Genus- and species-specific identification of mycoplasmas by 16S rRNA amplification. **Applied and environmental microbiology**, v. 59, n. 2, p. 655, 1993.

VARGA, Z. T.; RAMOS, I.; HAI, R.; SCHMOLKE, M.; GARCÍA-SASTRE, A.; FERNANDEZ-SESMA, A.; PALESE, P. The influenza virus protein PB1-F2 inhibits the induction of type I interferon at the level of the MAVS adaptor protein. **PLoS pathogens**, v. 7, n. 6, p., 2011.

VASIN, A.; TEMKINA, O.; EGOROV, V.; KLOTCHENKO, S.; PLOTNIKOVA, M.; KISELEV, O. Molecular mechanisms enhancing the proteome of influenza A viruses: an overview of recently discovered proteins. **Virus research**, v. 185, n., p. 53-63, 2014.

VAZQUEZ, C.; HORNER, S. M. MAVS coordination of antiviral innate immunity. **Journal of virology**, v. 89, n. 14, p. 6974-6977, 2015.

VENKATARAMAN, T.; VALDES, M.; ELSBY, R.; KAKUTA, S.; CACERES, G.; SAIJO, S.; IWAKURA, Y.; BARBER, G. N. Loss of DExD/H box RNA helicase LGP2 manifests

disparate antiviral responses. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 10, p. 6444-6455, 2007.

VENKATESWARLU, K.; CULLEN, P. J. Molecular cloning and functional characterization of a human homologue of centaurin- $\alpha$ . **Biochemical and biophysical research communications**, v. 262, n. 1, p. 237-244, 1999.

VENTURIN, M.; CARRA, S.; GAUDENZI, G.; BRUNELLI, S.; GALLO, G. R.; MONCINI, S.; COTELLI, F.; RIVA, P. ADAP2 in heart development: a candidate gene for the occurrence of cardiovascular malformations in NF1 microdeletion syndrome. **Journal of medical genetics**, v. 51, n. 7, p. 436-443, 2014.

VILLARREAL, L. P.; WITZANY, G. Viruses are essential agents within the roots and stem of the tree of life. **Journal of Theoretical Biology**, v. 262, n. 4, p. 698-710, 2010.

VIRAL ZONE, V. Z. **H5N1 subtype**: secondary title. web page, 2014. 2020.

WANG, J. P.; CERNY, A.; ASHER, D. R.; KURT-JONES, E. A.; BRONSON, R. T.; FINBERG, R. W. MDA5 and MAVS mediate type I interferon responses to coxsackie B virus. **Journal of virology**, v. 84, n. 1, p. 254-260, 2010.

WATANABE, T.; WATANABE, S.; KAWAOKA, Y. Cellular networks involved in the influenza virus life cycle. **Cell host & microbe**, v. 7, n. 6, p. 427-439, 2010.

WEBER, F.; KOCHS, G.; GRUBER, S.; HALLER, O. A classical bipartite nuclear localization signal on Thogoto and influenza A virus nucleoproteins. **Virology**, v. 250, n. 1, p. 9-18, 1998.

WEBSTER, R.; HINSHAW, V.; BEAN, W.; VAN WYKE, K.; GERACI, J.; AUBIN, D. S.; PETURSSON, G. Characterization of an influenza A virus from seals. **Virology**, v. 113, n. 2, p. 712-724, 1981.

WEBSTER, R. G.; BEAN, W. J.; GORMAN, O. T.; CHAMBERS, T. M.; KAWAOKA, Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 56, n. 1, p. 152-179, 1992.

WEI, L.; SONG, Y.; CUI, J.; QU, N.; WANG, N.; OUYANG, G.; LIAO, M.; JIAO, P. Cloning, characterization, and expression analysis of LGP2 cDNA from goose, *Anser cygnoides*. **Poultry science**, v. 95, n. 10, p. 2290-2296, 2016.

WEST, A. P.; SHADEL, G. S.; GHOSH, S. Mitochondria in innate immune responses. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 6, p. 389-402, 2011.

WHEELER, J. R.; MATHENY, T.; JAIN, S.; ABRISCH, R.; PARKER, R. Distinct stages in stress granule assembly and disassembly. **Elife**, v. 5, n., p. e18413, 2016.

WHITE, D. O. Influenza viral proteins: Identification and synthesis. In: (Ed.). **Current Topics in Microbiology and Immunology/Ergebnisse der Mikrobiologie und Immunitätsforschung**: Springer, 1974, p.1-48.

WHITE, J. P.; CARDENAS, A. M.; MARISSSEN, W. E.; LLOYD, R. E. Inhibition of cytoplasmic mRNA stress granule formation by a viral proteinase. **Cell host & microbe**, v. 2, n. 5, p. 295-305, 2007.

WHITE, J. P.; LLOYD, R. E. Regulation of stress granules in virus systems. **Trends in microbiology**, v. 20, n. 4, p. 175-183, 2012.

WHITLEY, P.; GIBBARD, A. M.; KOUMANOV, F.; OLDFIELD, S.; KILGOUR, E. E.; PRESTWICH, G. D.; HOLMAN, G. D. Identification of centaurin- $\alpha$ 2: a phosphatidylinositide-binding protein present in fat, heart and skeletal muscle. **European Journal of Cell Biology**, v. 81, n. 4, p. 222-230, 2002.

WHITTAKER, G.; BUI, M.; HELENIUS, A. Nuclear trafficking of influenza virus ribonucleoproteins in heterokaryons. **Journal of virology**, v. 70, n. 5, p. 2743-2756, 1996.

WISE, H. M.; FOEGLEIN, A.; SUN, J.; DALTON, R. M.; PATEL, S.; HOWARD, W.; ANDERSON, E. C.; BARCLAY, W. S.; DIGARD, P. A complicated message: Identification of a novel PB1-related protein translated from influenza A virus segment 2 mRNA. **Journal of virology**, v. 83, n. 16, p. 8021-8031, 2009.

WISE, H. M.; BARBEZANGE, C.; JAGGER, B. W.; DALTON, R. M.; GOG, J. R.; CURRAN, M. D.; TAUBENBERGER, J. K.; ANDERSON, E. C.; DIGARD, P. Overlapping signals for translational regulation and packaging of influenza A virus segment 2. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. 17, p. 7775-7790, 2011.

WISE, H. M.; HUTCHINSON, E. C.; JAGGER, B. W.; STUART, A. D.; KANG, Z. H.; ROBB, N.; SCHWARTZMAN, L. M.; KASH, J. C.; FODOR, E.; FIRTH, A. E. Identification of a novel splice variant form of the influenza A virus M2 ion channel with an antigenically distinct ectodomain. **PLoS pathogens**, v. 8, n. 11, p., 2012.

WISE, M. G.; SUAREZ, D. L.; SEAL, B. S.; PEDERSEN, J. C.; SENNE, D. A.; KING, D. J.; KAPCZYNSKI, D. R.; SPACKMAN, E. Development of a real-time reverse-transcription PCR for detection of newcastle disease virus RNA in clinical samples. **J Clin Microbiol**, v. 42, n. 1, p. 329-338, 2004.

WOLF, Y. I.; KAZLAUSKAS, D.; IRANZO, J.; LUCÍA-SANZ, A.; KUHN, J. H.; KRUPOVIC, M.; DOLJA, V. V.; KOONIN, E. V. Origins and evolution of the global RNA virome. **MBio**, v. 9, n. 6, p. e02329-02318, 2018.

WOLF, Y. I.; KAZLAUSKAS, D.; IRANZO, J.; LUCÍA-SANZ, A.; KUHN, J. H.; KRUPOVIC, M.; DOLJA, V. V.; KOONIN, E. V. Reply to Holmes and Duchêne, "Can Sequence Phylogenies Safely Infer the Origin of the Global Virome?": Deep Phylogenetic Analysis of RNA Viruses Is Highly Challenging but Not Meaningless. **MBio**, v. 10, n. 2, p. e00542-00519, 2019.

WOOLCOCK, P. R. Avian influenza virus isolation and propagation in chicken eggs. In: (Ed.). **Avian influenza virus**: Springer, 2008, p.35-46.

WORLD ORGANIZATION FOR ANIMAL HEALTH, O. **INFECTION WITH AVIAN INFLUENZA VIRUSES**: secondary title, 2019. 2020.

WU, B.; HUR, S. How RIG-I like receptors activate MAVS. **Current opinion in virology**, v. 12, n., p. 91-98, 2015.

WU, Y.; WU, Y.; TEFSSEN, B.; SHI, Y.; GAO, G. F. Bat-derived influenza-like viruses H17N10 and H18N11. **Trends in microbiology**, v. 22, n. 4, p. 183-191, 2014.

XIAO, Y.; EVSEEV, D.; STEVENS, C. A.; MOGHRABI, A.; MIRANZO-NAVARRO, D.; FLEMING-CANEPA, X.; TETRAULT, D. G.; MAGOR, K. E. Influenza PB1-F2 Inhibits Avian MAVS Signaling. **Viruses**, v. 12, n. 4, p. 409, 2020.

XU, L.-G.; WANG, Y.-Y.; HAN, K.-J.; LI, L.-Y.; ZHAI, Z.; SHU, H.-B. VISA is an adapter protein required for virus-triggered IFN- $\beta$  signaling. **Molecular cell**, v. 19, n. 6, p. 727-740, 2005.

XU, X.; SUBBARAO, K.; COX, N. J.; GUO, Y. Genetic characterization of the pathogenic influenza A/Goose/Guangdong/1/96 (H5N1) virus: similarity of its hemagglutinin gene to those of H5N1 viruses from the 1997 outbreaks in Hong Kong. **Virology**, v. 261, n. 1, p. 15-19, 1999.

YAMAMOTO-FURUSHO, J. K.; BARNICH, N.; XAVIER, R.; HISAMATSU, T.; PODOLSKY, D. K. Centaurin  $\beta$ 1 down-regulates nucleotide-binding oligomerization domains 1-and 2-dependent NF- $\kappa$ B activation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 47, p. 36060-36070, 2006.

YAMAYOSHI, S.; WATANABE, M.; GOTO, H.; KAWAOKA, Y. Identification of a novel viral protein expressed from the PB2 segment of influenza A virus. **Journal of virology**, v. 90, n. 1, p. 444-456, 2016.

YANAI, H.; NEGISHI, H.; TANIGUCHI, T. The IRF family of transcription factors: Inception, impact and implications in oncogenesis. **Oncoimmunology**, v. 1, n. 8, p. 1376-1386, 2012.

YANG, H.; LIN, C. H.; MA, G.; BAFFI, M. O.; WATHELET, M. G. Interferon regulatory factor-7 synergizes with other transcription factors through multiple interactions with p300/CBP coactivators. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 18, p. 15495-15504, 2003.

YANG, Y.; BU, Y.; ZHAO, J.; XUE, J.; XU, G.; SONG, Y.; ZHAO, Y.; YANG, H.; ZHANG, G. Appropriate amount of W protein of avian avulavirus 1 benefits viral replication and W shows strain-dependent subcellular localization. **Virology**, v. 538, n., p. 71-85, 2019.

YEWDELL, J. W.; INCE, W. L. Frameshifting to PA-X influenza. **Science**, v. 337, n. 6091, p. 164-165, 2012.

YILMAZ, A.; SHEN, S.; ADELSON, D. L.; XAVIER, S.; ZHU, J. J. Identification and sequence analysis of chicken Toll-like receptors. **Immunogenetics**, v. 56, n. 10, p. 743-753, 2005.

YONEYAMA, M.; KIKUCHI, M.; MATSUMOTO, K.; IMAIZUMI, T.; MIYAGISHI, M.; TAIRA, K.; FOY, E.; LOO, Y.-M.; GALE, M.; AKIRA, S. Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 5, p. 2851-2858, 2005.

YONEYAMA, M.; JOGI, M.; ONOMOTO, K. Regulation of antiviral innate immune signaling by stress-induced RNA granules. **The Journal of Biochemistry**, v. 159, n. 3, p. 279-286, 2016.

YOO, J.-S.; TAKAHASHI, K.; NG, C. S.; OUDA, R.; ONOMOTO, K.; YONEYAMA, M.; LAI, J. C.; LATTMANN, S.; NAGAMINE, Y.; MATSUI, T. DHX36 enhances RIG-I signaling by facilitating PKR-mediated antiviral stress granule formation. **PLoS pathogens**, v. 10, n. 3, p., 2014.

YOON, S.-W.; WEBBY, R. J.; WEBSTER, R. G. Evolution and ecology of influenza A viruses. In: (Ed.). **Influenza Pathogenesis and Control-Volume I**: Springer, 2014, p.359-375.

ZEINAB, R.; EL-BAGOURY, G.; KHODIER, M.; SHARAWI, S. GROWTH CHARACTERISTICS OF LOW PATHOGENIC STRAIN OF AVIAN INFLUENZA VIRUS (H5N2) IN DIFFERENT CELL CULTURES. v., n., p.

ZENG, W.; XU, M.; LIU, S.; SUN, L.; CHEN, Z. J. Key role of Ubc5 and lysine-63 polyubiquitination in viral activation of IRF3. **Molecular cell**, v. 36, n. 2, p. 315-325, 2009.

ZENG, W.; SUN, L.; JIANG, X.; CHEN, X.; HOU, F.; ADHIKARI, A.; XU, M.; CHEN, Z. J. Reconstitution of the RIG-I pathway reveals a signaling role of unanchored polyubiquitin chains in innate immunity. **Cell**, v. 141, n. 2, p. 315-330, 2010.

ZHANG, Y.; FU, D.; CHEN, H.; ZHANG, Z.; SHI, Q.; ELSAYED, A. K.; LI, B. Partial Antiviral Activities Detection of Chicken Mx Jointing with Neuraminidase Gene (NA) against Newcastle Disease Virus. **PloS one**, v. 8, n. 8, p., 2013.

ZHANG, Z.; ZOU, T.; HU, X.; JIN, H. Type III interferon gene expression in response to influenza virus infection in chicken and duck embryonic fibroblasts. **Molecular immunology**, v. 68, n. 2, p. 657-662, 2015.

ZHANG, Z.; LIU, D.; SUN, W.; LIU, J.; HE, L.; HU, J.; GU, M.; WANG, X.; LIU, X.; HU, S.; CHEN, S.; PENG, D.; LIU, X. Multiplex one-step Real-time PCR by Taqman-MGB method for rapid detection of pan and H5 subtype avian influenza viruses. **PloS one**, v. 12, n. 6, p. e0178634, 2017.

ZHAO, T.; LONG, Y.; SUN, Q.; ARGUELLO, M.; BALLARD, D. W.; HISCOTT, J.; LIN, R. The NEMO adaptor bridges the nuclear factor-[kappa] B and interferon regulatory factor signaling pathways. **Nature immunology**, v. 8, n. 6, p. 592, 2007.

ZHENG, W.; TAO, Y. J. Structure and assembly of the influenza A virus ribonucleoprotein complex. **FEBS letters**, v. 587, n. 8, p. 1206-1214, 2013.

ZHIRNOV, O.; POYARKOV, S.; VOROB'EVA, I.; SAFONOVA, O.; MALYSHEV, N.; KLENK, H. Segment NS of influenza A virus contains an additional gene NSP in positive-sense orientation. In: Doklady Biochemistry and biophysics, 2007Nauka/Interperiodica, p. 127-133.

ZHONG, B.; YANG, Y.; LI, S.; WANG, Y.-Y.; LI, Y.; DIAO, F.; LEI, C.; HE, X.; ZHANG, L.; TIEN, P. The adaptor protein MITA links virus-sensing receptors to IRF3 transcription factor activation. **Immunity**, v. 29, n. 4, p. 538-550, 2008.

ZOU, J.; CHANG, M.; NIE, P.; SECOMBES, C. J. Origin and evolution of the RIG-I like RNA helicase gene family. **BMC evolutionary biology**, v. 9, n. 1, p. 85, 2009.

ZUCCOTTI, P.; CARTELLI, D.; STROPPI, M.; PANDINI, V.; VENTURIN, M.; ALIVERTI, A.; BATTAGLIOLI, E.; CAPPELLETTI, G.; RIVA, P. Centaurin- $\alpha$ 2 interacts with  $\beta$ -tubulin and stabilizes microtubules. **PloS one**, v. 7, n. 12, p. e52867, 2012.

## APÊNDICE A – Quadro de dados do RT-qPCR

**Quadro 4. Dados da concentração viral do experimento quantificação da expressão de ADAP2 em células DF-1 frente à infecção viral.**

Nome	Cq	Concentração de RNA (ng)	Média (ng)	Log da concentração	Média do Log
H5N1-MOI-1-0h	22.64	6,80E+01	158,67	1,83	2,15
	21.34	1,66E+02		2,22	
	20.80	2,42E+02		2,38	
H5N1-MOI-1-24h	16.42	5,06E+03	5236,67	3,7	3,67
	15.71	8,28E+03		3,92	
	17.51	2,37E+03		3,37	
H5N1-MOI-1-48h	25.49	9,44E+00	37,05	0,97	1,45
	23.55	3,61E+01		1,56	
	22.69	6,56E+01		1,82	
H2N1-MOI-1-0h	24.65	1,69E+01	7,7	1,23	0,54
	26.20	5,75E+00		0,76	
	29.91	4,41E-01		-0,36	
H2N1-MOI-1-24h	30.27	3,43E-01	12,51	-0,46	0,67
	25.22	1,14E+01		1,06	
	24.04	2,58E+01		1,41	



H2N1-MOI-1-48h	27.64	2,12E+00	3,23	0,33	0,45
	27.88	1,80E+00		0,26	
	26.20	5,77E+00		0,76	
H2N1-MOI-10-0h	21.51	1,49E+02	160,83	2,17	2,15
	22.60	6,95E+01		1,84	
	20.68	2,64E+02		2,42	
H2N1-MOI-10-24h	22.72	6,43E+01	191,2	1,81	1,92
	19.78	4,91E+02		2,69	
	24.53	1,83E+01		1,26	
H2N1-MOI-10-48h	23.95	2,73E+01	141,77	1,44	2,01
	21.37	1,64E+02		2,21	
	20.85	2,34E+02		2,37	

Fonte: Scagion, 2020

**Quadro 5. Dados da expressão relativa dos genes ADAP2 e HPRT.**

	ADAP2	HPRT							
Tratamentos	Cq	Cq	$\Delta Cq$	$\Delta\Delta Cq$	$2^{-(\Delta\Delta Cq)}$	Média $2^{-(\Delta\Delta Cq)}$	Erro padrão	Log	Porcentagem
MOCK 0h	15,02	29,56	-14,54	-1,02	2,07	1,18	0,47	0,07	18,2
	15,44	28,93	-13,49	0,03	0,98				
	15,12	27,66	-12,54	0,98	0,49				
MOCK 24h	13,91	28,66	-14,75	-0,21	1,16	1,01	0,10	0,00	1,0
	14	28,28	-14,28	0,26	0,83				
	14,99	29,58	-14,59	-0,05	1,04				
MOCK 48h	14,34	31,38	-17,04	-0,71	1,67	1,07	0,30	0,03	7,3
	13,89	29,78	-15,89	0,44	0,73				
	10,35	26,4	-16,05	0,28	0,82				
H5N1-MOI-1-0h	16,39	32,3	-15,91	-2,39	5,55	5,18	0,37	0,71	417,6
	15,65	32,27	-16,62	-3,10	9,23				
	15,65	31,36	-15,71	-2,19	4,81				
H5N1-MOI-1-24h	12,41	27,99	-15,58	-1,04	2,11	2,69	0,90	0,43	168,5
	12,92	28,02	-15,1	-0,56	1,49				
	14,85	31,47	-16,62	-2,08	4,45				
H5N1-MOI-1-48h	17,35	48	-30,65	-14,32	29198,09	3,16	0,57	0,50	215,7
	16,29	33,94	-17,65	-1,32	2,59				
	15,24	33,4	-18,16	-1,83	3,73				
H2N1-MOI-1-0h	15,33	28,74	-13,41	0,11	0,92	1,41	0,32	0,15	41,4
	14,52	28,43	-13,91	-0,39	1,32				
	14,55	29,04	-14,49	-0,97	2,00				
H2N1-MOI-1-24h	12,28	26,66	-14,38	0,16	0,89	1,48	0,31	0,17	48,5
	13,55	28,78	-15,23	-0,69	1,64				
	12,46	27,91	-15,45	-0,91	1,92				
H2N1-MOI-1-48h	12,9	27,46	-14,56	1,77	0,28	0,34	0,14	-0,47	-66,1
	14,43	30,06	-15,63	0,70	0,61				

	13,56	27,04	-13,48	2,85	0,13				
H2N1-MOI-10-0h	14,3	29,29	-14,99	-1,47	2,87	2,92	0,86	0,47	191,8
	12,77	27,81	-15,04	-1,52	2,97				
	13,22	29,12	-15,9	-2,38	5,51				
H2N1-MOI-10-24h	12,83	29,45	-16,62	-2,08	4,45	6,53	2,08	0,82	553,3
	11,69	29,23	-17,54	-3,00	8,62				
	14,33	40,35	-26,02	-11,48	3792,58				
H2N1-MOI-10-48h	13,82	32,99	-19,17	-2,84	7,70	7,08	1,67	0,85	607,9
	13,18	32,66	-19,48	-3,15	9,62				
	12	30,23	-18,23	-1,90	3,92				

Fonte: Scagion, 2020

Legenda: Valores em vermelho apresentam uma grande variação e, portanto, foram excluídos das análises estatísticas.

**Quadro 6. Dados da expressão relativa dos genes NP de AIV e HPRT.**

	NP AIV	HPRT	Média NP AIV	Média HPRT	$\Delta Cq$	$\Delta\Delta Cq$	$2^{-(\Delta\Delta Cq)}$	$\log 2^{-(\Delta\Delta Cq)}$
Mock 0h	41	29,56	41,0	28,7	12,3	0,2	0,9	-0,1
	41	28,93						
	41	27,66						
Mock 24h	41	28,66	41,0	28,8	12,2	0,1	0,9	0,0
	41	28,28						
	41	29,58						
Mock 48h	41	31,38	41,0	29,2	11,8	-0,3	1,2	0,1
	41	29,78						
	41	26,4						
H5N1 0h	22,64	32,3	21,6	32,0	-10,4	-22,5	5805097,6	6,8
	21,34	32,27						
	20,8	31,36						
H5N1 24h	16,42	27,99	16,5	29,2	-12,6	-24,7	27233685,3	7,4
	15,71	28,02						
	17,51	31,47						
H5N1 48h	25,49		23,9	33,7	-9,8	-21,8	3768491,1	6,6
	23,55	33,94						
	22,69	33,4						
H2N1 0h	24,65	28,74	26,9	28,7	-1,8	-13,9	15310,4	4,2
	26,2	28,43						
	29,91	29,04						
H2N1 24h	30,27	26,66	26,5	27,8	-1,3	-13,4	10505,7	4,0
	25,22	28,78						
	24,04	27,91						

H2N1 48h	27,64	27,46	27,2	28,2	-0,9	-13,0	8377,0	3,9
	27,88	30,06						
	26,2	27,04						
H2N1 10 0h	21,51	29,29	21,6	28,7	-7,1	-19,2	614429,9	5,8
	22,6	27,81						
	20,68	29,12						
H2N1 10 24h	22,72	29,45	22,3	29,3	-7,0	-19,1	555036,2	5,7
	19,78	29,23						
	24,53							
H2N1 10 48h	23,95	32,99	22,1	32,0	-9,9	-22,0	4162125,1	6,6
	21,37	32,66						
	20,85	30,23						

Fonte: Scagion, 2020