

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA, MATEMÁTICA E EDUCAÇÃO

Camila Lopes Simeoni

**O PAPEL DE IRF-5 EM MACRÓFAGOS E LINFÓCITOS B PARA O CONTROLE DA
INFECÇÃO PELO VÍRUS OROPOUCHE EM MODELO MURINO.**

Araras

2021

CAMILA LOPES SIMEONI

**O PAPEL DE IRF-5 EM MACRÓFAGOS E LINFÓCITOS B PARA O CONTROLE DA
INFECÇÃO PELO VÍRUS OROPOUCHE EM MODELO MURINO.**

Trabalho de Conclusão de Curso referente à disciplina de Monografia em Ciências Biológicas 2 apresentada ao Curso de Ciências Biológicas para obtenção do título de Licenciada em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de São Carlos. Araras, 17 de junho de 2021.

Orientação: Prof. Dr. Renato Nallin Montagnolli

Co-orientação: Prof. Dr. José Luiz Proença
Módena

Financiamento: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.

Araras

2021

DEDICATÓRIA

À todas as vidas que permitiram a busca por respostas.
E aos meus pais, a “força motriz” de todos os meus passos e sonhos.

Com amor,

Camila

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar eu gostaria de agradecer aos meus pais. Sem eles, o sonho de ser a primeira pessoa da família a se formar em uma Universidade Federal não se realizaria. Foram inúmeras vezes que meus pais abdicaram dos próprios sonhos para que pudessem investir nos meus passos e nos de meu irmão. Esta conquista, eternizada neste documento, é tão minha quanto deles. Aos meus avós, queridos e orgulhosos de cada caminho que trilho.

Aos meus melhores amigos, Vitor Simeoni, Lucas Badin, Maria Júlia Freire e Joyce Salum por incentivarem a sempre dizer “sim” aos meus sonhos, assim como, não ter medo dos obstáculos e auxiliarem no processo de lembrar o quanto sou capaz de realizar o que eu quiser. Em especial, à Maria, já que passamos todo o processo da graduação unidas, como verdadeiras irmãs de mães distintas. Viver na mesma casa, turma e crescer frente aos obstáculos foi mais fácil com o dinamismo de nossa dupla. Eu tenho tanto orgulho do quanto crescemos e alcançamos nossos objetivos. Agradeço também à Beatriz Zanata, por estar presente em momentos difíceis da graduação e por tanto carinho. E ao Victor Sales, Lucas Côrrea, Ana Laschi, Júlia Cintra e José Augusto pela admiração mútua construída.

Aos meus amigos do laboratório, sou eternamente grata por tantas batalhas diárias vencidas em conjunto e por tantos ensinamentos. Em especial, à Pierina Parise por desde o início confiar em mim, em minha independência e sempre ressaltar como o poder feminino é incrível na ciência e que quando juntas alcançamos mais. À Msc. Mariene Amorim e Karina Bispo por dividirem comigo muitos aprendizados na ciência e, o mais importante, na vida. Msc. Daniel Teixeira e Dr. Matheus Martini, sem vocês, muitas etapas de meu crescimento científico e produção deste estudo não seriam possíveis. Obrigada por tanto carinho, paciência e humor ao ensinar. Msc. Aline Vieira, obrigada por todo apoio e auxílio em minha trajetória.

Para mais, agradeço ao Prof. Dr. José Luiz Proença Módena por ter permitido que eu me aventurasse no universo dos vírus e também por ter me apresentado o LEVE. Nesse ambiente, cresci tanto em âmbito profissional quanto pessoal. Agradeço eternamente pela confiança em meu trabalho. Gostaria de agradecer a Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo. Sem o investimento (Processo: 2020/02448-2), nada seria possível. À Universidade Federal de São Carlos por me permitir crescer cientificamente e me ofertar um ensino público de qualidade. Ademais, meu eterno respeito e agradecimento aos animais que perderam suas vidas diante a busca por respostas sobre a Febre do Oropouche.

EPÍGRAFE

“Coragem, querido coração. ”

(C.S. Lewis)

RESUMO

SIMEONI, Camila L. O papel de IRF-5 em macrófagos e linfócitos B para o controle da infecção pelo vírus Oropouche em modelo murino. 2021. Monografia do Curso de Licenciatura em Ciências Biológicas ao Departamento de Ciências da Natureza, Matemática e Educação– Universidade Federal de São Carlos, campus Centro de Ciências Agrárias, Araras, 2021.

Vírus emergentes podem causar grandes impactos em uma população suscetível. Um exemplo disso, são os vírus transmitidos por vetores artrópodes que se disseminam em ambientes selvagens e áreas urbanas, como o Vírus Oropouche. Esse arbovírus emergente pode ser transmitido no ambiente urbano pela picada de *Culicoides paraensis*, uma mosca hematófaga que circula no Norte e Nordeste brasileiro. O vírus Oropouche causa em humanos uma doença febril aguda que, em alguns casos, pode evoluir a manifestações neurológicas. Contudo, os detalhes patogênicos e o papel dos fatores de transcrição-chaves da resposta imune inata no controle da infecção por esse vírus ainda não estão totalmente esclarecidos. No tocante ao IRF-5, um fator de transcrição ativado após reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos, o mesmo foi caracterizado como essencial no controle da neuroinvasão pelo vírus Oropouche. Dessa forma, o objetivo deste projeto foi caracterizar como a ausência desse gene em células essenciais da resposta imunológica, como macrófagos e linfócitos B, afeta a progressão da doença causada pelo vírus Oropouche em modelo murino. Para isso, se fez necessária a análise de mortalidade e do tropismo viral em animais provenientes de um sistema de recombinação Cre-Lox. Como resultados deste estudo, o vírus alcançou o sistema nervoso central de ambas as linhagens e causou meningite, encefalite e morte de mutantes condicionais. Evidenciando, que IRF5 é essencial nestes leucócitos diante a neuropatogênese deste arbovírus e a necessidade de investigações futuras para averiguar de que forma o Oropouche ganha acesso ao Sistema Nervoso Central. Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Unicamp (CEUA) com o número 5423-1/2019. E foi realizado a partir do Biotério NB2 do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas CTNBio CIBIO 2018/tipo2-02 (01250.017340/2018-28).

Palavras-chave: Febre do Oropouche. Organismos geneticamente modificados. Orthobunyavirus.

ABSTRACT

Emerging viruses can cause great impacts in a susceptible population. For instance, viruses transmitted by arthropod vectors can widely spread in wild landscapes and in urban areas. This is the case of Oropouche virus. This emerging arbovirus can be transmitted in urban areas through *Culicoides paraensis*' prick. The *Culicoides paraensis* is a hematophagous midge, which circulates in Brazilian north and northeast. The Oropouche virus cause an exanthematic febrile illness in humans, which in some cases, can evolve to neurological complications. Although, the pathogenetics details and the role of key transcription factors of the innate immune response on control of this viral infection are not completely understood. Furthermore, IRF-5, a transcription factor activated after the recognition of pathogen-associate molecular patterns, is essential to control neuroinvasion by Oropouche virus. Thus, the aim of this study was to characterize how the absence of this gene in essential cells of the immunological response, such as macrophages and B lymphocytes, could affect the disease progression caused by Oropouche in a murine model. To achieve this goal, a recombination system known as Cre-Lox has been taken. As a result, the virus has achieved the central nervous system of both lineages. Oropouche has caused meningitis, encephalitis and conditional mutants' death. Highlighting the IRF5's importance in these leucocytes in front of neuropathogenesis induced by this virus. In conclusion, there is a requirement to investigate how Oropouche virus gain access to Central Nervous System. This project has been approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation at Unicamp (CEUA) under number 5423-1/2019. It has conducted in the Animal Facility NB2 of the Biology Institute of the State University of Campinas CTNBio CIBIO 2018 / type2- 02 (01250.017340 / 2018-28).

Key words: Oropouche fever. Genetically modified organisms. Orthobunyavirus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura do Vírus Oropouche	2
Figura 2. Esquema representativo do Sistema CreLox	7
Figura 3- Delineamento experimental.....	8
Figura 4 Análise eletroforética em gel de agarose (1,5%) de produtos do PCR obtidos a partir do DNA extraído de camundongos para confirmação da presença de Cre recombinase e IRF5 flanqueado	12
Figura 5- Sobrevivência e porcentagem dos pesos de animais LyzMCre ⁺ e LyzMCre ⁺ IRF5 ^{f/f}	13
Figura 6 - Sobrevivência e porcentagem dos pesos de animais CD19Cre ⁺ e CD19Cre ⁺ IRF5 ^{f/f}	13
Figura 7 - Tropismo de OROV em animais LyzMcre ⁺ Irf5 ^{f/f} e LyzMcre ⁻ Irf5 ^{f/f}	17
Figura 8 – Tropismo de OROV em animais CD19cre ⁺ Irf5 ^{f/f} e CD19cre ⁻ Irf5 ^{f/f}	18

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Primers utilizados no estudo	11
Tabela 2. OROV viável em tecido cerebral de animais CD19cre+IRF5 f/f.....	20

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Blimp-1	Proteína-1 de maturação induzida por linfócitos B
CD19 Cre ⁺	Camundongo mutante que expressa Cre recombinase em células B
CD19 Cre ⁺ x IRF5 f/f	Animais sem expressão de IRF5 em células B
CD19 ⁺ B220 ⁻	Plasmócitos ou pré-plasmócitos com defeitos em desenvolvimento
CreLoxP	Sistema de recombinação gênica
IFN1	Interferons do tipo 1
IFNAR	Receptores de interferons
IgG	Imunoglobulinas do tipo G
IgM	Imunoglobulinas do tipo M
IL-12	Interleucina 12
IL-6	Interleucina 6
IRF	Fator de transcrição regulador de interferons do tipo 1
IRF-5	Fator de transcrição regulador de interferons – 5
ISGs	Genes estimulados por interferons
LACV	Vírus La Crosse
Lox ou LoxP	Sequência gênica de 34 pb reconhecida por enzima Cre-Recombinase
LyzM Cre ⁺	Camundongo mutante que expressa Cre recombinase em macrófagos
LyzM Cre ⁺ x IRF5 f/f	Animais sem expressão de IRF5 em monócitos e macrófagos
MAVS	Proteína sinalizadora antiviral mitocondrial
MDA-5	Proteína-5 associada a diferenciação de melanoma.
Myd88	Molécula adaptadora fator de diferenciação mielóide 88
NK	Células Natural Killer
OROV	Vírus Oropouche
PAMPS	Padrões moleculares associados à patógenos
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões
RIG-1	Receptores semelhantes ao gene I induzíveis por ácido retinóico
RLRs	Receptores semelhantes a RIG
RtqPCR	Transcrição reversa seguida de PCR em tempo real
SNC	Sistema Nervoso Central
TLRs	Receptores do tipo Toll
TRIF	Adaptador indutor de Interferon-β do adaptador contendo o domínio TIR
WT	Camundongo wildtype/Camundongo selvagem

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 ASPECTOS GERAIS	1
1.2 VÍRUS OROPOUCHE (OROV)	1
1.3 NEUROPATOGÊNESE E RESPOSTA IMUNE DO HOSPEDEIRO	3
1.4 O IRF-5	6
1.5 SISTEMA CRE-LOXP	6
2 JUSTIFICATIVA	7
3 OBJETIVOS	8
3.1. OBJETIVO GERAL	8
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	8
4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	8
5 MATERIAIS E MÉTODOS	8
5.1 VÍRUS	8
5.2. ANIMAIS E SISTEMA CRE-LOXP	9
5.3. INOCULAÇÃO E COLETA DE TECIDOS	9
5.4 TITULAÇÃO VIRAL	10
5.5 EXTRAÇÃO DE DNA E GENOTIPAGEM DE ANIMAIS CRE/LOXP	10
5.6 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE RNA VIRAL	11
5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	11
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
6.1 GENOTIPAGEM	12
6.2 ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA E PORCENTAGEM DE PESO DE ANIMAIS LYZM CRE ⁺ IRF5 ^{f/f} E CD19 CRE ⁺ IRF5 ^{f/f} INFECTADOS COM OROV.	13
6.3 TROPISMO DO VÍRUS OROPOUCHE EM ANIMAIS LYZMCRE ⁺ IRF5 ^{F/F} E CD19CRE ⁺ IRF5 ^{F/F} .	15
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	21
REFERÊNCIAS	22

1 INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS

Em meados da década de 70, durante o período pós-guerra, uma grande preocupação com doenças emergentes se tornou evidente, visto que, a população mundial reconheceu o quão grave foram os acontecimentos presentes na região do Sudão e República Dominicana do Congo com o primeiro surto do vírus Ebola e o possível surgimento de uma pandemia do vírus Influenza. Ademais, simultaneamente a isto, os Estados Unidos encontravam-se em estado crítico por conta de infecções respiratórias (SILVA; ANGERAMI, 2008).

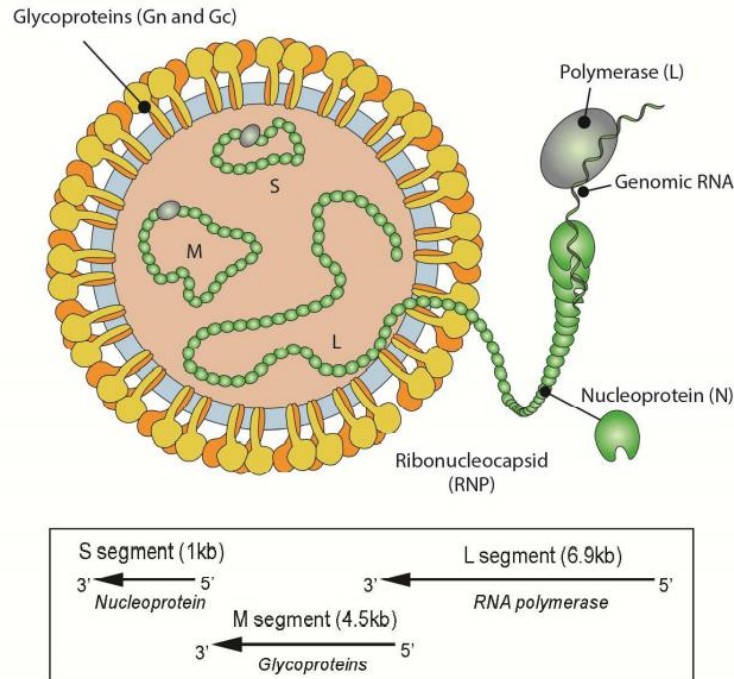
As arboviroses emergentes, imprevisíveis e de grande facilidade de propagação a nível global (DONALISIO; FREITAS; VON ZUBEN, 2017; TOLEDO-TEIXEIRA, 2019; DE MENDONÇA et al., 2021) se tornaram grandes ameaças em áreas tropicais devido às rápidas mudanças climáticas, desmatamentos, migração populacional, ocupação desordenada de áreas urbanas e ausência de saneamento básico (SILVA; ANGERAMI, 2008; TOLEDO-TEIXEIRA, 2019; DE MENDONÇA et al., 2021). Os causadores dessas enfermidades, os arbovírus, multiplicam-se nos tecidos de vetores artrópodes hematófagos, e após um período de incubação extrínseca, são repassados a novos vertebrados suscetíveis através da picada do inseto (TONELLI; FREIRE, 2000). Este grupo de vírus possui grande plasticidade genética, alta frequência de mutações (DONALISIO; FREITAS; VON ZUBEN, 2017) e também podem ser transmitidos via transovariana ou via sexual entre os seus hospedeiros artrópodes (TONELLI; FREIRE, 2000).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que pelo menos metade da população mundial permaneça sob risco de infecção por arbovírus. Somado a isto, são estimados a ocorrência de mais de 100 milhões de casos de infecção e mais de 10 mil mortes todos os anos possivelmente associadas a estes vírus (CARTER et al., 2015; LIANG; GAO; GOULD, 2015, TOLEDO-TEIXEIRA, 2019).

1.2 VÍRUS OROPOUCHE (OROV)

O vírus Oropouche Orthobunyavirus (espécie) é um vírus envelopado de capsídeo helicoidal, do domínio *Riboviria*, reino *Orthornavirae*, filo *Negarnaviricota*, subfilo *Polyploviricotina*, classe *Ellioviricetes*, ordem *Buniavirales*, família *Peribunyaviridae*, gênero *Orthobunyavirus* e subgrupo sorológico Simbu, o qual apresenta um genoma contendo três segmentos de RNA com polaridade negativa de cadeia simples: grande (L), médio (M) e pequeno (S), conforme apresentado na Figura 1 (FAUQUET et al., 2005; SAKAAS et al., 2018; KOONIN et al., 2019).

Figura 1. Estrutura do Vírus Oropouche. O vírus Oropouche é um vírus envelopado com glicoproteínas de superfície Gn e Gc embebidas em seu envelope. Seu material genético é composto por RNA de fita simples tri-segmentado.



Fonte: Romero-Alvarez; Escobar (2018).

Este vírus entra na célula de seu hospedeiro a partir da via endocítica, fundindo seu envelope na membrana do endossomo pós-acidificação dessa organela. Posteriormente, o Oropouche realiza sua transcrição e tradução no interior celular por meio da ação de uma RNA polimerase RNA dependente viral e de ribossomos associados ao retículo endoplasmático rugoso (SANTOS et al., 2008; BARBOSA et al., 2018). A montagem e maturação aparentemente se dá no Complexo de Golgi, num evento dependente da maquinaria celular chamada de ESCRT (BARBOSA et al., 2018).

Ademais, pelo fato de possuir um genoma segmentado, OROV pode sofrer rearranjos de seus segmentos de RNA durante episódios de co-infecção com outros orthobunyavirus, e como consequência, novos vírus altamente patogênicos podem ser formados conforme demonstrado em estudos recentes na região amazônica (AGUILAR et al., 2011).

Oropouche foi isolado pela primeira vez em 1955, a partir de um trabalhador na cidade de Veja de Oropouche em Trinidad. Após isto, foram verificados arbovírus reativos sorologicamente para OROV em *Aedes serratus* e *Bradypus tridactylus* no município de Belém em 1960. A partir de 1961, este arbovírus foi isolado em inúmeros casos na região do Pará, Amapá, Planalto Central e Amazonas (PINHEIRO et al., 1981; SAKKAS et al., 2018;

TOLEDO-TEIXEIRA, 2019), assim como, em outros países das Américas, como Panamá, Peru, Suriname e Trinidad e Tobago (ANDERSON et al., 1961; BAISLEY et al., 1998; VASCONCELOS et al., 2011).

A infecção por OROV possui grande impacto em saúde pública no Brasil, uma vez que já foram notificados mais de 500 mil casos de infecção por OROV na América do Sul e Central. A doença causada por OROV, conhecida como febre do Oropouche, é caracterizada pela presença de sintomas como: febre, cefaleia, mialgia, calafrio, fotofobia, anorexia, tontura, exantema em alguns casos, náuseas, diarreia, vômito, dor epigástrica e retro ocular. Ademais foi demonstrado, em alguns casos, infecção no sistema nervoso central causando meningite linfo monocitária (FIGUEIREDO, 1998).

Outrossim, estudos *in vitro* com nano injeção e supressão de barreiras do intestino médio de insetos documentaram que o vírus Oropouche consegue se replicar e persistir em altos títulos em três espécies de mosquitos urbanos, são elas: *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* e *Culex quinquefasciatus*. Os quais foram considerados como ótimos vetores no tocante à capacidade de transmissão caso o vírus Oropouche evada as barreiras do intestino médio dos insetos. Quando este evento acontecer, existem grandes chances de o ciclo urbano do vírus ser permanente e a febre do Oropouche se espalhar para regiões geográficas mais distantes (DE MENDONÇA et al., 2021).

1.3 NEUROPATOGÊNESE E RESPOSTA IMUNE DO HOSPEDEIRO

O vírus Oropouche pode alcançar o sistema nervoso central tanto em seres humanos como em modelos animais (PINHEIRO et al., 1982; DE SOUZA BASTOS et al., 2012). De acordo com de Souza Bastos et al. (2012), imunoglobulinas do tipo G (IgG) e M (IgM) para OROV e o genoma viral já foram detectados no fluido cérebro-espinhal de pacientes com meningoencefalite.

Em respeito ao vírus Oropouche: (1) este vírus se replica e alcança altos títulos no cérebro de camundongos após inoculação via intracerebral. (2) OROV também consegue alcançar o sistema nervoso mesmo se a inoculação for feita por meio da via subcutânea. (PINHEIRO et al., 1981; SANTOS et al., 2012). E os fatores que determinam a disseminação de OROV no sistema nervoso central ainda não foram elucidados em totalidade (PROENCA-MODENA et al., 2016).

Vírus podem utilizar diversos mecanismos a fim de alcançar órgãos-alvo. O que varia de acordo com a espécie, relações com o endotélio vascular, estrutura e biologia dessas entidades biológicas (FLORES, 2012). No tocante a entrada no sistema nervoso central, vírus

neurotrópicos precisam ultrapassar barreiras físicas, como a barreira hematoencefálica ou a barreira cérebro-fluido espinhal. Essa evasão de mecanismos do sistema imune para acessar ao tecido, depende de um conjunto de estratégias e não a utilização de um único mecanismo (DAHM et al.,2015).

Para isso, podem penetrar e ganhar acesso ao parênquima cerebral de forma passiva entre células endoteliais. Assim como, podem infectá-las, e suas células adjacentes, completando o ciclo infeccioso e liberando sua progênie em superfície basal ou basolateral. Para mais, podem atravessar o endotélio vascular por endocitose, seguido de um transporte vesicular e exocitose para a face oposta de uma célula endotelial. (FLORES, 2012; DAHM et al., 2015). Assim como, vírus também ganham acesso ao SNC via nervos periféricos, os quais podem fornecer um acesso direto ao encéfalo já que as partículas víricas podem ser transportadas ao longo de axônios e dendritos via sinapses. (FLORES, 2012).

Outrossim, um mecanismo denominado Cavalos de Tróia também é possível em que células mononucleares do sangue, como monócitos e linfócitos B, quando infectadas podem levar partículas virais aos tecidos quando atravessam paredes vasculares (FLORES, 2012; KIM, 2008; DAHM et al, 2015).

Tanto a resposta imune inata como a resposta imune adaptativa possuem papéis essenciais para o controle das infecções virais em vertebrados. Enquanto a resposta inata limita e elimina patógenos por meio de barreiras epiteliais e da ação de células especializadas, como fagócitos, células dendríticas e células Natural Killer, pelo reconhecimento de estruturas conservadas em patógenos, a resposta adaptativa é ativada pela resposta inata e extremamente específica, levando a produção de anticorpos neutralizantes por linfócitos B e a ação de linfócitos T que culminam no controle da infecção e eliminação do patógeno. Fagócitos, como os macrófagos e neutrófilos, possuem extrema importância no sistema imune uma vez que encaminham antígenos até órgãos linfóides secundários, num evento chave para a ativação de linfócitos B e T (FLINT et al.,2015).

Os Interferons do tipo I são importantes por serem essenciais na indução de um estado antiviral em células infectadas e não infectadas. Além disso, produção de interferons e de citocinas no início da infecção interfere na produção de anticorpos neutralizantes e na ativação de células B, T e NK. Enquanto os anticorpos neutralizantes produzidos por células B atuam de modo impedir que vírus livres infectem uma nova célula, tanto recobrando o sítio de ligação ao receptor celular, como impedindo a exposição do domínio de fusão; células NK e células T CD8+ induzem a morte programada de células infectadas. Assim, num cenário tão complexo,

não é de se estranhar que a produção de IFN do tipo I e de outras citocinas durante a resposta imune inata seja um evento redundante e que pode ser regulado pelo reconhecimento por diferentes receptores de reconhecimento padrão e por diferentes fatores de transcrição, como IRF-5 (FLINT et al., 2015).

Quando entramos em contato com arbovírus por meio de uma infecção, ativa-se nossa resposta imune inata, e como consequência disto, há a produção de interferons do tipo 1 (IFN-1) e de outras citocinas, que irão orquestrar a formação de um estado antiviral nas nossas células, além de estimularem a maturação e desenvolvimento de plasmócitos, com a consequente produção de anticorpos neutralizantes (COUDERC et al., 2008; PAGNI; FERNANDEZ-SESMA, 2012; LAZEAR et al., 2013; TAYLOR; PETERSON, 2014; PROENCA-MODENA et al., 2015, 2016).

Para que haja a produção de interferons do tipo 1, é necessário que primeiramente ocorra o reconhecimento do RNA viral ou de outros padrões moleculares associados à patógenos (PAMPS) por meio dos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) no citoplasma ou na vesícula endocítica da célula que foi infectada. Com o reconhecimento destas estruturas, segue-se uma cascata de sinalização resultando na fosforilação e translocação de fatores de transcrição. Os fatores reguladores de interferons (IRF-1, IRF-3, IRF-5 e IRF-7) induzem a transcrição de interferons do tipo 1. Com isto, os interferons produzidos, se ligam aos seus receptores, IFNAR, nas próprias células infectadas e também em células vizinhas. Como consequência, há a expressão de centenas de genes estimulados por interferons (ISGs) que possuem ação antiviral (DIAMOND; GALE, 2012).

Além disto, existem receptores presentes no citoplasma que demonstraram grande efetividade na resposta contra vírus de RNA. Exemplo disto, temos: (1) RIG Like Receptors (RLR), como o RIG-1 (gene 1 induzido por ácido retinóico) e MDA-5 (proteína 5 associada a diferenciação de melanoma). Os RLRs induzem a translocação de IRF-3 e IRF-7 em direção ao núcleo da célula do infectado e, em sequência, a expressão de interferons do tipo 1 a partir de uma via dependente de proteínas sinalizadoras antiviral mitocondrial (MAVS) (WILKINS; GALE, 2010).

Para mais, existem receptores de membranas endossomais que também reconhecem PAMPS virais, como o Toll-like receptor-3 (TLR-3) e Toll-like receptor-7 (TLR-7). O primeiro, consegue reconhecer o RNA de fita dupla e age por meio de uma molécula adaptadora chamada TRIF (TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β), enquanto que, o segundo reconhece RNAs virais de fita simples e atua por uma proteína adaptadora chamada de MyD88 (WILKINS; GALE, 2010). Trabalhos realizados por Proença-Módena et al (2015),

evidenciaram que camundongos nocautes para IFNAR, MAVS, IRF3 x IRF7 sucumbiram diante a infecção por OROV enquanto que camundongos wildtype (WT) se mantiveram resistentes, indicando assim, o papel crucial da transcrição de interferon do tipo 1 no modelo de infecção por OROV (PROENCA-MODENA et al., 2015, 2016).

1.4 O IRF-5

O fator regulador de interferon-5 (Irf-5, do inglês, interferon regulatory factor-5) é expresso em diversas células hematopoiéticas, incluindo células B, monócitos, macrófagos e células dendríticas (ANDERSON et al., 1961; BAISLEY et al., 1998). Induz resposta inflamatória após sinalização intracelular por TLR-MyD88 e RLR-MAVS e regula a produção de citocinas como a interleucina-6 (IL-6), interleucina-12 (IL-12) e TNF (TAKAOKA et al., 2005). Além de auxiliar na formação de imunoglobulinas (IZAGUIRRE et al., 2003).

O Irf-5 atua em conjunto com Irf-3 e Irf-7 regulando a resposta de interferons do tipo 1 (IFN-1) em células dendríticas durante o processo infeccioso causado pelo vírus Oeste do Nilo (DIAMOND; GALE, 2012). Também foi comprovado em pesquisas que animais nocautes para IRF-5, diante da infecção por OROV ou LACV, apresentavam menor concentração de anticorpos neutralizantes para este patógeno. Estes sucumbiram e desenvolveram encefalite e meningite aproximadamente 12 dias após inoculação. A deficiência deste fator fez com que OROV persistisse em células circulantes, como células dendríticas e linfócitos B. Contudo, ainda não se sabe explicar se essa diferença contribui para a neuroinvasão do vírus Oropouche (PROENCA-MODENA et al., 2016).

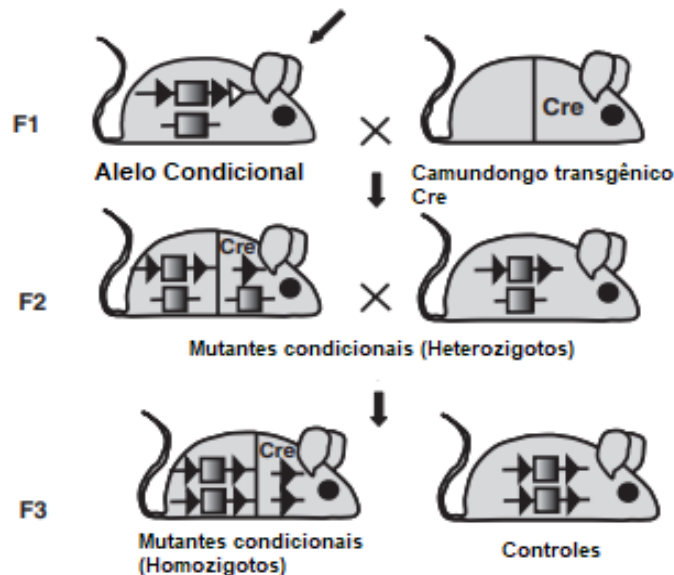
Para mais, o Irf-5 regula a expressão de Blimp-1, proteína importante para a síntese de anticorpos durante o desenvolvimento de células B, fazendo com que camundongos deficientes para IRF-5 tenham um número aumentado de células imaturas CD19+B220- e uma expansão celular reduzida em resposta a antígenos ou patógenos (LIEN et al., 2010).

1.5 SISTEMA CRE-LOXP

Com a finalidade de criar animais nocautes para o fator regulador de interferon-5, verificamos que a técnica de recombinação Cre-LoxP é a mais indicada, visto que, este sistema proveniente do bacteriófago P1 é comumente aplicado na manipulação do genoma de diferentes modelos como: culturas de células de mamíferos, plantas, leveduras e até mesmo em camundongos (ARAKI et al., 1997). As recombinações ocasionadas pelo sistema Cre-LoxP podem induzir deleção, inversão ou translocação de genes (CLAUSEN et al., 1999; NAGY et al., 2000).

Sendo assim, para que haja a produção de um fenótipo nocaute condicionado, são necessários animais que: (1) possuam a enzima Cre recombinase, a fim de que esta catalise a recombinação entre dois sítios loxP. E (2) animais com sítios LoxP, os quais possuem sequências de 34 pares de bases reconhecidos pela enzima Cre-Recombinase. Diante deste sistema, quando o propósito for a deleção de um gene alvo (também intitulado como gene loxP-flanqueado), haverá entre os dois sítios loxP a sequência que o codifica. A partir do momento em que a enzima Cre Recombinase for expressa, a região do gene entre os sítios loxP será deletada (CLAUSEN et al., 1999; NAGY et al., 2000). Dessa forma é possível obter animais que não expressam determinado gene apenas em tipos celulares específicos, apresentado na Figura 2.

Figura 2. Esquema representativo do Sistema CreLox



Fonte: Friedel et al., (2011)

2 JUSTIFICATIVA

Atualmente, é sabido que a transcrição e translocação nuclear de IRF-5 é um evento importante no controle da infecção por diversos arbovírus, incluindo aqueles neurotrópicos, como OROV. Especula-se que IRF-5 pode ser importante para a manutenção da barreira hemato-encefálica e para o desenvolvimento e maturação de linfócitos B e T específicos, importantes para o controle de manifestações clínicas tardias e reinfecções. Além disso, IRF-5 pode ser importante para o controle da infecção por arbovírus em leucócitos circulantes, evitando assim a neuroinvasão por um mecanismo conhecido como cavalo de Tróia, onde leucócitos infectados podem atravessar a barreira hemato-encefálica e carregar vírus para o interior do SNC. Assim, para elucidar alguns dos mecanismos como IRF-5 atua na restrição do

vírus OROV, resolvemos avaliar o impacto da infecção por OROV em animais que não possuem *Irf5* em macrófagos e linfócitos B.

3 OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi determinar parte do papel do *Irf-5* em macrófagos e células B para o controle da infecção por OROV em modelo murino. Para isto, foram feitas análises de replicação e tropismo viral em animais *LyzM Cre⁺ x Irf5^{f/f}* e *CD19 Cre⁺ x Irf5^{f/f}*

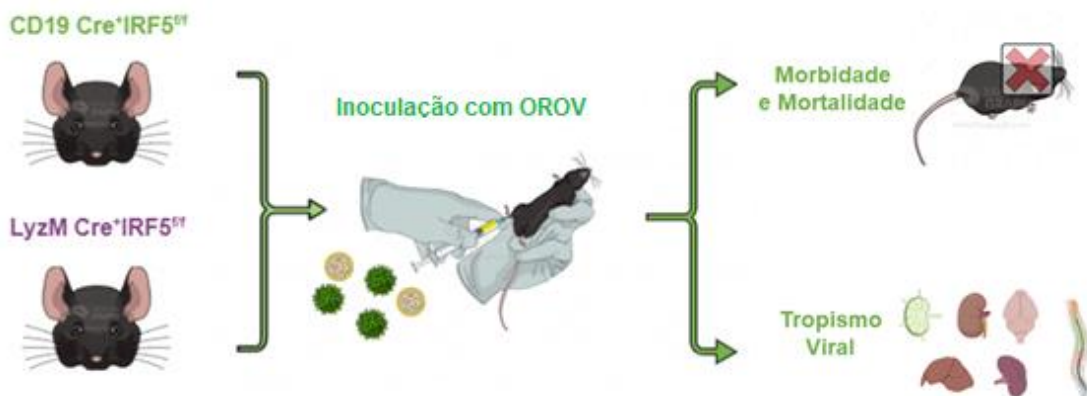
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir por meio de cruzamento e genotipagens as linhagens de animais que não expressam *Irf5* em células B (*CD19 Cre⁺ x Irf5^{f/f}*), mielócitos (*LyzM Cre⁺ x Irf5^{f/f}*).
- Determinar a morbidade e mortalidade das linhagens de camundongos produzidas infectadas com OROV.
- Estabelecer o tropismo do vírus nos órgãos destes animais por análises de carga viral no baço, fígado, cérebro, rins, linfonodos e medula espinhal.

4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

A figura 3 demonstra o fluxo de trabalho realizado nos experimentos deste estudo.

Figura 3- Delineamento experimental



Fonte: Autoria própria.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 VÍRUS

Para a realização deste projeto foi utilizado o vírus Oropouche da linhagem BeAn 19991, o qual foi cedido pelo Prof. Dr. Luiz Tadeu Morais Figueiredo (FMRP-USP). O estoque viral de OROV foi obtido após três passagens sucessivas em células C636 e Vero, depois titulado por ensaio foco infeccioso. O título obtido foi de 1×10^6 FFU/mL.

5.2. ANIMAIS E SISTEMA CRE-LOXP

No tocante aos camundongos nocautes, estes foram feitos no mesmo background genético e comprados da The Jackson Laboratory, incluindo os animais *Irf5*^{ff} (Jax #17311), *LyzM Cre*⁺ (Jax #004781) e *CD19 Cre*⁺ (Jax #006785). Os animais foram mantidos em biotério NB2, em micro isoladores, adquiridos a partir do projeto Jovem Pesquisador 2016/00194-8. Ressalta-se que o biotério NB2 se encontra no Instituto de Biologia (Bloco F) da Universidade Estadual de Campinas e o local tem aprovação do comitê interno de Biossegurança e da CTNBio CIBIO 2018/tipo2-02 (01250.017340/2018-28).

Neste trabalho foi utilizado o sistema Cre-LoxP, técnica para deleção, translocação e inversão de genes. Logo, os animais que possuíam a enzima Cre recombinase foram cruzados com animais que possuíam dois lócus LoxP para o gene *Irf5*. Com isso, foram realizados cruzamentos de *LyzMCre*⁺ com *IRF5*^{ff} e *CD19 Cre*⁺ com *Irf5*^{ff}. A partir dos descendentes da geração parental, buscou-se indivíduos Cre/LoxP.

Nestes indivíduos recombinantes, a proteína Cre localiza e se junta aos lócus loxP, realizando sinapses de DNA nestes locais, e em seguida, a quebra e junção do DNA. Produzindo assim, uma molécula recombinante em que o gene *IRF5* se encontra nocauteado condicionalmente nas células alvo deste estudo.

5.3. INOCULAÇÃO E COLETA DE TECIDOS

A inoculação dos animais foi realizada com dose letal (em animais imunossuprimidos) de 10⁶ UFF (unidades formadoras de foco) de OROV via subcutânea na pata esquerda dos camundongos de 4 semanas de idade. O inóculo foi realizado em um volume final de 50µL, após preparo em MEM (“Minimum Essential Medium Eagle”), suplementado com 4% de soro fetal bovino inativado (FBS). Para coleta dos tecidos, os animais foram sacrificados por meio de sedação com cetamina (250mg/kg) e xilazina (60mg/kg).

Os animais foram perfundidos com 20mL de PBS, pH 7,4. Ademais, realizou-se a coleta do baço, fígado, rins, linfonodos, cérebro e medula espinhal por meio da dissecação dos animais sob condições assépticas. Esses tecidos foram pesados e homogeneizados em 1mL de MEM com 5% de FBS inativado e 1% de antibiótico com auxílio de beads de zircônia em homogeneizador e mantidos a -80°C para posterior titulação viral. Para isto, foi-se obtido aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Unicamp (CEUA) de número 5423-1/2019 para realização dos experimentos propostos de acordo com o solicitado pelo guia de estudos animais.

5.4 TITULAÇÃO VIRAL

Para quantificar os vírus viáveis nas amostras, foi realizado o ensaio de foco infeccioso. Para tanto, os homogeneizados de tecidos armazenados foram descongelados, clarificados por centrifugação a 5000 xg por 10 minutos e o sobrenadante inoculado (diluições seriadas decimais) em monocamadas de células Vero crescidas em placas de 96 poços em triplicata. A leitura foi realizada pela presença de unidades formadoras de foco (FFU) após marcação com anticorpo primário policlonal anti-OROV (cat. no Ab00230-23.0) e anticorpo secundário goat anti-mouse conjugado com peroxidase seguido de revelação com o substrato para peroxidase Trypan-Blue (Sigma) após 36 horas de infecção. Os resultados foram expressos como FFU por mL de sobrenadante ou grama de tecido.

5.5 EXTRAÇÃO DE DNA E GENOTIPAGEM DE ANIMAIS CRE/LOXP

Para que fosse realizada de forma efetiva a genotipagem dos animais cruzados, foi necessário marcar cada animal a fim de individualizá-los e retirar um pequeno fragmento de sua cauda ou orelha para extração de DNA. O material coletado foi picotado e recebeu 200 uL de tampão de lise com proteinase K. Em seguida, foi incubado a 50°C overnight e após tal procedimento, este material recebeu 200 uL de tampão de lise sem proteinase K e permaneceu na incubadora em temperatura ambiente. Em seguida, as amostras receberam etanol 100% absoluto gelado e foram centrifugadas (20 min – 10.000 rpm – 4°C). O sobrenadante, produto do procedimento, foi transferido para um novo recipiente e homogeneizado até aparecer o precipitado de DNA. Posteriormente, o novo material foi centrifugado (10 min – 6.000 rpm – 4°C), tratado com etanol 70% e retornado a centrífuga nas mesmas condições. Para finalizar a extração, os tubos permaneceram invertidos para retirar o excesso de etanol. Após secagem, foi adicionado 100uL de água milli-Q para ressuspensão do material genético. Pronto para ser analisado por meio da técnica de PCR convencional.

Para isto, foram preparadas soluções para cada indivíduo que foi estudado. As reações utilizadas continham 2 µL de amostra de DNA, 2,5 µL da mistura de primers (Tabela 1) para Cre recombinase ou IRF5-flox e 12,5 µL de master Mix (Applied Biosystems). No termociclador, a fase de desnaturação ocorreu a 94°C por 5 minutos. A amplificação do produto ocorreu por 35 ciclos nas seguintes condições: 94°C por 30 segundos e anelamento-extensão a 60°C por 30 segundos e 72°C por 45 segundos. O resultado da técnica de PCR foi revelado em gel de agarose 1,5% (80W – 80 min) e buscou-se os seguintes tamanhos de pares de base: IRF5-Flox (MT: ~450pb; HT: 269pb e 450pb; WT: ~269pb), Cre (quando presente: ~300pb).

5.6 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE RNA VIRAL

A extração de RNA viral de tecidos dos animais foi realizada utilizando o kit comercial TRIzol Plus RNA Purification (Thermo Fisher Scientific) seguindo orientações do fabricante. Posteriormente, a análise das amostras de animais infectados por OROV foi realizada por qRT-PCR onestep (Applied Biosystems). Em suma, as qPCRs foram feitas com 2 µL do RNA (aproximadamente 100 ng), 2,5 µL da mistura de primers e sondas (IdT Prime Time) e 12,5 µL de master Mix (Applied Biosystems). A reação de transcriptase reversa foi realizada a 48°C por 30 minutos e a amplificação do produto ocorreu por 45 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento-extensão a 60°C por 1 minuto. Os primers e sondas específicos (Applied Biosystems) utilizados estão na Tabela 1.

Tabela 1 - Primers utilizados no estudo

Alvo	Nome	Sequência (5'-3')
OROV	OROV-F	TACCCAGATGCGATCACCAA
	OROV-R	TTGCGTCACCATCATTCCAA
	OROV-P	FAM/TGCCTTTGGCTGAGGTAAGGGCTG /36-TAMSp
Irf5<tm1Ppr>	IRF5 FLOX-F	CGTGTAGCACTCCATGCTCT
	IRF5 FLOX-R	AGGGCCTGTCCAGAATTAGG
Cre recombinase	Cre-F	CGATGCAACGAGTGATGAGG
	Cre-R	GCATTGCTGTCACTTGGTCGT

Fonte: Autoria própria

5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados coletados durante este projeto foram analisados por meio do software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, Califórnia, Estados Unidos). O teste log rank de Kaplan-Meier foi utilizado para avaliar a curva de sobrevivência, enquanto que a de perda de peso foi avaliada por ANOVA. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparar os resultados obtidos durante a quantificação viral. Ressalta-se que somente um valor menor que 0,05 foi aceito para determinar que dois valores sejam significativamente diferentes.

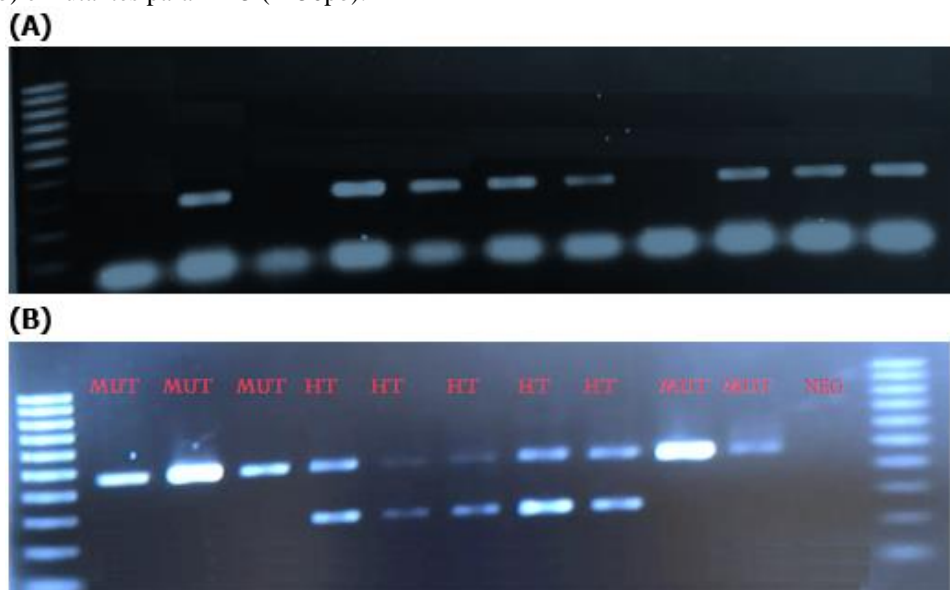
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 GENOTIPAGEM

O sistema Cre-Lox demandou tempo, uma vez que, depende do cruzamento entre a geração parental (Animal Cre transgênico x Animal com o alelo IRF5 f/f condicional), aguardar o período de gestação, cruzar a progênie heterozigota a fim de obter a progênie geração filial 2 (F2). A partir da progênie F2, foram genotipados os animais buscando verificar a presença de mutantes condicionais. Após o período de desmame, foram realizadas as infecções com OROV em mutantes condicionais e grupo controle. Foram extraídos o DNA animais desde a geração parental até a progênie filial 4 (F4) a fim de verificar quais animais possuíam o gene IRF5 deletado nos leucócitos alvos. A figura 4 demonstra os resultados visualizados ao longo da pesquisa. Foram utilizados cinco animais $LyzmCre^+$ e 11 animais $CD19 Cre^+$ como grupo controle. No tocante aos mutantes condicionais, foram utilizados cinco animais $LyzMCre^+IRF5^{f/f}$ e oito animais $CD19Cre^+IRF5^{f/f}$.

Apesar da demora em realizar os cruzamentos, o sistema Cre-Lox demonstrou ser uma ferramenta importantíssima, uma vez que, permite que retiremos a funcionalidade de um gene a fim de entendê-la em tecidos e células específicos, buscando compreender seu contexto biológico (RICKERT; ROES; RAJEWSKY, 1996. RAY; FAGAN; BRUNICARDI, 2000; FRIEDEL, 2011; SONG; PALMILTER, 2018).

Figura 4 Análise eletroforética em gel de agarose (1,5%) de produtos do PCR obtidos a partir do DNA extraído de camundongos para confirmação da presença de Cre recombinase e IRF5 flanqueado. No item (A) demonstra a presença de Cre Recombinase (~300pb) e no item (B) demonstra a presença de indivíduos heterozigotos para IRF5 (269pb e ~450pb) e mutantes para IRF5 (~450pb).



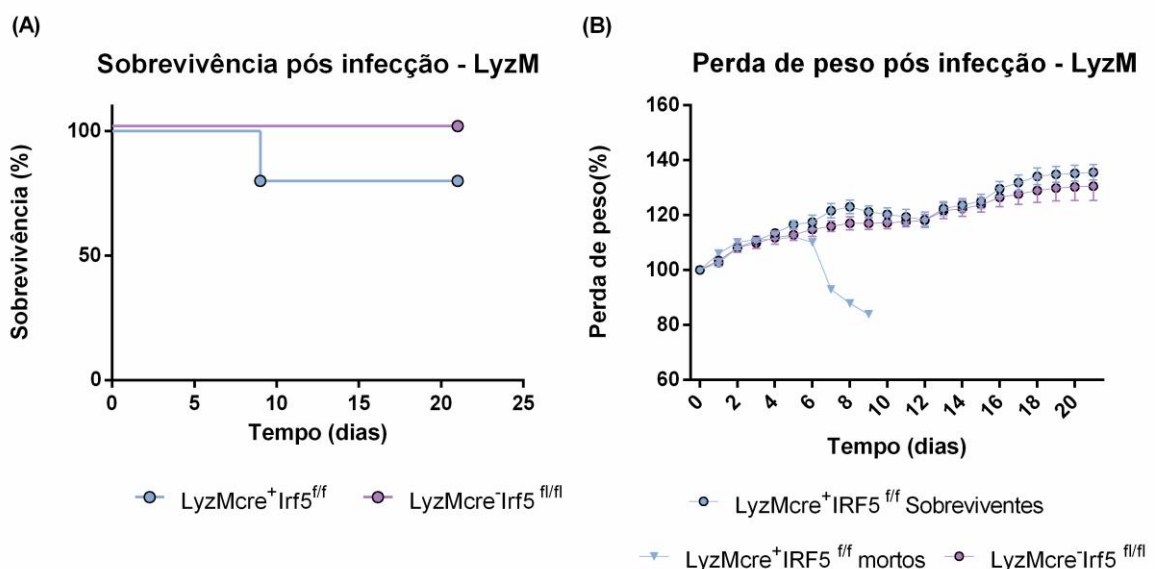
Fonte: Aatoria própria.

6.2 ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA E PORCENTAGEM DE PESO DE ANIMAIS LYZM CRE⁺ IRF5^{f/f} E CD19 CRE⁺ IRF5^{f/f} INFECTADOS COM OROV.

Para verificar a morbidade e mortalidade, os grupos de animais LyzM Cre⁺ IRF5^{f/f}, CD19 Cre⁺ IRF5^{f/f} e grupo controle foram infectados com OROV 10⁶ FFU/mL via subcutânea na pata esquerda. A infecção foi acompanhada diariamente até o 21º dia. No período pós infecção, os indivíduos que apresentaram sinais de doença foram sacrificados para a coleta dos tecidos a fim de verificarmos o tropismo de OROV. O mesmo procedimento foi realizado para os animais que não sucumbiram a infecção até o 21º dia pós infecção (dpi). No que concerne aos animais que foram encontrados mortos, também foi coletado os tecidos possíveis para análise de carga viral.

Em relação ao grupo dos animais LyzM Cre⁺ IRF5^{f/f}, um animal (n=5) sucumbiu no nono dia (FIG 5A), logo após, perder peso de forma significativa a partir do sexto dia pós infecção (FIG 5B). Não houve nenhum sinal de acometimento ou morte de indivíduos do grupo controle (n=5), conforme apresentado na figura 5.

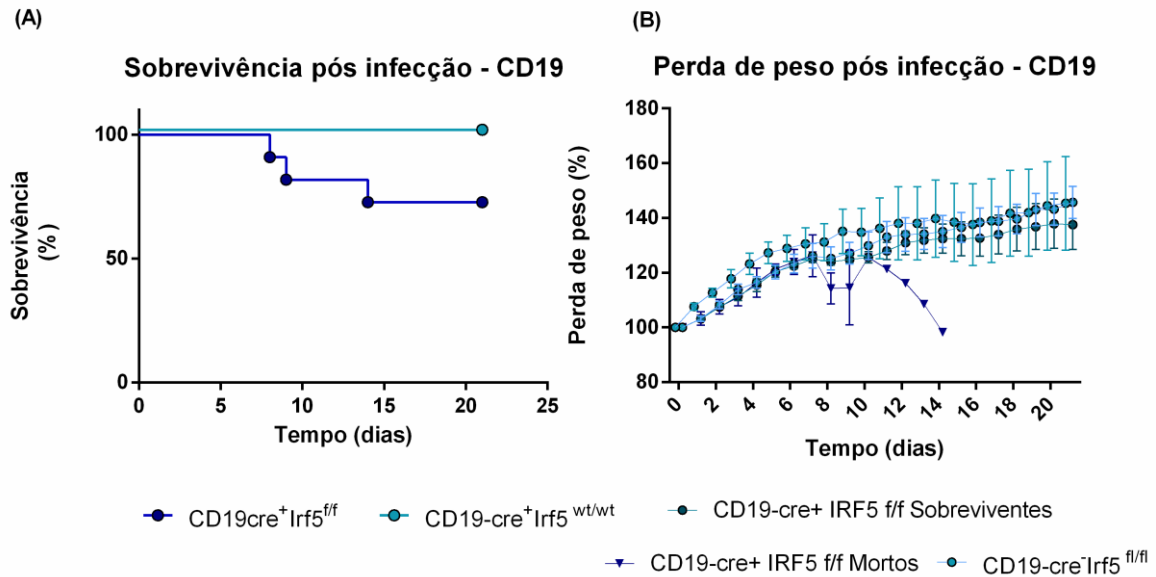
Figura 5- Sobrevivência e porcentagem dos pesos de animais LyzMCre⁺ e LyzMCre⁺IRF5^{f/f}. (A) Porcentagem de sobrevivência dos animais LyzMCre⁺ e LyzMCre⁺ IRF5^{f/f}. (B) Perda de peso de animais LyzMCre⁺ e LyzMCre⁺ IRF5^{f/f} após infecção com 10⁶ UFF de OROV via subcutânea. Os animais LyzM Cre⁺ IRF5 f/f tem a presença de pelo menos um alelo cre e 4 semanas de idade infectados com OROV (n = 5). LyzMCre⁺ de 4 semanas de idade infectados com OROV (n = 5).



Fonte: Autoria própria.

Figura 6 - Sobrevivência e porcentagem dos pesos de animais CD19Cre⁺ e CD19Cre⁺IRF5^{f/f}. (A) Porcentagem de sobrevivência dos animais CD19Cre⁺ e CD19Cre⁺ IRF5^{f/f}. (B) Perda de peso de animais CD19Cre⁺ e CD19Cre⁺ IRF5^{f/f} após infecção com 10⁶ UFF de OROV via subcutânea. Os animais CD19 Cre⁺ IRF5 f/f tem a presença

de pelo menos um alelo cre e 4 semanas de idade infectados com OROV (n = 8). CD19Cre⁺ de 4 semanas de idade infectados com OROV (n = 11).



Fonte: Autoria própria.

No que concerne o grupo dos animais CD19Cre⁺IRF5^{f/f}, três animais (n=8) sucumbiram em 8 dpi, 9dpi e 14dpi, respectivamente (FIG.6A). Dois dos indivíduos perderam peso de forma significativa a partir do sexto dia pós infecção. Ambos apresentaram paralisia de membros, tremores e letargia como sinais de acometimento neurológico. O terceiro mutante condicional começou a perder peso de forma significativa no 10dpi e foi encontrado morto no 14dpi (FIG 6B).

No tocante aos grupos controle LyzmCre⁻Irf5^{f/f} e CD19Cre⁻Irf5^{f/f}, era esperado o não aparecimento de sinais de morbidade ou mortalidade. A funcionalidade desses animais está em produzir linhagens a serem usadas com uma deleção específica de alvos flanqueados por sítios loxP em macrófagos e linfócitos B, respectivamente. Ou seja, são uma excelente ferramenta para gerar mutantes direcionados específicos para células mielóides (CLAUSEN et al., 1999) e linfóides (RICKERT; ROES; RAKEWSKY, 1997) se cruzados com animais que possuem a expressão da enzima Cre Recombinase nos tecidos-alvo ou células-alvo. Os animais adultos WT resistem a infecção por OROV, não apresentando mortalidade e sinais de morbidade (SANTOS et al., 2012; PROENÇA-MODENA et al., 2016; TOLEDO-TEIXEIRA, 2019). E o mesmo foi visto para os animais controle LyzmCre⁻Irf5^{f/f} e CD19Cre⁻Irf5^{f/f}, neste trabalho no tocante a morbidade e mortalidade.

No que concerne a mortalidade de um mutante condicional LyzM Cre⁺ IRF5^{f/f} (n=5) e três mutantes condicionais CD19Cre⁺IRF5^{f/f} (n=8), os sinais de acometimento e o tempo para os animais sucumbirem, se aproxima do que foi relatado em estudos anteriores realizados com

OROV. Exemplo disso, SANTOS et al (2012) elencou que camundongos BALB/c neonatos infectados, a partir do 5^a dia poderiam ficar gravemente doentes e morrer até o décimo dia pós infecção. Para mais, dados de mortalidade mediante a infecção por OROV também foram discutidos por Rodrigues et al (2010), em que hamsters dourados sucumbiram a infecção entre o 4^o e 11^o dia pós infecção. Em ambos os estudos, os animais acometidos pela infecção por OROV apresentaram letargia, apatia, falta de alimentação e paralisia.

Os dados de mortalidade e morbidade deste projeto também corroboram com o que foi apresentado por PROENÇA-MODENA et al. (2016), em que camundongos knockout para *Irf5* (*Irf5*^{-/-}) apresentavam sinais de doença severa com acometimento neurológico a partir do sétimo dia pós infecção com OROV, assim como, os sinais de doença incluíam tremores, paralisia de membros, letargia, perda de temperatura e perda de peso seguida de morte.

Apesar do número amostral ser pequeno, a morte dos mutantes condicionais representou 20% e 37,5% para *LyzmCre*⁺ *Irf5*^{f/f} e *CD19Cre*⁺ *Irf5*^{f/f}, respectivamente. O não acometimento total das linhagens já era esperado, uma vez que, em estudos prévios com camundongos *Irf5*^{-/-} infectados com OROV, somente 39% dos animais sucumbiram (PROENÇA-MODENA et al., 2016).

6.3 TROPISMO DO VÍRUS OROPOUCHE EM ANIMAIS *LYZMCRE*⁺ *IRF5*^{F/F} E *CD19CRE*⁺*IRF5*^{F/F}.

Para analisar o papel de *Irf-5* em macrófagos e células B por meio do modelo murino para o controle da neuroinvasão por OROV, foi realizada a análise de carga viral de OROV nos diferentes tecidos de ambas linhagens e comparado com o grupo controle.

No tocante aos mutantes condicionais controle *LyzmCre*⁻*Irf5*^{f/f}, foram encontrados altos títulos do genoma de OROV no cérebro ($3,2 \times 10^8$ FFUeq/g) e na medula espinhal ($1,96 \times 10^8$ FFUeq/g) do animal que sucumbiu em 9dpi. Curiosamente, também foram encontrados altos títulos do genoma de OROV no cérebro ($4,71 \times 10^4$ FFUeq/g) e medula espinhal ($1,92 \times 10^5$ FFUeq/g) de um mutante condicional que sobreviveu a infecção por OROV (FIG 7).

OROV também foi detectado em altos títulos no baço, fígado e rins por qRT-PCR quando comparado ao grupo controle (FIG 7). Para mais, ensaios de formação de foco infeccioso foram realizados, contudo, não foram encontradas partículas virais viáveis em nenhum tecido proveniente de animais *LyzmCre*⁻*Irf5*^{f/f} e de mutantes condicionais *LyzmCre*⁺ *IRF5*^{f/f}.

Em relação ao animal que sucumbiu, a não observação de partículas virais viáveis pode ser explicada pelo fato do animal ter sido encontrado morto. Com exceção da perda de peso, o

animal não havia apresentado sinais de acometimentos quando observado no dia anterior. Em relação ao mutante condicional que sobrevivera a infecção, não foi possível visualizar partículas virais viáveis no ensaio de foco infeccioso, assim como nos grupos controles.

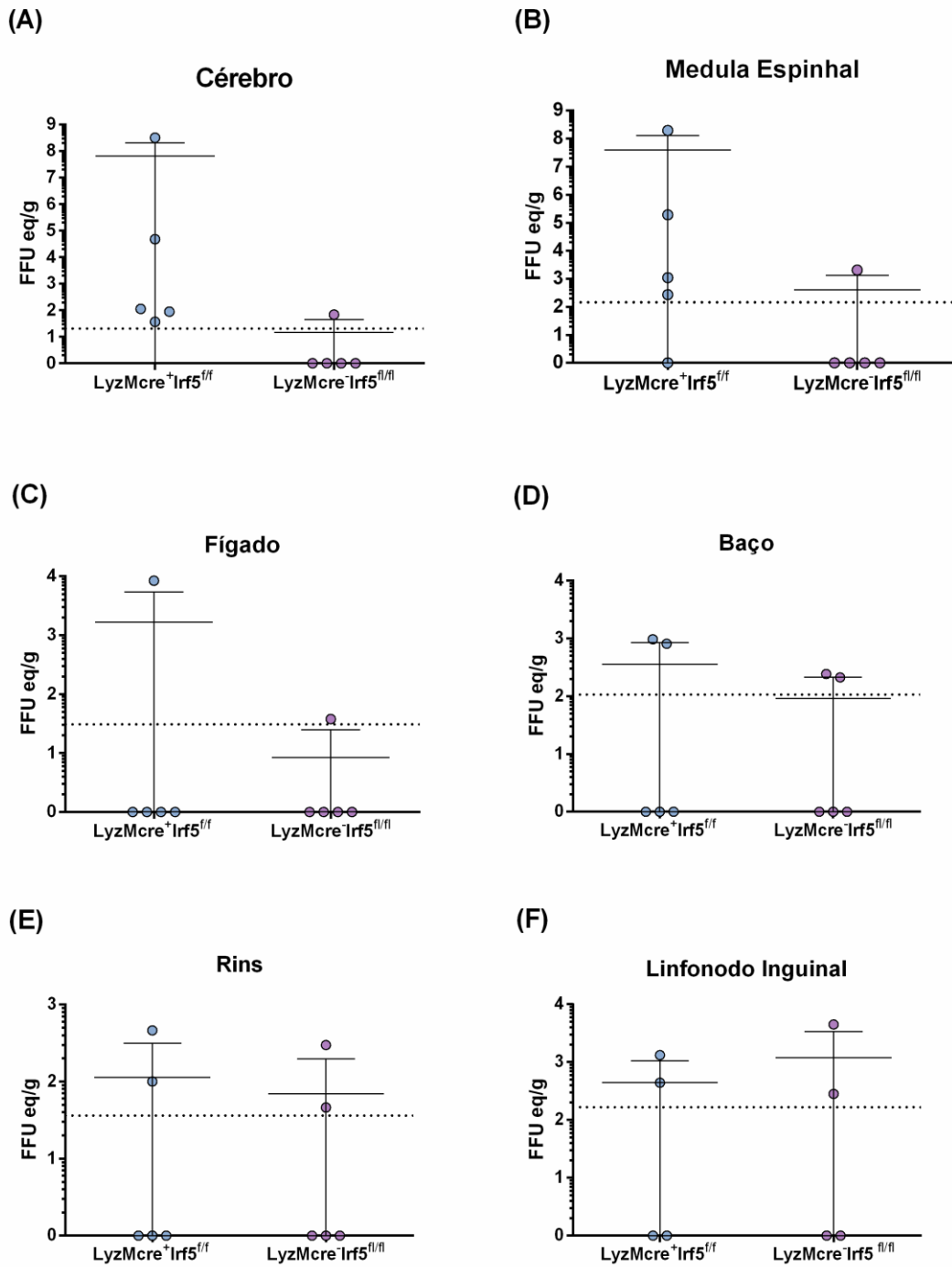
No que concerne ao grupo de mutantes condicionais $CD19Cre^+Irf5^{f/f}$, ao analisar a carga viral por RT-qPCR, foi verificado altos títulos do genoma de OROV no cérebro dos três animais que sucumbiram ($7,48 \times 10^7$ FFUeq/g; $3,72 \times 10^7$ FFUeq/g e $1,27 \times 10^4$ FFUeq/g) e na medula espinhal ($1,45 \times 10^8$ FFUeq/g; $2,75 \times 10^7$ FFUeq/g e $1,23 \times 10^6$ FFUeq/g). OROV também fora encontrado em maiores títulos no baço, fígado, rins e linfonodos dos mutantes condicionais quando comparado ao grupo controle (FIG 8).

Quanto as cargas virais analisadas nos tecidos de animais $LyzmCre^+Irf5^{f/f}$ e $CD19Cre^+Irf5^{f/f}$, utilizados neste estudo, tais dados corroboram com o que foi levantado em experimentos de cultura primária por Proença-Modena et al. (2015) em que a replicação de OROV é aumentada em células com deficiência na indução ou sinalização de interferon (IFN). Para mais, já é documentado que o efeito de componentes específicos da via de indução e sinalização de IFN restringe OROV em todos os tipos de células, principalmente em células mielóides cujo efeito inibitório é dominante (PROENÇA-MODENA et al., 2016).

A detecção de OROV no cérebro e medula espinhal dos grupos $LyzmCre^+Irf5^{f/f}$ e $CD19Cre^+Irf5^{f/f}$, assim como, a morte de mutantes condicionais destes grupos, corrobora com o que fora relatado em experimentos com animais $Irf5^{-/-}$ e WT. Proença-Modena et al. (2016) verificaram que este fator de transcrição evita a disseminação e a neuropatogênese na febre de Oropouche, uma vez que sua presença evitou que o vírus acessasse o cérebro e medula espinhal apenas em animais WT.

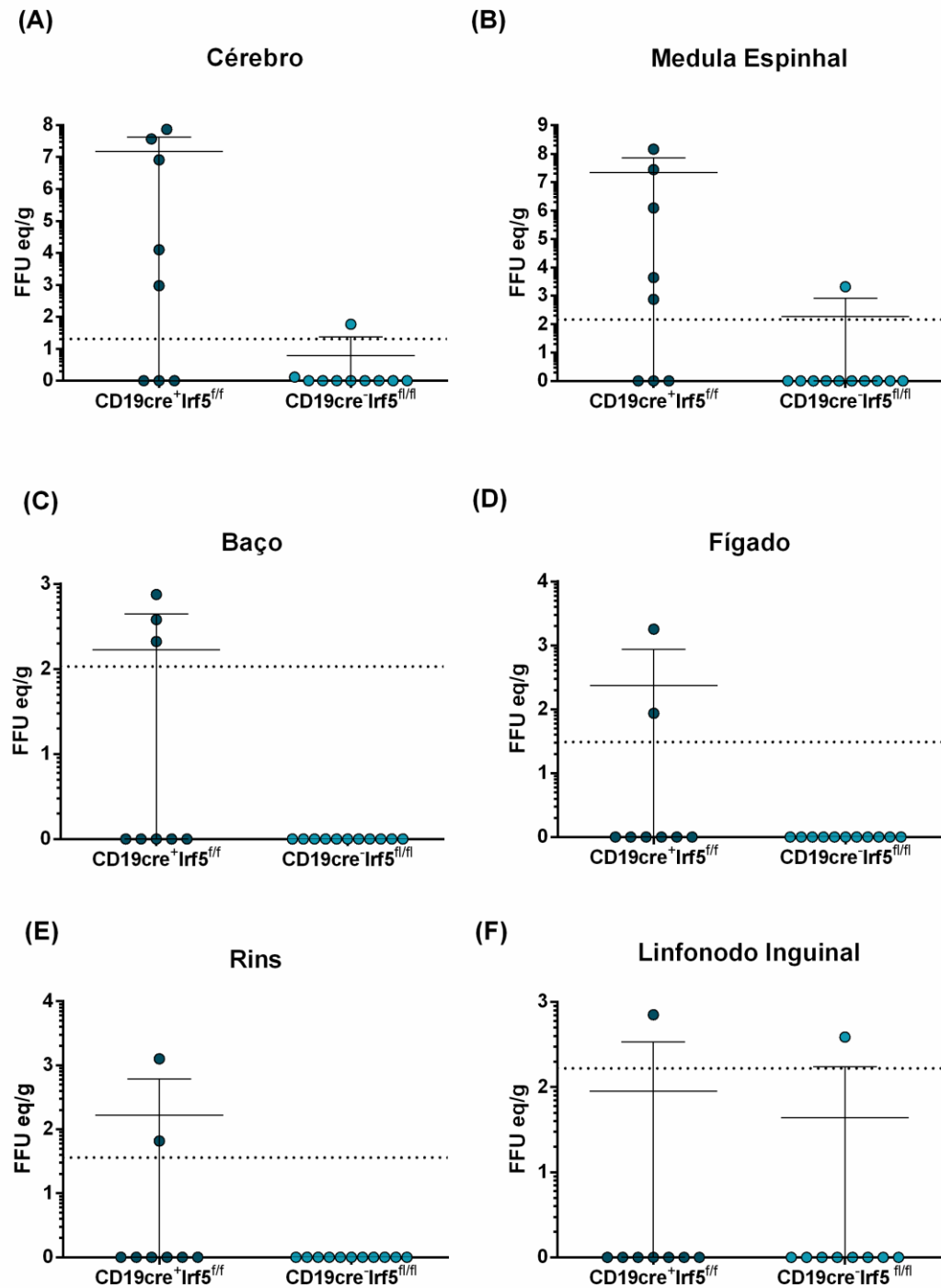
Por mais que este projeto tenha utilizado um modelo murino, os dados analisados sugerem que OROV pode infectar e se replicar macrófagos e células B quando estas células apresentam defeitos na via de sinalização de IFN. Aproximando-se do que fora trazido por Amorim et al. (2020), em que OROV infecta monócitos e células B humanas *in vitro* mediante eventos de imunossupressão.

Figura 7 - Tropismo de OROV em animais $\text{LyzMcre}^+\text{Irf5}^{\text{fl/fl}}$ e $\text{LyzMcre}^-\text{Irf5}^{\text{fl/fl}}$. Detecção do genoma realizado por rtqPCR em amostras de (A) cérebro, (B) medula espinhal, (C) fígado, (d) baço, (E) rins, (F) linfonodos. Os dados em ponto representam cada indivíduo. As barras indicam a média de valores e foi obtida a partir de cinco animais para cada grupo. As linhas pontilhadas representam o limite de detecção do ensaio.



Fonte: Autoria própria.

Figura 8 – Tropismo de OROV em animais $CD19^{cre+}Irf5^{fl/fl}$ e $CD19^{cre-}Irf5^{fl/fl}$. Detecção do genoma realizada por rtqPCR em amostras de (A) cérebro, (B) medula espinhal, (C) fígado, (d) baço, (E) rins, (F) linfonodo. Os dados em ponto representam cada indivíduo. As barras indicam a média de valores e foi obtida a partir de oito mutantes CreLox e onze animais do grupo controle. As linhas pontilhadas representam o limite de detecção do ensaio.



Fonte: Autoria própria.

Para mais, no tocante as células B, estudos prévios demonstraram que animais *Irf5*^{-/-} carecem de respostas de troca de isotipos de anticorpos, possuem maturação de células B deficiente e baixos níveis de células B de memória (LIEN et al., 2010). Estes animais nocautes ao sucumbirem devido a infecção por OROV, apresentaram menos anticorpos neutralizantes quando comparado com o grupo controle. Para uma investigação aprofundada, ensaios com camundongos quiméricos, com diferença na expressão de *Irf5* em célula B, também foram realizados. Contudo, não foi observada nenhuma diferença de morbidade e tropismo, diante infecção por OROV, quando comparado com o grupo controle (PROENÇA-MODENA et al., 2016).

Outrossim, os dados provenientes deste estudo se aproximam com o que foi elencado por Toledo-Teixeira (2019), em que camundongos μ MT (sem células B maduras) sucumbem a febre do Oropouche e apresentam sinais de doença a partir do nono dia pós infecção. Incluindo paralisia de membros, tremores, perda de peso, ataxia e letargia, indicando acometimento neurológico. É sabido que o IRF5 é necessário para a expressão da proteína Blimp-1 envolvida no processo de maturação de células B (LIAN et al., 2010; PROENÇA-MÓDENA et al. 2016), o que poderia ser um dos motivos para o fenótipo obtido neste estudo.

Para mais, elucidações sobre a função imune inata das células B e como afeta a qualidade dos anticorpos neutralizantes durante infecção primária por OROV já foram discutidas. Camundongos com células B deficientes em *MyD88*, molécula adaptadora para indução de IFN-1 e fator chave na via de sinalização em que se encontra o *Irf-5*, apresentaram baixa produção de IgG, assim como, baixa avidéz de IgM e IgG e anticorpos neutralizantes contra OROV. Estes mutantes condicionais também apresentaram doença neurológica, com altos títulos de OROV viável no Sistema Nervoso Central e órgãos periféricos (TOLEDO-TEIXEIRA et al., 2019).

Toledo-Teixeira (2019) ressalta que presença de anticorpos neutralizantes são importantes para restringir a replicação viral no início da infecção, enquanto o controle da neuroinvasão e da replicação viral no SNC em dias tardios após infecção parece ocorrer de modo independente da presença de anticorpos neutralizantes. Apesar de *MyD88* e *Irf-5* se encontrarem na mesma via de sinalização de indução de interferons e de *Irf5* estar indiretamente envolvido no processo de maturação de células B, ainda não há elucidação aprofundada sobre o papel de IRF5 em células B no tocante a avidéz e produção de isotipos de anticorpos e como isso afeta a progressão da doença para casos severos.

Assim como no trabalho de Toledo-Teixeira et al (2019), neste presente estudo, ensaios de foco infeccioso foram realizados para os mutantes condicionais *CD19Cre*⁺*Irf5*^{f/f} a fim de

verificar a possibilidade de partículas virais viáveis em amostras do cérebro, medula espinhal e baço dos animais que morreram por conta da infecção. Também foram encontrados altos títulos de OROV (apresentados na Tabela 2) no tecido cerebral de dois mutantes condicionais, os quais apresentaram sinais de acometimento neurológico e foram sacrificados logo após o aparecimento de sinais.

Tabela 2. OROV viável em tecido cerebral de animais CD19cre+IRF5 f/f. Detecção do genoma de OROV realizado por ensaio de foco infeccioso em amostras de cérebro provenientes de mutantes, os quais apresentaram sinais neurológicos.

Linhagem	Quantidade de animais analisados	Tecido Alvo	Quantidade de tecidos com OROV viável	Carga viral Log ₁₀ FFU/g (OROV)
CD19Cre+Irf5 ^{fl/fl}	8	Cérebro	2	3,2x10 ⁸ FFU/g
		Baço	0	8,3x10 ⁶ FFU/g
		Medula Espinhal	0	Não detectado
LyzmCre+Irf5 ^{fl/fl}	5	Cerebral	0	Não detectado
		Baço	0	Não detectado
		Medula Espinhal	0	Não detectado
Irf5 ^{fl/fl}	16	Cerebral	0	Não detectado
		Baço	0	Não detectado
		Medula Espinhal	0	Não detectado

Fonte: Autoria própria.

A ausência de Irf5 em macrófagos, monócitos e células B aparentam ter um papel importante, uma vez que em sua ausência, ocorreu a progressão da doença para encefalite e meningite seguida de óbito de animais, corroborando com o elencado por PROENÇA-MÓDENA et al. (2016). Além disso, este estudo evidencia que maiores investigações são necessárias para descobrir de que forma o OROV ganha acesso ao Sistema Nervoso Central.

Ademais, ensaios com os modelos animais desse estudo são cruciais, uma vez que altos títulos de OROV no cérebro e na medula espinhal foram encontrados, podendo estar relacionado com o que fora trazido por Rodrigues et al (2010) de que altos picos de OROV no

cérebro após um pico de viremia podem estar relacionados ao mecanismo de leucócitos infectados levarem o vírus ao SNC pelo mecanismo de cavalo de tróia ou transmigração.

Esse mecanismo também foi mencionado por Sakkas et al (2018) e Amorim et al (2020), evidenciando a necessidade de maiores investigações. Alguns autores questionam se o mecanismo de cavalo de Tróia, associado com a má integridade da barreira hematoencefálica poderiam promover a neuroinvasão de OROV (PROENÇA-MODENA et al., 2016). Portanto, os dados deste estudo salientam a necessidade de dar continuidade ao modelo experimental com estes leucócitos para auxiliar no preenchimento de lacunas referente a neuropatogênese de OROV.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O sistema de recombinação gênica Cre Flox é uma ferramenta importante para estudar genes alvo *in vivo*. Seu único fator limitante é o tempo de espera para alcançar o genótipo desejado. Em animais $LyzMCre^+ Irf5^{f/f}$ e $CD19Cre^+ Irf5^{f/f}$, a ausência de *Irf5* apresenta papel importante, uma vez que, animais com estes leucócitos apresentando deficiências genéticas, apresentaram sinais de doença severa com progressão para casos de encefalite, meningite, seguida de morte do animal. O vírus Oropouche apresentou tropismo para o tecido cerebral, baço, fígado, rins, medula espinhal e linfonodos inguinais. Neste estudo, foi descrito o primeiro relato de acometimento neurológico causado pela febre do Oropouche utilizando linhagens em que o *Irf5* é deletado em macrófagos e células B de modelo murino. Os resultados apresentados encorajam estudos futuros para compreender quais são os mecanismos que o vírus Oropouche utiliza para acessar o Sistema Nervoso Central, com ênfase no mecanismo de Cavalo de Tróia.

REFERÊNCIAS

- AGUILAR, P. V. et al. Iquitos virus: a novel reassortant Orthobunyavirus associated with human illness in Peru. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 5, n. 9, p. e1315, 2011.
- AMORIM, M. R. *et al.* Oropouche Virus Infects, Persists and Induces IFN Response in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells as Identified by RNA PrimeFlow™ and qRT-PCR Assays. **Viruses**, [S.L.], v. 12, n. 7, p. 785, 21 jul. 2020.
- ANDERSON, C. R. et al. Oropouche virus: a new human disease agent from Trinidad, West Indies. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 10, n. 4, p. 574-578, 1961.
- ARAKI, K. et al. Efficiency of recombination by Cre transient expression in embryonic stem cells: comparison of various promoters. **The Journal of Biochemistry**, v. 122, n. 5, p. 977-982, 1997.
- BAISLEY, K. J. et al. Epidemiology of endemic Oropouche virus transmission in upper Amazonian Peru. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 59, n. 5, p. 710-716, 1998.
- BARBOSA, N. S. et al. ESCRT machinery components are required for Orthobunyavirus particle production in Golgi compartments. **PLoS pathogens**, v. 14, n. 5, p. e1007047, 2018.
- CARTER, J. R. et al. Suppression of the arboviruses dengue and chikungunya using a dual-acting group-I intron coupled with conditional expression of the Bax C-terminal domain. **PloS one**, v. 10, n. 11, p. e0139899, 2015.
- CLAUSEN, B. E. et al. Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. **Transgenic research**, v. 8, n. 4, p. 265-277, 1999.
- COUDERC, T. et al. A mouse model for Chikungunya: young age and inefficient type-I interferon signaling are risk factors for severe disease. **PLoS pathogens**, v. 4, n. 2, p. e29, 2008.
- DAHM, T. et al. Neuroinvasion and inflammation in viral central nervous system infections. **Mediators of inflammation**, v. 2016, 2016.
- DE MENDONÇA, S. F. *et al.* Evaluation of *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and *Culex quinquefasciatus* Mosquitoes Competence to Oropouche virus Infection. **Viruses**, [S.L.], v. 13, n. 5, p. 755, 25 abr. 2021.
- DE SOUZA BASTOS, M. et al. Identification of Oropouche Orthobunyavirus in the cerebrospinal fluid of three patients in the Amazonas, Brazil. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 86, n. 4, p. 732-735, 2012.
- DIAMOND, M. S.; GALE JR, M. Cell-intrinsic innate immune control of West Nile virus infection. **Trends in immunology**, v. 33, n. 10, p. 522-530, 2012.

DONALISIO, M. R; FREITAS, A. R. R.; VON ZUBEN, A P. B. Arbovirose emergentes no Brasil: desafios para a clínica e implicações para a saúde pública. **Revista da Saúde Pública**, São Paulo, v. 51, n. 30, p.1-6, 2017.

FAUQUET, C. M. et al. **Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses**. Elsevier, 2005.

FIGUEIREDO, L. T. M et al. Vírus brasileiros da família Bunyaviridae. **Medicina (Ribeirão Preto. Online)**, v. 32, n. 2, p. 154-158, 1998.

FLINT, J. *et al.* A resposta inicial do hospedeiro: célula-autônoma e imunidade inata. In: FLINT, J. *et al.* **Princípios da Virologia**. 4. ed. Washington: Asm Press, 2015. p. 52-95.

FRIEDEL, R. H. *et al.* Generating Conditional Knockout Mice. **Methods In Molecular Biology**, [S.L.], p. 205-231, 4 out. 2010.

FLORES, E. Interações dos vírus com as células e hospedeiros. In: FLORES, Eduardo (org.). **Virologia Veterinária: Virologia Geral e doenças víricas**. Santa Maria: Editora UFSM, 2012. p. 201-253.

IZAGUIRRE, A. et al. Comparative analysis of IRF and IFN-alpha expression in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells. **Journal of leukocyte biology**, v. 74, n. 6, p. 1125-1138, 2003.

KIM, K. S. Mechanisms of microbial traversal of the blood–brain barrier. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 8, p. 625-634, 2008.

KOONIN, E. V. et al. Create a megataxonomic framework, filling all principal taxonomic ranks, for DNA viruses encoding vertical jelly roll-type major capsid proteins. **ICTV TaxoProp** 2019.003 GA v1. Varidnaviria. 2019.

LAZEAR, H. M. et al. IRF-3, IRF-5, and IRF-7 coordinately regulate the type I IFN response in myeloid dendritic cells downstream of MAVS signaling. **PLoS pathogens**, v. 9, n. 1, p. e1003118, 2013.

LIANG, G; GAO, X; GOULD, E. A. Factors responsible for the emergence of arboviruses; strategies, challenges and limitations for their control. **Emerging microbes & infections**, v. 4, n. 1, p. 1-5, 2015.

LIEN, C. et al. Critical role of IRF-5 in regulation of B-cell differentiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 10, p. 4664-4668, 2010.

NAGY, A. Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. **Genesis**, v. 26, n. 2, p. 99-109, 2000.

- PAGNI, S; FERNANDEZ-SESMA, A. Evasion of the human innate immune system by dengue virus. **Immunologic research**, v. 54, n. 1-3, p. 152-159, 2012.
- PINHEIRO, F. P. et al. Oropouche virus. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 30, n. 1, p. 149-160, 1981.
- PINHEIRO, F. P. et al. Meningitis associated with Oropouche virus infections. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 24, n. 4, p. 246-251, 1982.
- PROENCA-MODENA, J. L. et al. Oropouche virus infection and pathogenesis are restricted by MAVS, IRF-3, IRF-7, and type I interferon signaling pathways in nonmyeloid cells. **Journal of virology**, v. 89, n. 9, p. 4720-4737, 2015.
- PROENCA-MODENA, J. L. et al. Interferon-regulatory factor 5-dependent signaling restricts orthobunyavirus dissemination to the central nervous system. **Journal of virology**, v. 90, n. 1, p. 189-205, 2016.
- RICKERT, R. C.; ROES, J; RAJEWSKY, K. B lymphocyte-specific, Cre-mediated mutagenesis in mice. **Nucleic acids research**, v. 25, n. 6, p. 1317-1318, 1997.
- RODRIGUES, A. H. et al. Oropouche virus experimental infection in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). **Virus research**, v. 155, n. 1, p. 35-41, 2011.
- ROMERO-ALVAREZ, D.; ESCOBAR, L. E. Oropouche fever, an emergent disease from the Americas. **Microbes And Infection**, [S.L.], v. 20, n. 3, p. 135-146, mar. 2018.
- SANTOS, R. I. M. et al. Experimental infection of suckling mice by subcutaneous inoculation with Oropouche virus. **Virus research**, v. 170, n. 1-2, p. 25-33, 2012.
- SANTOS, R. I. M. et al. Oropouche virus entry into HeLa cells involves clathrin and requires endosomal acidification. **Virus research**, v. 138, n. 1-2, p. 139-143, 2008.
- SAKKAS, H. *et al.* Oropouche Fever: a review. **Viruses**, [S.L.], v. 10, n. 4, p. 175, 4 abr. 2018.
- SILVA, L. J. D; ANGERAMI, R. N. A importância de viroses emergentes. In: SILVA, Luiz Jacintho da; ANGERAMI, Rodrigo Nogueira. **Viroses emergentes no Brasil**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2008. Cap. 1. p. 14-20.
- TAKAOKA, A. et al. Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. **Nature**, v. 434, n. 7030, p. 243, 2005.
- TAYLOR, K. G.; PETERSON, K. E. Innate immune response to La Crosse virus infection. **Journal of neurovirology**, v. 20, n. 2, p. 150-156, 2014.
- TONELLI, E; FREIRE, L. M. S. **Doenças infecciosas na infância e adolescência**. 2. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2000. 2v

TOLEDO-TEIXEIRA, D. A. **O papel da imunidade adaptativa na neuroinvasão pelo vírus Oropouche.** 2019. Dissertação (Mestrado em Biologia Molecular e Genética – Ênfase em Microbiologia) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2019.

VASCONCELOS, H. B. et al. Molecular epidemiology of Oropouche virus, Brazil. **Emerging infectious diseases**, v. 17, n. 5, p. 800, 2011.

WILKINS, C; GALE JR, M. Recognition of viruses by cytoplasmic sensors. **Current opinion in immunology**, v. 22, n. 1, p. 41-47, 2010.