



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

STÉFANIE PRIMON MURARO

O PAPEL DAS VIAS DE RECONHECIMENTO INATO E DOS
INTERFERONS DO TIPO I E III NA QUEBRA DA BARREIRA
PLACENTÁRIA APÓS INFECÇÃO POR OROV

CAMPINAS

2024

STÉFANIE PRIMON MURARO

**O PAPEL DAS VIAS DE RECONHECIMENTO INATO E DOS
INTERFERONS DO TIPO I E III NA QUEBRA DA BARREIRA
PLACENTÁRIA APÓS INFECÇÃO POR OROV**

*Tese apresentada ao Instituto de Biologia
da Universidade Estadual de Campinas
como parte dos requisitos exigidos para a
obtenção do título de Doutora em
Genética e Biologia Molecular, na Área
de Imunologia*

Orientador: PROF. DR. JOSÉ LUIZ PROENÇA MODENA

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA
PELA ALUNA STÉFANIE PRIMON
MURARO, E ORIENTADA PELO PROF. DR.
JOSÉ LUIZ PROENÇA MODENA

CAMPINAS

2024

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

M931p Muraro, Stéfanie Primon, 1991-
O papel das vias de reconhecimento inato e dos interferons do tipo I e III na quebra da barreira placentária após infecção por OROV / Stéfanie Primon Muraro. – Campinas, SP : [s.n.], 2024.

Orientador: José Luiz Proença Módena.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Instituto de Biologia.

1. Infecções por Bunyaviridae. 2. Placenta - Imunologia. I. Módena, José Luiz Proença, 1979-. II. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Instituto de Biologia. III. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: The role of innate recognition pathways and type I and III interferons in barrier disruption followed by OROV infection

Palavras-chave em inglês:

Bunyaviridae infections

Placenta - Immunology

Área de concentração: Imunologia

Titulação: Doutora em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

José Luiz Proença Módena [Orientador]

Cristina Beatriz Cazabuena Bonorino

Fabio Trindade Maranhão Costa

Murilo de Carvalho

Rafael Freitas de Oliveira Franca

Data de defesa: 03-05-2024

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-5105-6659>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/6497813445079425>

Campinas, 03 de maio de 2024

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. José Luiz Proença Modena (Presidente da comissão examinadora)

Profa. Dra. Cristina Beatriz Cazabuena Bonorino

Prof. Dr. Fábio Trindade Maranhão Costa

Prof. Dr. Murilo de Carvalho

Prof. Dr. Rafael Freitas de Oliveira Fonseca

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica do aluno.

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular da Unidade do Instituto de Biologia.

DEDICATÓRIA

Dedico a todos aqueles a quem esta pesquisa possa ajudar de alguma forma.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de começar agradecendo a quem me ajudou a dar os primeiros passos na carreira científica, meus pais Nelci e Nelson. O amor e apoio incondicional, além do esforço em prover o que eu precisava para continuar nessa jornada de conhecimento infinito, foram a base para que eu chegasse até aqui. Obrigada.

Agradeço ao meu avô e avó, Marcos e Otília, que apesar de não compreenderem o que é fazer ciência sempre me mantiveram em suas preces torcendo para que tudo desse certo.

Gostaria de agradecer a todos meus mentores que ajudaram no meu crescimento desde a iniciação científica até o doutorado. Principalmente ao meu orientador Zé, uma figura que inspira pela sua dedicação, cuidado e conhecimento e que tornou ainda maior minha paixão por estudar imunologia e virologia.

Devo um agradecimento especial a minha melhor amiga Gabriela, colega de vida, de apartamento e de laboratório que compartilhou muitos momentos bons e ruins ao longo de anos e anos de amizade. Foi meu apoio emocional e social quando saí de casa, contribuiu e ainda contribui muito no meu crescimento como pessoa.

Agradeço às minhas amigas especiais, amigos e colegas que tornaram meus dias mais alegres e divertidos e que sempre estão disponíveis para um desabafo ou uma fofoca. Pessoas que contribuíram para o café de todo dia, para as risadas, para as infinitas horas jogando, para os experimentos, para academia e para o vôlei. Os dias ficam mais leves com pessoas assim.

Por fim, agradeço a todos os órgãos de fomento que tornaram possível o desenvolvimento da minha tese de doutorado. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de S. Paulo (FAPESP) -2018/13645-3 e 2021/10615-9; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) -162104/2018-9 e Fundo de apoio ao ensino, pesquisa e extensão (FAEPEX) - 21814-24.

“I am looking for someone to share in an adventure that I am arranging, and it's very
difficult to find anyone.”

— J.R.R. Tolkien, *The Hobbit: or There and Back Again*

RESUMO

O *Orthobunyavirus oropoucheense* (OROV) é um arbovírus capaz de causar epidemias e levar a uma doença febril que pode evoluir para complicações neurológicas e hemorrágicas em humanos. Embora alguns estudos tenham demonstrado que a infecção por OROV provoca uma resposta imunológica dependente da produção de interferon tipo I, atualmente faltam dados que investiguem o impacto potencial do OROV na gravidez e o papel dessa citocina para o controle da infecção fetal e placentária. Para isso, infectamos camundongos grávidas WT, SJL, *Ifnar1*^{-/-}, *IL28Ra*^{-/-} e *Mavs*^{-/-} e linhagens celulares de trofoblastos humanos com OROV. Nossos achados indicam que a infecção por OROV desencadeia o desenvolvimento de uma resposta antiviral em linhagens celulares trofoblásticas, envolvendo a produção de interferons do tipo I e III. O estudo também estabeleceu um modelo de transmissão materno-fetal ao infectar fêmeas grávidas por via intravenosa, no 10º dia embrionário, resultando em diferenças significativas nos resultados com base na diferença genética dos camundongos. Os cruzamentos no qual a fêmea possui deleção de *Ifnar1* leva a altas cargas virais na placenta e no feto enquanto que os cruzamentos em que a fêmea possui deleção parcial de *Ifnar1* permitem albergar baixas concentrações virais, mas ainda capazes de chegar ao feto sugerindo um papel crítico da sinalização do interferon tipo I na patogênese da infecção congênita por OROV. Além disso, os dados ainda indicam que OROV pode atravessar a barreira placentária independentemente da origem genética da fêmea, do macho ou do genótipo fetal. O RNA viral foi detectado 8 dias após infecção nos tecidos fetais, mas nenhum vírus infeccioso foi encontrado. Surpreendentemente, a proteção esperada oferecida pelo IFN tipo III durante a infecção por OROV não foi observada, já que animais *IL28Ra*^{-/-} não foram mais susceptíveis à infecção. Estes resultados esclarecem as complexas interações entre o vírus e a resposta imune do hospedeiro durante a transmissão placentária-fetal do OROV.

ABSTRACT

The *Orthobunyavirus oropoucheense* (OROV) is an arbovirus capable of causing epidemics and leads to a febrile illness that can escalate to neurological and hemorrhagic complications in humans. While some studies have shown that OROV infection elicits an immune response reliant on type I interferon production, there is currently a lack of data investigating the potential impact of OROV on pregnancy and the role of this cytokine in the control of fetal and placental infection. For this, we infected pregnant WT, SJL, *Ifnar1*^{-/-}, *IL28Ra*^{-/-} and *Mavs*^{-/-} mice along with human trophoblasts cell lines with OROV. Our findings indicate that OROV infection triggers the development of an antiviral response in trophoblast cell lines, involving the production of type I and III interferons. The study also established a maternal-fetal transmission model by infecting intravenously pregnant dams, on embryonic day 10 resulting in significant differences in outcomes based on the genetic background of the mice. Crosses in which the female has a deletion of *Ifnar1* lead to high viral loads in the placenta and fetus, while crosses in which the female has a partial deletion of *Ifnar1* allow harboring low viral concentrations, but still capable of reaching the fetus, suggesting a critical role of type I interferon signaling in the pathogenesis of congenital OROV infection. Furthermore, the data also indicates that OROV can traverse the placental barrier regardless of the genetic background of the dam, sire, or fetal genotype. Viral RNA was detected as early as 8 days after infection in fetal tissues, but no infectious virus was found. Surprisingly, the expected protection offered by IFN-type III during OROV infection was not observed, since *IL28Ra*^{-/-} mice were not more susceptible to OROV infection. These results shed light on the complex interactions between the virus and the host's immune response during placental-fetal transmission of OROV.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---|----|
| Figura 1: Distribuição de casos de Oropouche no estado do Amazonas | 18 |
| Figura 2: Cronologia dos surtos de febre Oropouche | 19 |
| Figura 3: Supostos eventos de rearranjo que geraram a atual diversidade genômica do OROV na América do Sul | 20 |
| Figura 4: Distribuição de <i>Culicoides paraensis</i> nas Américas | 22 |
| Figura 5: Ativação da resposta de interferon através de detecção de padrões moleculares associados a patógenos | 25 |
| Figura 6: Linha do tempo da placentação humana e de camundongo | 30 |
| Figura 7: Mecanismos de defesa imunológica placentária | 31 |
| Figura 8: Infecção por OROV em camundongos não grávidos | 42 |
| Figura 9: Caracterização da infecção por OROV em animais com resposta parcial de IFN | 44 |
| Figura 10: Diferentes backgrounds genéticos em camundongos prenhes infectados com OROV | 48 |
| Figura 11: Infecção por OROV em camundongos prenhes que receberam anti-Ifnar em comparação com WT | 49 |
| Figura 12: Coleta de tecido de camundongos prenhes infectados com OROV 3 dias após a placentação | 50 |
| Figura 13: Tamanho e peso dos fetos de camundongos após infecção materna com OROV | 53 |
| Figura 14: Carga viral em camundongos deficientes para as vias inatas de Myd88 e MAVS | 54 |
| Figura 15: Análise histológica de cruzamentos Ifnar1 ^{+/-} x Ifnar1 ^{-/-} em E17.5 após infecção com OROV | 56 |
| Figura 16: Titulação de homogenatos de decídua e placenta por ensaio de foco infeccioso | 58 |
| Figura 17: Cinética de replicação de OROV em linhagens de células BeWo | 59 |
| Figura 18: Cinética de replicação de OROV em linhagens de células JEG-3 | 60 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|--------------|
| Tabela 1- Principais arbovírus endêmicos na América tropical | 17 |
| Tabela 2: Ciclagem utilizada no PCR convencional | 35 |
| Tabela 3: Oligonucleotídeos utilizados para PCR convencional | 35 |
| Tabela 4: Sequências dos primers utilizados para qPCR | 37-39 |
| Tabela 5: Genótipo fetal e proporções sexuais de cada cruzamento | 51 |
| Tabela 6: Taxa de reabsorção entre cruzamentos | 51 |

LISTA DE ABREVIÇÕES

| | |
|---------------------------------|--|
| AC | Acre |
| ADAR | Adenosina deaminase RNA-específica |
| AM | Amazonas |
| APOBEC | Enzima de edição de mRNA apolipoproteína B |
| ATCC | <i>American Type Culture Collection</i> |
| Axl | Receptor tirosina-quinase UFO |
| BSA | Albumina bovina sérica |
| BUNV | <i>Orthobunyavirus bunyamweraense</i> |
| CCHFV | <i>Orthonairovirus haemorrhagiae</i> ou vírus da febre hemorrágica de Crimean-Congo |
| CCL22 | Quimiocina 22 com motivo C-C |
| cDNA | DNA complementar |
| CHIKV | <i>Chikungunya virus</i> ou vírus chikungunya |
| Ck7 | Citoqueratina 7 |
| CMC | Carboximetilcelulose |
| CRL | Comprimento cabeça-nádega |
| CTB | Citotrofoblasto |
| CXCL-10 | Ligante 10 de quimiocina com motivo C-X-C / proteína 10 induzida por interferon gama |
| CXCL-8 | Ligante 8 de quimiocina (motivo C-X-C), IL-8 |
| DAI | Ativador DNA-dependente de IRFs |
| DC | Célula dendrítica |
| DENV | <i>Orthoflavivirus denguei</i> ou vírus da Dengue |
| DMEM | Meio de Eagle modificado por Dulbecco |
| DP | Desvio-padrão |
| dsRNA | RNA dupla-fita |
| EDTA | Ácido etileno diamino tetracético tetrassódico |
| EEEV | <i>Eastern equine encephalitis virus</i> ou vírus da encefalite equina do Leste |
| EIV | Espaço interviloso |
| EUA | Estados Unidos da América |
| GAPDH | Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase |
| Gas6 | Proteína específica de parada de crescimento 6 |
| Glut1 | Transportador de glicose 1 |
| HET | Heterozigoto |
| HIF1a | Fator induzível por hipóxia 1-alfa |
| HRE | Elementos de resposta à hipóxia |
| IFIT1 | Proteína induzida por interferon com tetratricopeptídeo repete 1 |
| IFIT2 | Proteína induzida por interferon com tetratricopeptídeo repete 2 |
| IFITM2 | Proteína transmembrana induzida por interferon 2 |
| IFITM3 | Proteína transmembrana induzida por interferon 3 |
| IFN | Interferon |
| Ifnar1 | Receptor de interferon do tipo I |
| IFN-α | Interferon alpha |
| IFN-β | Interferon beta |
| IFN-γ | Interferon gama |
| IFN-λ | Interferon lambda |

| | |
|------------------|--|
| IgG | Imunoglobulina G |
| IgM | Imunoglobulina M |
| IL-1 | Interleucina 1 |
| IL-10 | Interleucina 10 |
| IL-17A | Interleucina 17A |
| IL-5 | Interleucina 5 |
| InLN | Linfonodo inguinal |
| IPS1/Mavs | Estimulador do promotor de <i>Ifnb1</i> / proteína de sinalização antiviral mitocondrial |
| IQTV | Vírus Iquitos |
| IRF | Fator regulatório de interferon |
| ISG | Genes estimulados por interferon |
| ISG15 | Proteína estimulada por interferon de 15 kDa |
| ISRE | Elementos responsivos estimulados por IFN |
| JEV | <i>Orthoflavivirus japonicum</i> ou vírus da encefalite japonesa |
| JZ | Zona juncional |
| KO | Nocaute |
| L | Segmento grande |
| LCMV | <i>Mammarenavirus choriomeningitidis</i> ou vírus da coriomeningite linfocítica |
| LZ | Zona do labirinto |
| M | Segmento médio |
| MAYV | <i>Mayaro virus</i> ou vírus Mayaro |
| MD2 | Proteína de diferenciação mielóide 2 |
| MDA5 | Gene associado à diferenciação de melanoma 5 |
| MDDV | Vírus Madre de Deus |
| Mertk | Receptor tirosina-quinase Mer |
| MOI | Multiplicidade de infecção ou <i>multiplicity of infection</i> |
| MxA | Proteína 1 de resistência ao myxovírus humano |
| Myd88 | Resposta primária de diferenciação mielóide 88 |
| NaOH | Hidróxido de sódio |
| NF- κB | Fator nuclear kappa B |
| NK | Células <i>natural killer</i> |
| OAS | 2'5'-oligoadenilato sintetase |
| OAS1 | 2'-5'-oligoadenilato sintetase 1 |
| OASL | Semelhante à 2'-5'-oligoadenilato sintetase 1 |
| OMS/WHO | Organização Mundial da Saúde |
| OPAS/PAHO | Organização Pan Americana da Saúde |
| OROV | <i>Orthobunyavirus oropoucheense</i> ou vírus Oropouche |
| PAMP | Padrões moleculares associados a patógenos |
| PBMC | Células mononucleares do sangue periférico |
| PBS | Solução salina tamponada com fosfato |
| PC | Placa coriônica |
| PCR | Reação em cadeia da polimerase |
| PEDV | Vírus Perdoes |
| PFA | Paraformaldeído |
| PFKFB3 | 6-fosfofructo-2-quinase / frutose-2,6-bifosfatase 3 |
| PKM2 | Piruvato quinase M2 |
| PKR | Proteína quinase dsRNA-dependente induzida por IFN |

| | |
|------------------------------------|---|
| PPP | 5' trifosfato |
| ProtS | Proteína S |
| PRR | Receptores de reconhecimento padrão |
| RIG-I | Gene induzível por ácido retinóico I |
| RLR | Receptor semelhantes a RIG |
| RNaseL | Ribonuclease L |
| ROCV | Rocio vírus ou vírus Rocio |
| RR | Roraima |
| RVFV | <i>Phlebovirus riftense</i> ou vírus da febre do Vale do Rift |
| S | Segmento pequeno |
| SBV | <i>Orthobunyavirus schmallenbergense</i> ou vírus Schmallenberg |
| SFB | Soro fetal bovino |
| SIN | Sinciciotrofoblasto |
| SLEV | <i>Orthoflavivirus louisense</i> ou vírus da encefalite de Saint Louis |
| SNC | Sistema nervoso central |
| SOD | Distância focinho-occipital |
| ssRNA | RNA fita-simples |
| STAT1 | Transdutor de sinal e ativador de transcrição 1 |
| TAM | Família de receptores tirosina-quinase |
| Th17 | Célula T auxiliar 17 |
| Th2 | Célula T auxiliar 2 |
| TIM-1 | Domínio-1 de mucina de imunoglobulina de células T |
| TLR | Receptor do tipo <i>Toll</i> |
| TNF-α | Fator de necrose tumoral alpha |
| Treg | Célula T regulatória |
| TRIM | Proteína contendo motivo tripartido |
| Tris-HCl | Cloridrato de tris (hidroximetil) aminometano |
| Tyro3 | Receptor tirosina-quinase 3 |
| VEEV | <i>Venezuelan equine encephalitis virus</i> ou vírus da encefalite equina venezuelana |
| Vim | Vimentina |
| VLP | Partículas semelhantes a vírus |
| WEEV | <i>Western equine encephalitis virus</i> ou vírus da encefalite equina do Oeste |
| WNV | <i>Orthoflavivirus nilense</i> ou vírus do Oeste do Nilo |
| WT | Camundongo selvagem |
| YFV | <i>Orthoflavivirus flavi</i> ou vírus da febre amarela |
| ZIKV | <i>Orthoflavivirus zikaense</i> ou vírus Zika |
| $\Delta\Delta$CT | Delta delta Ct |

SUMÁRIO

| | |
|--|-----|
| 1.Introdução | 16 |
| 1.1 Arbovírus | 16 |
| 1.2 Vírus Oropouche (OROV) | 19 |
| 1.3 Patogênese do OROV | 23 |
| 1.4 Interferon do tipo I e III e o reconhecimento viral | 24 |
| 1.5 O papel do interferon tipo I e das vias de reconhecimento inato e adaptativo na infecção por OROV | 26 |
| 1.6 Desenvolvimento placentário e resposta imunológica | 28 |
| 2. Justificativa e hipótese de trabalho | 32 |
| 3. Objetivos | 33 |
| 4. Metodologia | 34 |
| 5. Resultados | 42 |
| 5.1 Caracterização da cinética de replicação viral através da infecção intravenosa (i.v) de OROV em camundongos fêmeas não grávidas | 42 |
| 5.2 Estabelecimento de um modelo de transmissão materno-fetal através da infecção intravenosa (iv.) de OROV em fêmeas grávidas (modelo inicial E10-E16.5) | 43 |
| 5.3 Estabelecimento de um modelo de transmissão materno-fetal através da infecção intravenosa (iv.) de OROV em fêmeas grávidas (modelo inicial E9.5-E17.5) | 46 |
| 5.4 Caracterização do papel das vias imunológicas de reconhecimento viral no controle da replicação de OROV durante a gestação utilizando camundongos deficientes em Myd88 e MAVS. | 54 |
| 5.5 Determinação do efeito de IFN-I na arquitetura placentária durante a infecção por OROV através da análise histológica da placenta de camundongos grávidas infectados. | 54 |
| 5.6 Detecção de partículas infecciosas na placenta de camundongos infectados por OROV. | 56 |
| 5.7 Caracterização do efeito in vitro de OROV sobre linhagens de células placentárias de humanos, caracterizando a cinética de replicação, a expressão de genes relacionados à resposta imune inata, a produção de citocinas após infecção com OROV. | 58 |
| 7.Conclusão | 71 |
| 8. Referências bibliográficas | 72 |
| ANEXO I- ARTIGOS PUBLICADOS NÃO ASSOCIADOS À TESE- 1ª AUTORIA | 87 |
| ANEXO II- ARTIGOS PUBLICADOS NÃO ASSOCIADOS À TESE | 89 |
| ANEXO III- ARTIGOS SUBMETIDOS OU EM FASE DE PUBLICAÇÃO | 109 |
| ANEXO IV –CEUA UNICAMP | 110 |
| ANEXO V – CEUA USP-SP | 115 |
| ANEXO VI – CEP CAISM | 116 |
| ANEXO VII- CEP UNICAMP | 118 |
| ANEXO VIII- CEP WASHINGTON UNIVERSITY | 129 |
| ANEXO IX- DECLARAÇÃO DE DIREITOS AUTORAIS | 130 |

1.Introdução

1.1 Arbovírus

Os Arbovírus (do inglês: “*Arthropod-borne virus*”) representam um grupo extensivo de vírus com genoma de RNA e que compreendem as famílias *Flaviviridae*, *Togaviridae*, *Bunyaviridae*, *Rhabdoviridae* e *Reoviridae* (Ketkar, 2019; Karabatsos, 1985; Tabachnick, 2016). O vírus da febre suína africana da família *Asfarviridae* é o único representante com genoma de fita-dupla de DNA transmitido por artrópodes (Costard, 2013). Para sua transmissão, arbovírus necessitam de vetores artrópodes que compreendem mosquitos, moscas e carrapatos nos quais ocorre a replicação viral e subsequente transmissão a um hospedeiro vertebrado. Os arbovírus apresentam dois ciclos, um silvático e um enzoótico onde há transmissão para animais selvagens ou transmissão para humanos e animais domésticos, respectivamente (Weaver, 2010; Agarwal,2017).

As manifestações clínicas associadas aos arbovírus podem variar desde doenças febris não específicas, erupções cutâneas e artralgia, até síndromes hemorrágicas ou neurológicas (Gubler, 2001).

Alterações climáticas e ambientais induzidas pela atividade humana têm provocado uma redistribuição de artrópodes em todo o globo, o que impacta diretamente na probabilidade de surgimento de doenças emergentes transmitidas por esses vetores. Diferenças na temperatura, humidade e precipitação podem afetar diretamente o ciclo replicativo e o comportamento dos artrópodes permitindo que se estabeleçam em novas áreas geográficas expondo a população a arboviroses anteriormente não detectadas (Walton, 2014; Zhang, 2014; Althouse, 2015; Brady, 2014; Tabachnic, 2016).

De fato, muitas das doenças emergentes que surgiram nos últimos 50 anos foram associadas com a disseminação de artrópodes vetores, principalmente aquelas doenças causadas por arbovírus tais como o *Orthoflavivirus denguei* (DENV), *Orthoflavivirus nilense* (WNV), *Orthoflavivirus flavi* (YFV), *Orthoflavivirus zikaense* (ZIKV), *Orthoflavivirus japonicum* (JEV), *Chikungunya virus* (CHIKV), *Mayaro virus* (MAYV) e *Orthobunyavirus oropoucheense* (OROV) (Theiler, 1973; Shope, 1997; Figueiredo, 2007).Uma parte desses vírus se mantém na natureza em vetores artrópodes e hospedeiros amplificadores vertebrados, podendo ser transmitidos diretamente do vetor para um hospedeiro humano, como observado para CHIKV, DENV, ZIKV e OROV. Já

outros arbovírus precisam ser amplificados em hospedeiros intermediários para serem transmitidos por vetores para humanos (Figueiredo, 2007; Burt, 2012; Lopes, 2014; Wasay, 2015).

Tabela 1- Principais arbovírus endêmicos na América tropical

| | Principais vetores | Primeira descrição do vírus (ano e país) | Surtos anteriores e circulação contínua |
|---|---|--|---|
| Alphavirus genus | | | |
| Mayaro (Figueiredo, 2007 e 2014; Lednický, 2015; Mackay, 2016) | <i>Haemagogus</i> spp | 1954 (Trinidad e Tobago) | Surtos anteriores e circulação contínua na América do Sul e no Caribe |
| Chikungunya (Figueiredo, 2007 e 2014; Weaver, 2015) | <i>Aedes aegypti</i> | 1952 (Tanzânia) | Possíveis surtos nos séculos XVIII e XIX; espalhado nas Américas desde 2013; ainda circulando em 2017* |
| Venezuelan equine encephalitis (Weaver, 2004; Figueiredo, 2007) | <i>Culex</i> spp; <i>Ochlerotatus</i> ; <i>Pseudophora</i> spp | 1938 (Venezuela) | Vários surtos (em humanos e cavalos) desde 1938 na América do Sul e Central, México e sul dos EUA; último surto (75.000–100.000 casos humanos) em 1995 na Venezuela e na Colômbia |
| Eastern equine encephalitis (Figueiredo, 2007; Carrera, 2013) | <i>Culex pedroí</i> ; <i>Aedes taeniorhynchus</i> | 1938 (EUA) | Encefalite equina e humana esporádica na América do Norte, um pequeno surto no Panamá em 2010 e apenas três casos notificados na América Latina (Trinidad e Tobago e Brasil) |
| Western equine encephalitis (Aréchiga-Ceballos, 2015) | <i>Aedes</i> spp; <i>Culex</i> spp | 1930 (EUA) | Surtos generalizados de epizootias equinas e epidemias de encefalite na América Ocidental e do Norte entre as décadas de 1930 e 1950; surtos epizooticos em 1972–73 e 1982–83 na Argentina; e casos esporádicos na América do Sul (Uruguai em 2009) |
| Flavivirus genus | | | |
| Zika (Zanluca, 2015; Musso, 2016; Baud, 2017) | <i>Aedes aegypti</i> | 1947 (Uganda) | Difundido nas Américas a partir de 2015; circulação diminuindo em 2017† |
| Yellow fever (Figueiredo, 2007; Couto-Lima, 2017; Ortiz-Martinez, 2017; Rossetto, 2017) | <i>Haemagogus</i> spp; <i>Sabethes</i> ; <i>Aedes aegypti</i> | 1927 (Gana) | 13 países americanos são considerados endêmicos pela OMS; § circulação contínua no Brasil em 2016–17 |
| Dengue (Gubler, 2004; Brathwaite, 2012) | <i>Aedes aegypti</i> ; <i>Aedes albopictus</i> | 1944 (Japão) | Arbovírus mais comuns na América Latina (0,9–2,4 milhões de casos anualmente na última década)* |
| Rocio (Figueiredo, 2007; de Figueiredo, 2014; Travasso da Rosa, 2017) | <i>Psorophora ferox</i> | 1975 (Brasil) | Apenas um surto no Brasil em 1973–80 (cerca de 1.000 casos) |
| Saint Louis encephalitis (Figueiredo, 2007; de Figueiredo, 2014; Silva, 2014) | <i>Culex declivator</i> ; <i>Culex coronator</i> | 1933 (EUA) | Circulação contínua nas Américas, do Canadá à Argentina |
| Orthobunyavirus genus | | | |
| Oropuche (Figueiredo, 2007; Travasso da Rosa, 2017) | <i>Aedes serratus</i> ; <i>Culex quinquefasciatus</i> ; <i>Culicoides paraensis</i> | 1955 (Trinidad e Tobago) | 30 grandes surtos desde o primeiro isolamento do vírus na América tropical; surtos subsequentes na América Latina (≤100.000 casos); o vírus Oropuche é o segundo arbovírus mais comum no Brasil |

*Site da Organização Pan-Americana da Saúde.52 †Surto epizootico relatado em 1973 na América Latina. ‡Surto de doença exantemática relatado no final de 2014.§Site da OMS.53

Fonte: Musso, 2018.

A (re)emergência de arbovírus se deve principalmente ao trânsito internacional, urbanização e globalização, o que mantém a circulação de diversos arbovírus nas Américas (Tabela 1) (Musso, 2018). Adicionado a isso, há a falta de cobertura epidemiológica e diagnósticos precisos para certas doenças permitindo a disseminação viral e podendo vir a tornar-se um problema de saúde pública como aconteceu na epidemia de ZIKV em 2015-2017 (Oidtman, 2021).

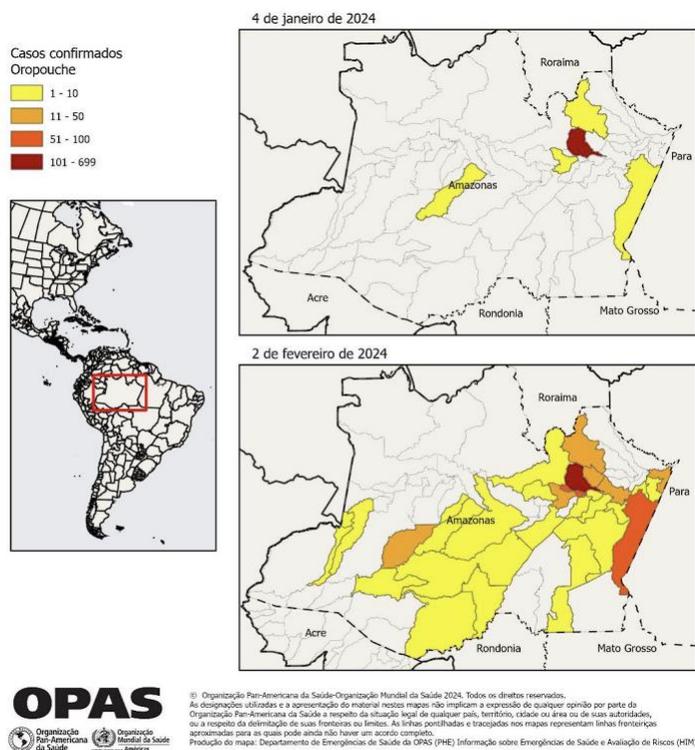
No Brasil, muitos arbovírus poderiam, em tese, causar grandes epidemias nas regiões mais densamente povoadas no país, como o Nordeste, Sul e Sudeste. Dentre esses arbovírus circulantes e menos conhecidos, destacam-se os vírus MAYV e OROV (Figueiredo, 2007). Ambos foram isolados em Trinidad e Tobago e rapidamente se espalharam devido à competência do seu vetor (Diagne, 2020; Gutierrez, 2020).

De 2023 a 2024, foram notificados mais de quatro milhões de casos de arboviroses nas Américas segundo a Organização Mundial da Saúde. Desse total, aproximadamente 4.566.584

eram casos de dengue (até semana epidemiológica SE5 de 2024), 213.561 eram casos de Chikungunya (até SE21 de 2023) e 8.756 eram casos de Zika (até SE21 de 2023) (PAHO, 2024).

Em janeiro de 2024, foi emitido um alerta epidemiológico sobre a detecção do vírus OROV no estado do Amazonas (AM) (Figura 1) (PAHO, 2024). Das 675 amostras testadas, 199 foram positivas com confirmação molecular por PCR para OROV correspondendo a 29.5% do total no período de dezembro de 2023 a janeiro de 2024. As amostras procediam do município de Manaus, Presidente Figueiredo, de Maués, de Tefé e Manacapuru. De fato, mais de mil casos de OROV foram detectados em humanos no estado do AM em 2024 (PAHO, 2024). Além disso, há casos notificados de OROV nos estados do Acre (AC) e Roraima (RR) e, recentemente, a detecção de um caso no Rio de Janeiro de um indivíduo com histórico de viagem para o AM (CNN, 2024) e de dois indivíduos de Curitiba (dois pacientes, um do AM e outro do AC) (Naveca, 2023).

Figura 1: Distribuição de casos de Oropouche no estado do Amazonas



Fonte: Relatório enviado pelo Ponto Focal Nacional (PFN) para o Regulamento Sanitário Internacional (RSI) do Brasil e Relatório da Fundação de Vigilância em Saúde do Amazonas (FVSRCP). PAHO, 2024.

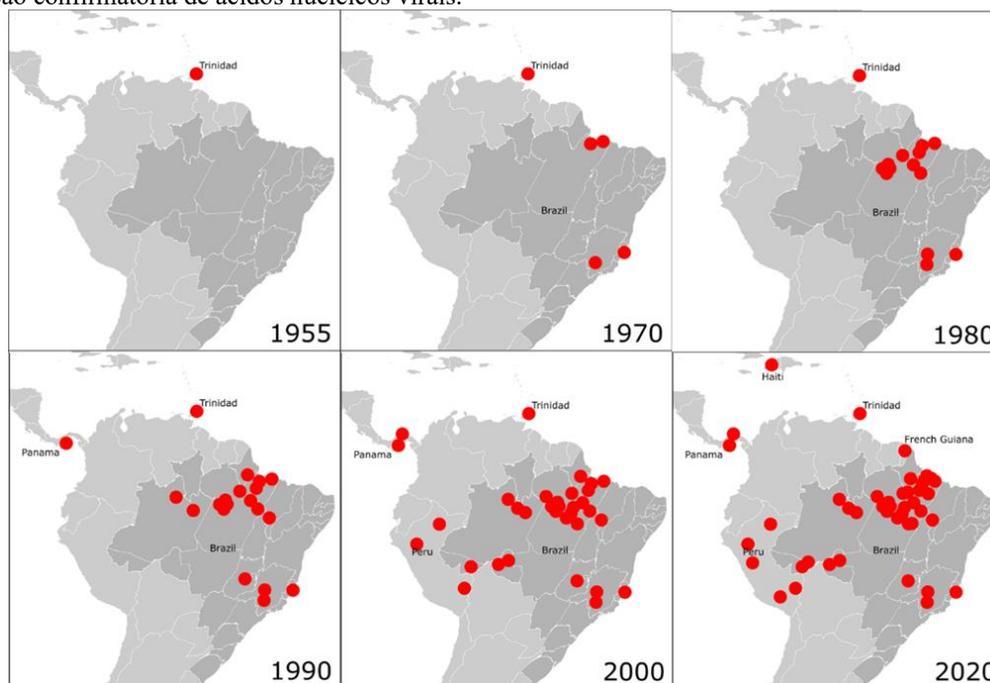
Entretanto, apesar do potencial emergente desses agentes, pouco se sabe sobre os mecanismos patogênicos associados ao desenvolvimento de doença por esse vírus.

Recentemente a Organização Mundial da Saúde (OMS ou *WHO*) anunciou uma iniciativa (*Global Arbovirus Initiative*) com o objetivo de monitorar doenças arbovirais em escala global de modo a antecipar e, se possível, prevenir epidemias e pandemias (Balakrishnan, 2022).

1.2 Vírus Oropouche (OROV)

Oropouche (OROV) é um arbovírus silvestre da família *Peribunyaviridae*, gênero *Orthobunyavirus*, sorogrupo Simbu que infecta preguiças, primatas não humanos, algumas espécies de aves e seres humanos na Região Amazônica (Anderson, 1961; Nunes, 2005). O sorogrupo Simbu inclui também os vírus Akabane, Manzanilla, Sathuperi, Shamonda, Shuni e Simbu (Anderson, 1961; Nunes, 2005; Ladner, 2014). Esse vírus foi documentado pela primeira vez em Vega do Oropouche em Trinidad e Tobago no ano de 1955 e cinco anos depois foi detectado pela primeira vez no Brasil (Anderson, 1961; Files, 2022). Desde a sua detecção, mais de trinta surtos e epidemias de OROV foram documentadas principalmente nas regiões Norte, Nordeste e Centro-Oeste do Brasil (Chavez, 1992; Watts, 1997; Cardoso, 2015; da Costa, 2017; Gutierrez, 2020). Dados epidemiológicos recentes demonstraram casos de OROV na Argentina, Bolívia, Colômbia, Panamá, Equador e Venezuela (Figura 2) (Forshey, 2020; Files, 2022).

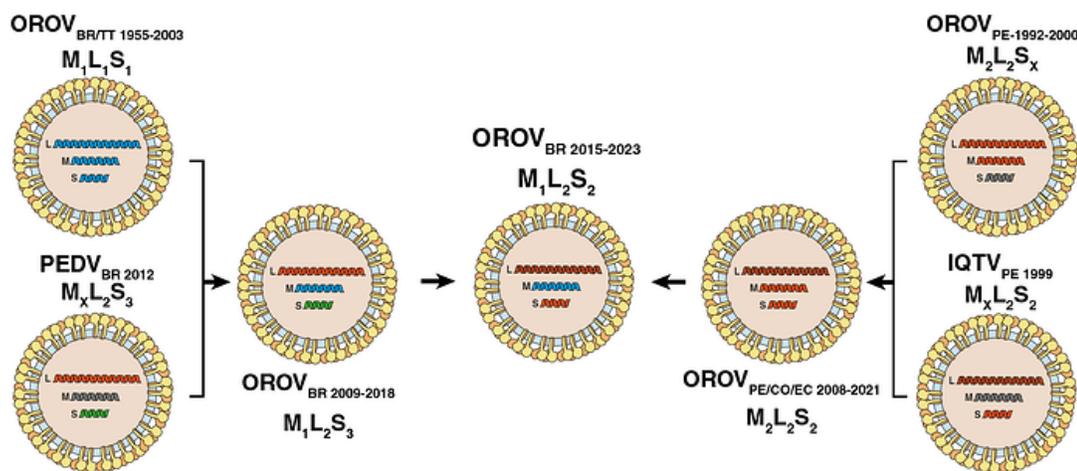
Figura 2: Cronologia dos surtos de febre Oropouche. Os pontos vermelhos indicam surtos com evidência serológica e/ou detecção confirmatória de ácidos nucleicos virais.



Fonte: Anderson, 1961; Travassos da Rosa, 2017; Gutierrez, 2020; Elbadry, 2021; Romero-Alvarez, 2018; WHO, 2021, Files, 2022.

Recentemente, ocorreu a detecção de mais de mil casos de OROV em quatro estados brasileiros, incluindo: Amazônia, Acre, Rondônia e Roraima. Naveca e colaboradores (2024) reportam a disseminação de uma nova linhagem produto de “*reassortment*” de OROV com outros bunyavírus. Dados coletados entre 2022 e 2024 mostraram que OROV foi o segundo arbovírus mais frequente na Amazônia. Curiosamente, apesar de não haver diferenças no gênero quanto á infecção, a nova linhagem parece afetar mais indivíduos do sexo masculino e a faixa etária entre 25 e 44 anos. Para determinação da nova linhagem, as amostras positivas para OROV foram sequenciadas e comparadas com as sequências dos segmentos S, M e L disponíveis de OROV circulante entre 1955 e 2021 e com as sequências dos protótipos dos vírus Iquitos, vírus Perdões e vírus Madre de Dios (considerados rearranjos do OROV). Filogeneticamente foram identificadas 2 linhagens para o segmento M e L (M1, M2, L1 e L2) e três para o segmento S (S1, S2 e S3). A hipótese é que o OROV circulante atualmente no Brasil é um rearranjo entre um OROV M1L2S2 que adquiriu um segmento M do OROV circulante anteriormente M1L2S3 (2009-2018) e os segmentos L+S de um vírus M2L2S2 que já circulava na Amazônia desde os anos 2000 (Figura 3) (Naveca, 2024). Assim, presume-se que essa nova linhagem circulante já estaria circulando há pelo menos um ano e causando surtos, mas sendo subnotificada e negligenciada em áreas onde ele não é comumente circulante.

Figura 3: Supostos eventos de rearranjo que geraram a atual diversidade genômica de OROV na América do Sul. Cada segmento genômico do OROV é colorido de acordo com a linhagem identificada neste estudo. Vírus Oropouche (OROV), vírus Iquito (IQTV), vírus Perdoes (PEDV).



Fonte: Naveca, 2023

OROV é um vírus envelopado, que possui um genoma composto por três segmentos de RNA de fita simples de polaridade negativa (denominados S, M e L) (Patterson, 1984; Schmaljohn,

2007; Proença-Modena, 2015a; Elliot, 2014; Files, 2022). O segmento S codifica a proteína do nucleocapsídeo N e a proteína não estrutural (NS) com capacidade de inibir a resposta de interferon do tipo I. Tilston-Lunel *et al.* (2015) mostrou que a deleção da proteína NS em OROV leva a uma produção de IFN com fosforilação de STAT1 e expressão de MxA em células A549. O mesmo grupo também mostrou que o OROV é menos sensível ao tratamento com IFN- α comparado ao *Orthobunyavirus bunyamweraense* (BUNV) em células Vero E6 (que não produzem IFN) (Tilston-Lunel, 2015; Files, 2022). Já o segmento M codifica uma poliproteína que originará as glicoproteínas Gn e Gc, além da proteína não estrutural NSm (Tilston-Lunel, 2015; Files, 2022). O segmento L codifica a proteína L, a RNA-polimerase RNA-dependente (Aquino, 2003; Ladner, 2014; Files, 2022).

O sequenciamento desses segmentos permitiu a identificação de quatro genótipos virais baseados no gene N, três (I, II e III) descritos até os anos 2000 e um (IV) identificado depois de 2010 no Brasil (Saeed, 2000; Vasconcelos, 2011). Sugere-se que o genótipo I surgiu no Brasil há aproximadamente 223 anos atrás e deu origem aos outros genótipos (Vasconcelos, 2011). Contudo, uma nova classificação baseada nos três segmentos de RNA sugeriria duas linhagens dentro das filogenias do segmento M nas quais a linhagem 1 compreenderia o primeiro caso de OROV em Trinidad e Tobago e as sequências circulantes no Brasil (origem estimada em 1887), enquanto a linhagem 2 compreenderia sequências do Panamá, Peru e Equador (origem estimada em 1905) (Gutierrez, 2020). As diferentes histórias evolutivas apresentadas possivelmente se devem a recorrentes rearranjos entre os vírus do gênero *Orthobunyavirus* resultantes de coinfeções em vetores ou hospedeiros vertebrados. Esses rearranjos ocorrem naturalmente devido ao reconhecimento cruzado entre componentes virais, por exemplo, dentro de membros do mesmo sorogrupo e podem resultar na seleção de vírus mais patogênicos ou com maior capacidade de disseminação (Tilston-Lunel, 2015). No Sudão foi identificado um surto de doença febril causado pelo vírus Ngari no qual ocorreu rearranjo entre o BUNV e o vírus Batai (Briese, 2006).

O rearranjo dentro do sorogrupo Simbu ocorre com a permanência dos segmentos S e L e a inserção do segmento M de outro vírus. No Peru, foi isolado de um paciente febril um novo vírus, o vírus Iquitos (IQTV), que possui no seu genoma os segmentos S e L com grande similaridade à OROV e um segmento M distinto. Similarmente, foram identificados mais dois vírus como possíveis produtos de rearranjos entre OROV, o vírus Madre de Dios (MDDV; Peru e Venezuela) e o vírus Perdões (Brasil); contendo um segmento M de um vírus ainda não identificado dentro do

sorogrupo Simbu (Aguilar, 2011; Tilston-Lunel, 2015; Navarro, 2016). Já o vírus Jatobal, também isolado no Brasil, foi caracterizado como contendo apenas a presença do segmento S do OROV (Saaed, 2001).

OROV é transmitido em ambiente silvestre pela picada de mosquitos *Aedes Serratus* e *Coquillettidia venezuelensis*. Em ambientes urbanos, sua transmissão é principalmente sustentada pela picada de *Culicoides paraenses*, uma mosca hematófaga popularmente conhecida como maruim (Smith, 1991; Adams, 2017). Existem mais de mil espécies de *Culicoides*, e muitos deles atuam como vetores na transmissão de diversos arbovírus de importância clínica e veterinária (Mellor, 2000; Purse, 2015). No Brasil, o *C. paraenses* é o principal vetor de transmissão do OROV, mas seu alcance geográfico inclui Argentina, Chile e parte dos Estados Unidos (Figura 4) (Wirth, 1989; Files, 2022). Além disso, a mosca *Culicoides sonorensis*, um vetor importante na América do Norte, é capaz de transmitir uma cepa protótipo de OROV aumentando a área de alcance do vírus (McGregor, 2021; Files, 2022).

Figura 4: Distribuição de *Culicoides paraenses* nas Américas. Cinza escuro indica os países e estados onde *C. paraenses* foi relatado.



Fonte: Pappas, 1991; Lamberson, 1992; Smith, 1996; Brickle, 1999; Aybar, 2011; Martin, 2019; Files 2022.

Experimentos realizados em laboratório sobre a competência de outros vetores em transmitir o vírus assim como dados epidemiológicos mostraram que os mosquitos *Aedes scapularis*, *Aedes albopictus*, *Culex fatigans*, *Culex quiquefaciatus*, *Mansonia venezuelensis* e *Psorophora ferox* suportam a infecção por OROV (Anderson, 1961; Roberts, 1977; Pinheiro, 1981; Smith, 1991; Pinheiro, 2004; Files, 2022).

OROV leva ao desenvolvimento de uma doença febril exantemática conhecida como febre do OROV que se caracteriza pela presença de sintomas como febre alta ($\sim 39^\circ\text{C}$), cefaleia, mialgia, artralgia, náusea, vômito, erupções cutâneas, fotofobia, dor retro orbital e poliúria (Pinheiro, 1994; Mouraao, 2009; Travassos da Rosa, 2017). Aproximadamente 60% dos pacientes podem apresentar recorrência dos sintomas agudos após uma semana do desaparecimento dos sintomas e uma pequena parte dos indivíduos infectados podem desenvolver complicações clínicas (Tilston-Lunel, 2015; Travassos da Rosa, 2017). De fato, OROV já foi detectado no líquido cefalorraquidiano de pacientes com meningite asséptica e meningoencefalite (Bastos, 2012). Episódios hemorrágicos, aumento de enzimas hepáticas e leucopenia são menos frequentes (Pinheiro, 1981; Pinheiro, 2014; Mouraao, 2009). O pico de viremia ocorre no segundo dia após o início dos sintomas e a fase aguda pode durar até sete dias. Quando há envolvimento do sistema nervoso com detecção de encefalite e meningite, a doença pode durar até 4 semanas (Pinheiro, 1981). Até agora não foram relatadas sequelas a longo prazo (Bastos, 2012; Pinheiro, 2014; Travassos da Rosa, 2017; Alvarez-Falconi, 2020).

A grande similaridade clínica observada entre a infecção por OROV e aquela causada por outros arbovírus, como Dengue, Zika e chikungunya, gera dificuldades diagnósticas e faz com que os casos de OROV sejam subnotificados, principalmente em regiões endêmicas. Levando isso em consideração estima-se que mais de meio milhão de pessoas já foram infectadas pelo OROV (Culquichicón, 2017) nas Américas.

1.3 Patogênese do OROV

Pouco se conhece sobre a patogênese do vírus Oropouche. Estudos experimentais utilizando modelos animais e pacientes positivos para OROV têm contribuído para uma melhor compreensão da resposta imunológica e patogênese do vírus. Santos e colaboradores (2008) demonstraram em um modelo de infecção em célula HeLa que a entrada desse vírus é mediada por endocitose dependente de clatrina, visto que o tratamento com clorpromazina foi capaz de inibir a replicação do OROV (Santos, 2008). Além disso, foi demonstrado que OROV é capaz de induzir apoptose in

vitro, num mecanismo dependente da liberação de citocromo C mitocondrial e ativação das caspases 3 e 9 (Acrani, 2010).

Camundongos imunocompetentes adultos são resistentes à infecção por OROV. Desse modo, os primeiros modelos animais descritos para OROV foram desenvolvidos após infecção intracerebral em camundongos adultos ou infecção subcutânea em camundongos lactentes ou hamsters adultos (Araújo, 1978 e 1979; Rodrigues, 2011). Em camundongos recém-nascidos, a inoculação via intracerebral leva ao desenvolvimento de encefalite focal (Araújo, 1978). A inoculação subcutânea de OROV em *golden* hamster leva ao desenvolvimento de uma doença grave, caracterizada pela presença de viremia e detecção viral no fígado e cérebro com confirmação histopatológica de meningoencefalite e hepatite (Rodrigues, 2011). Similarmente, camundongos recém-nascidos infectados com OROV pela via subcutânea desenvolvem encefalite, hiperplasia do baço e meningite branda (Santos, 2012). Por fim, foi demonstrado em camundongos neonatos que OROV é capaz de chegar ao sistema nervoso central (SNC) por transporte retrógrado, após invasão em terminações sensitivas (Santos, 2014).

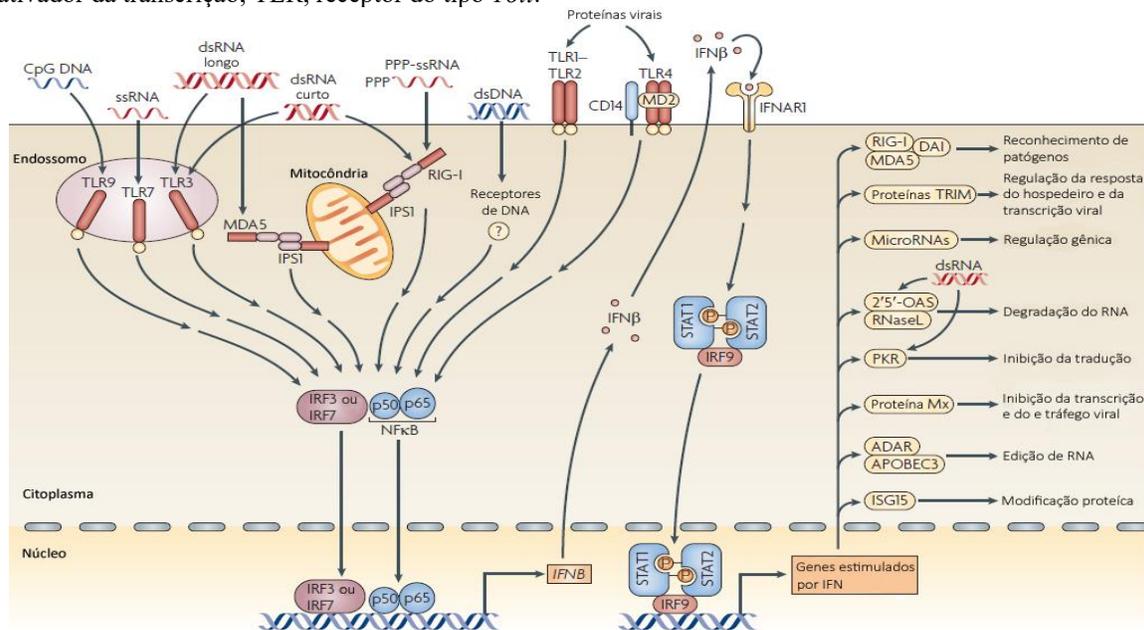
Assim, podemos concluir que OROV é um vírus hepatotrópico e neurotrópico em modelos animais, o que possivelmente reflete alguns aspectos da infecção em humanos, visto que aproximadamente 5% dos pacientes infectados podem desenvolver sintomas clínicos condizentes com acometimento do SNC.

1.4 Interferon do tipo I e III e o reconhecimento viral

A rápida produção de IFN do tipo I e III e a ativação das vias de sinalização desencadeadas por essas citocinas são eventos chaves para a proteção contra infecções por diferentes arbovírus. O reconhecimento viral se dá pela identificação de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), por receptores de reconhecimento padrão (PRRs) (Perry, 2005; Ivashkiv, 2014). A ligação dos PAMPs aos PRRs ativa a produção de diversas citocinas e quimiocinas, que controla a replicação viral no início da infecção e modula a resposta imune adaptativa (Perry, 2005). Após o reconhecimento pelos PRRs, são ativadas vias de sinalização que convergem para a transcrição de IFN do tipo I (Figura 5). Assim, no início da infecção, as células reconhecem os patógenos através dos PRRs e passam a produzir e liberar IFN- α/β . Uma vez secretado, o IFN- α/β liga-se ao seu receptor (Ifnar) em células vizinhas levando a uma diminuição da síntese proteica e o estabelecimento de um estado antiviral, que é crítico para o controle da infecção pela maioria dos vírus conhecidos (Randall, 2008). O estabelecimento desse estado antiviral pela produção de IFN

do tipo I leva a ativação de elementos responsivos estimulados por IFN (ISRE) e, conseqüentemente, a transcrição de genes estimulados por interferon (ISGs), que são componentes chaves da resposta imune inata e adaptativa (Perry, 2005; Randall, 2008, Wack, 2015).

Figura 5: Ativação da resposta de interferon através da detecção de padrões moleculares associados a patógenos. Todos os receptores de reconhecimento padrão (PRRs) inicial vias de sinalização que convergem na ativação dos fatores de transcrição fator regulatório de interferon 3 (IRF-3), IRF-8 e/ou fator nuclear- κ B (NF- κ B); isto leva a expressão de IFN- β . IFN- β então inicia um programa efetor antiviral na célula infectadas e em células vizinhas, que envolve a expressão de vários genes estimulados por interferon (ISGs). Alguns dos ISGs mostrados aqui, tais como RIG-1 (gene induzível por ácido retinóico I), MDA5 (gene associado à diferenciação de melanoma 5), DAI (ativador DNA-dependente de IRFs), alguns microRNAs e a família de proteínas TRIM (motivo tripartido), estão envolvidos na amplificação e regulação da resposta de IFN. Outros ISGs, mostrados aqui, tais como 2'5'-oligoadenilato sintetase (OAS) e ribonuclease L (RNaseL), proteína quinase dsRNA-dependente induzida por IFN (PKR), proteína de resistência ao myxovirus (Mx), adenosina deaminase RNA-específica (ADAR) e enzima de edição de mRNA apolipoproteína B (APOBEC), estão envolvidos nos mecanismos antivirais que interferem no ciclo de vida de vírus. OAS e PKR são ainda ativados por RNA dupla-fita (dsRNA). Ifnar1, receptor de interferon- α ; IPS1, estimulador do promotor de IFNB 1, também conhecido como MAVS; ISG15, proteína estimulada por interferon de 15 kDa; MD2, proteína de diferenciação mielóide 2; PPP, 5' trifosfato; ssRNA, RNA fita-simples; STAT, transdutor de sinal e ativador da transcrição; TLR, receptor do tipo *Toll*.



Fonte: Modificado de Bowie, 2008.

Além do IFN do tipo I, existem mais dois tipos de IFN em mamíferos: o IFN do tipo II (IFN- γ) e o IFN do tipo III (IFN- λ). O IFN do tipo III é produzido por um grande número de células e consegue induzir um forte estado antiviral. A indução de IFN do tipo III também ocorre após o reconhecimento do patógeno pelos PRRs, e como o IFN do tipo I, depende da ativação de fatores de transcrição tais como NF- κ B, IRF-3 e IRF-7 (Randall, 2008; Wack, 2015).

Em camundongos, a ação do IFN do tipo III está restrita às células presentes nos tecidos epiteliais de mucosas. Em humanos, além das mucosas, as células presentes no fígado também são

capazes de responder ao IFN do tipo III (Wack, 2015). A resposta dependente de IFN do tipo III em detrimento parcial da resposta por IFN do tipo I em ambientes persistentemente infectados, como observado na associação entre a mucosa intestinal e a microbiota, é indispensável para manutenção da homeostase desses tecidos, afinal IFN do tipo III não é tão tóxico ou tão pró-inflamatório como o IFN do tipo I [42]. Além disso, estudos demonstraram que IFN do tipo III é essencial para a manutenção da barreira hematoencefálica e hematoplacentária após infecção com alguns arbovírus, como WNV e ZIKV (Kourtis, 2014; Lazear, 2015).

1.5 O papel do interferon tipo I e das vias de reconhecimento inato e adaptativo na infecção por OROV

Estudos recentes demonstraram que a resposta imunológica contra OROV em modelo murino depende do reconhecimento desse vírus por RLR (receptores semelhantes a RIG-I), da sinalização via MAVS (proteína de sinalização antiviral mitocondrial) e da ativação dos fatores de transcrição IRF-3 e IRF-7 (fator regulador de interferon) (Proença-Modena, 2015a). De fato, a resposta ao IFN do tipo I é um fator central na resposta contra OROV, pois camundongos nocautes para *Ifnar1* (receptor de interferon do tipo I) são extremamente susceptíveis a infecção e morrem em decorrência de uma replicação viral exacerbada no fígado, que culmina num quadro de falência hepática e na produção de uma grande quantidade de citocinas inflamatórias (Proença-Modena, 2015a). Ainda, camundongos IFN- β nocaute possuem um fenótipo intermediário quando infectados com OROV pois apenas parte deles sucumbe à infecção sugerindo um papel protetor e fundamental do IFN- α (Proença-Modena, 2015a). Contudo, a deleção do receptor de IFN apenas em células não-mieloides expressando CD11c ou LysM não afeta a sobrevivência dos camundongos infectados (Proença-Modena, 2015a).

Por fim, foi demonstrado que IRF-5, regulador de interferon que é expresso constitutivamente em diversas células hematopoiéticas, essencial no controle da neuroinvasão por OROV. Camundongos nocautes para IRF-5 desenvolvem encefalite num fenômeno associado à persistência viral em células dendríticas (DCs) e linfócitos B e replicação viral intensa em neurônios (Proença-Modena, 2015b). Não existem dados na literatura sobre o papel do IFN do tipo III na infecção por OROV.

Camundongos selvagem (WT) adultos são capazes de produzir anticorpos específicos para OROV o que explica a resistência ao vírus e a necessidade da utilização de outros modelos para o

estudo do OROV. A resposta de células B e, mais especificamente, a sinalização por Myd88 nessas células é necessária para restringir a disseminação viral ao cérebro (Toledo-Teixeira, sob revisão). A transferência de soro de um camundongo WT previamente infectado com OROV para um camundongo nocaute para *Rag* (que não produz células T e B maduras) é suficiente para proteger o camundongo da infecção devido à presença de IgM-específico com capacidade neutralizante (Toledo-Teixeira, sob revisão). Ainda, a ausência de Myd88 nas células B tornou os camundongos susceptíveis a infecção por OROV (Toledo-Teixeira, sob revisão). Myd88 é uma molécula adaptadora presente na cascata de ativação pelos receptores do tipo Toll (TLRs) e IL-1 e pode levar a produção de citocinas incluindo IFN do tipo I (Deguine, 2014).

Em humanos, IFN- α surge como um biomarcador universal para a infecção por OROV. Pacientes febris com soroconversão inicial (IgM/IgG positivos no início dos sintomas) ou tardia (IgM/IgG negativos no início dos sintomas) exibiram altos níveis de IFN- α e baixos níveis de TNF- α e IL-10 por pelo menos 11 dias (de Oliveira, 2019). Ainda indivíduos com soroconversão inicial apresentaram elevados níveis de CXCL-8 e IL-5 enquanto indivíduos com soroconversão tardia apresentaram altos níveis de CXCL-10 e IL-17A (de Oliveira, 2019). IL-5 é uma citocina envolvida na ativação de células B e diferenciação de células produtoras de anticorpos enquanto CXCL-8 está envolvida no recrutamento de granulócitos (de Oliveira, 2019). CXCL-10 é uma citocina pró-inflamatória secretada por células imunes e envolvida no recrutamento de células ao local da infecção durante a resposta de IFN a infecções virais (Elemam, 2022). Além disso, CXCL-10 é crucial na defesa contra vírus devido sua resposta mediada por células T limitando a disseminação viral (Elemam, 2022). IL-17 é uma citocina inflamatória com papéis distintos durante infecções virais (Sahu, 2021). Essa citocina possui potencial patogênico podendo causar dano tecidual ou protetor pela ativação de células Th17 e recrutamento de células imunes (Sahu, 2021).

Sabe-se que OROV pode ser carregado para diferentes sítios por um mecanismo conhecido como cavalo de Tróia, já que ele pode infectar e permanecer com baixos títulos virais em células imunes (células T, monócitos, células dendríticas e células B) em um ambiente imunossuprimido. PBMCs (células mononucleares do sangue periférico) de indivíduos saudáveis infectadas com OROV não são capazes de suportar a replicação viral, na presença de IFN do tipo I e III sendo esta resposta revertida pela utilização de um bloqueador do receptor de IFN do tipo I ou glucocorticóide (Ribeiro Amorim, 2020).

1.6 Desenvolvimento placentário e resposta imunológica

A placenta é um órgão materno-fetal, cuja formação se inicia a partir da porção externa do blastocisto, chamada trofotodermo. As células trofoblásticas permitem a implantação na parede uterina (decídua) e desenvolvimento placentário e formam as vilosidades placentárias, com ramificações que propiciam maior área de troca com o sangue materno (Pijnenborg, 2006; Burton, 2015). Células maternas tais como células NK (*natural killer*) e macrófagos participam ativamente do remodelamento placentário. A placenta está em contato direto com o sangue materno e realiza as funções dos principais órgãos fetais permitindo a troca de nutrientes, oxigênio e resíduos (Pijnenborg, 2006; Burton, 2015).

Em humanos (Figura 6), a placentação definitiva ocorre na terceira semana de gestação e compreende uma camada única e contígua de sinciciotrofbastos (SIN) (Ander, 2019). No início da gestação a placenta é considerada hemodiorrônica com uma camada de SIN seguida de uma camada de células indiferenciadas, os citotrofbastos (CTB), que podem repor a camada de SIN ou originar trofbastos extravilosos (Ander, 2019). Os SIN são as principais células produtoras de hormônios na placenta (progesterona e gonadotrofina coriônica ou hCG) durante a gestação (Malassine, 2003; Ander, 2019). Os trofbastos extravilosos vão auxiliar na fixação da placenta à decídua e no remodelamento das artérias (Ander, 2019). Ainda, no início da gestação, são responsáveis por fornecer nutrientes necessários ao desenvolvimento do feto (Ander, 2019). Ao final da gestação a camada de trofbastos é reduzida a apenas uma camada de SIN tornando-se hemomonorrônica (Ander, 2019). Não há contato direto entre o sangue materno e a placenta até o fim do primeiro trimestre (Ander, 2019).

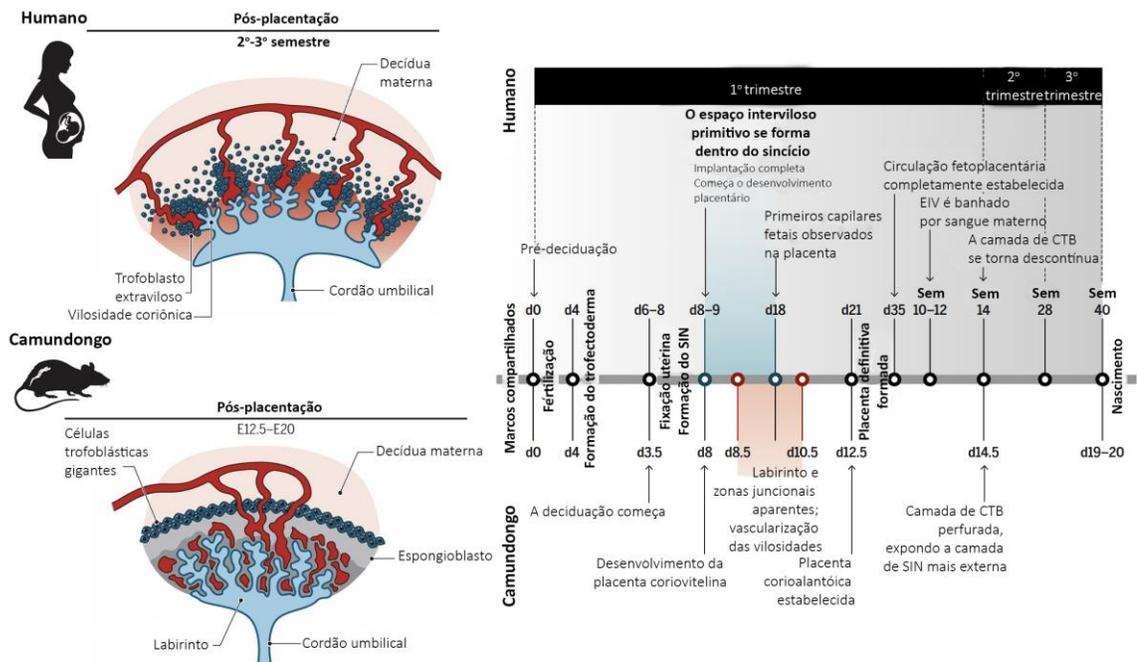
Em camundongos (Figura 6), a placenta não é definitiva até o dia gestacional 10.5 a 11.5. Diferente do que acontece em humanos, a placenta possui uma estrutura chamada labirinto na qual é perfundido por sangue materno (Ander, 2019). Células trofoblásticas gigantes ancoram a decídua à placenta e guiam o sangue materno pela camada de espongiotrofbastos em direção a placa coriônica (Adamson, 2002; Ander, 2019). O labirinto é composto por duas camadas de SIN e uma camada de CTB que fica em contato direto com o sangue materno (Ander, 2019). A circulação materna e fetal nunca fica em contato direto. Enquanto a zona do labirinto é responsável pela troca de gases e nutrientes, posicionado entre a zona do labirinto e a decídua encontra-se a zona juncional (Woods, 2018). A zona juncional contém espongiotrofbastos, células produtoras de glicogênio

e uma camada de células trofoblásticas gigantes sendo considerada a principal fonte de energia e compartimento endócrino da placenta (Woods, 2018).

Durante o desenvolvimento placentário, também há a participação de leucócitos maternos que auxiliam no estabelecimento da imunotolerância permitindo o crescimento fetal. A proporção dessas células difere de acordo com o estágio da gestação. Inicialmente, células NK decíduais são as mais predominantes (dNK ~70%), seguido de macrófagos decíduais (20-25%) e células T (3 - 10%), com perfil distinto das células circulantes fora da placenta, e vão auxiliar no remodelamento e invasão da decídua (Williams, 2009; Kwan, 2014). Durante a gestação, em camundongos, a ausência de células dNK está associada com malformações fetais devido a sua importância na formação da arquitetura placentária (Guimond, 1998; Hofman, 2014). Macrófagos decíduais são importantes na manutenção de um ambiente anti-inflamatório uma vez que são responsáveis pela fagocitose de células apoptóticas (Piacentini, 1994; Abumaree, 2012). Por fim, as células T com perfil regulatório (Treg) vão conferir tolerância aos antígenos fetais de forma a evitar o aborto (Rowe, 2012).

A parte do desenvolvimento, o papel fundamental da placenta no mecanismo de imunotolerância ao feto permite proteger o embrião da infecção por agentes infecciosos que alcancem a placenta por via hematogênica, incluindo do efeito danoso de uma inflamação local exacerbada (Yehm 2012; Cappelletti, 2017). Assim, podemos considerar que a placenta, particularmente a camada trofoblástica, funciona como uma barreira seletiva altamente complexa, que protege o feto durante o seu desenvolvimento.

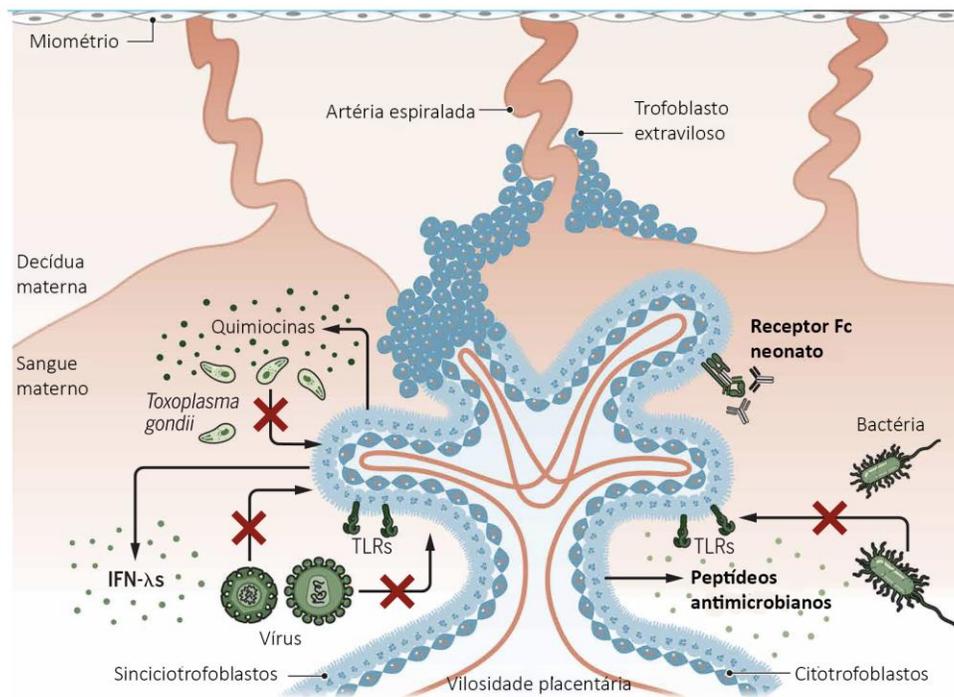
Figura 6: Linha do tempo da placentação humana e do camundongo. O blastocisto inicial humano se forma por volta do quarto dia e é marcado pelo desenvolvimento do trofotoderma – o primeiro evento de diferenciação no desenvolvimento dos mamíferos. O espaço intervilososo (EIV) primitivo se forma por volta dos dias 8 a 9 a partir da coalescência de vacúolos formados dentro da massa de sinciotrofoblastos (SIN) (criando lacunas). Entre as lacunas estão colunas de SIN (trabéculas), que são invadidas por citotrofoblastos (CTB) por volta do 12º dia para formar as vilosidades nascentes. Por volta do dia 15, o CTB invade a decídua (tarefa anteriormente realizada pelo SIN para implantação). No 21º dia, a placenta definitiva está formada. No entanto, o sangue materno não inunda o EIV até as semanas 10 a 12. Por outro lado, o período gestacional de camundongos dura apenas 20 dias. Outras diferenças entre humanos e camundongos incluem o desenvolvimento da placenta coriovitelina no dia 8. Essa placenta primitiva (não formada na gestação humana) é composta pela justaposição do saco vitelino contra os tecidos e vasos sanguíneos maternos. Nos dias 11 a 12.5, a placenta do saco vitelino é substituída pela placenta corioalantóica (definitiva), e por volta do dia 14.5, em camundongo, a camada de CTB que cobre as vilosidades fica perfurada e o sangue materno agora pode entrar em contato direto com a camada de SIN mais externa.



Fonte: Ander, 2019.

A resposta imunológica e a atividade antiviral na placenta (Figura 7) são dependentes da expressão de PRRs, da produção de IFN do tipo I e do tipo III em células do citotrofoblasto, sinciotrofoblasto e macrófagos placentários além da secreção de microRNAs com capacidade antiviral (Chatterjee, 2001; Gomez, 2008; Delorme-Axford, 2013; Kwon, 2014; Bayer, 2015; Racicot, 2017). Entretanto, alguns vírus conseguem estabelecer infecções de longo prazo na placenta, em parte por mecanismos dependentes do antagonismo das vias de IFN do tipo I (Racicot, 2017).

Figura 7: Mecanismos de defesa imunológica placentária. A placenta possui vários mecanismos inatos para proteger o feto de infecções congênitas de todos os tipos, incluindo a expressão de receptores de reconhecimento de padrões, como os receptores do tipo Toll (TLRs), a expressão constitutiva de IFNs tipo III (IFN- λ), e a liberação de peptídeos antimicrobianos. A inoculação de trofoblastos placentários com o parasita *T. gondii* induz a secreção de quimiocinas, incluindo o potente CCL22 que recruta células Th2 e Treg, sugerindo que a infecção com o parasita altera ou sinaliza para células imunes de origem materna. Além disso, a expressão do receptor Fc pelo SIN também sugere um papel protetor para a IgG materna dentro do compartimento fetal através do desenvolvimento de imunidade passiva.



Fonte: Ander, 2019.

Enquanto a inibição da produção de IFN do tipo I pode facilitar a replicação viral e levar a um aumento da carga viral de alguns vírus na placenta, a produção crônica de altos níveis de IFN do tipo I em tecido placentário pode induzir lesões nesse tecido e facilitar o acesso viral ao feto em desenvolvimento. De fato, um estudo recente mostrou que a resposta dependente de IFN do tipo I na placenta de camundongos fêmeas durante a infecção pelo vírus Zika possui efeito deletério que resulta numa placenta com uma arquitetura anormal da barreira materno-fetal. Assim, o IFN do tipo I parece ser um importante mediador de complicações durante a gravidez em gestantes infectadas com Zika (Racicot, 2017; Yockey, 2018). Em contrapartida, o IFN do tipo III, que é produzido por trofoblastos humanos, age de maneira autócrina e parácrina e possui papel essencial para manutenção da barreira placentária durante a infecção pelo ZIKV (Bayer, 2016).

Além disso, em humanos, anticorpos maternos podem ser transportados através dos receptores neonatais Fc na superfície dos SIN (Maltepe, 2015). A passagem transplacentária de IgG permite a proteção do feto a partir da semana 16 de gestação (Maltepe, 2015). Em camundongos, não há transporte eficiente de IgG materno, os anticorpos são obtidos através da expressão de receptores Fc presentes em células do saco vitelino (também chamado de placenta inicial; E5-E8.5) ou tardiamente na amamentação (Halliday, 1955; Kim, 2009).

2. Justificativa e hipótese de trabalho

O *Orthobunyavirus oropoucheense* está se espalhando pelas Américas com mais de meio milhão de casos estimados até agora. Além das manifestações febris, alguns arbovírus podem induzir malformações fetais quando mulheres são infectadas durante a gestação, como foi observado em 2015 no Brasil durante a epidemia de ZIKA e durante infecções por diversos bunyavírus e nairovírus, como *Orthonairovirus haemorrhagiae* (CCHFV) em humanos e *Orthobunyavirus schmallenbergense* (SBV) em ruminantes (Calvet, 2016; Charlier, 2017). A infecção por arbovírus na placenta pode resultar em efeitos teratogênicos no feto, altos níveis de vírus no neonato, baixo peso ao nascer e prematuridade (Gérardin, 2008; Hoffmann, 2011; Garigliany, 2012; Tarlinton, 2012; Paixão, 2016; Calvet, 2016).

Não há estudos publicados relatando complicações placentárias resultantes da infecção por OROV nem quais vias de reconhecimento imunológico seriam importantes para o controle da infecção placentária.

Ainda, dados epidemiológicos levantados durante as grandes epidemias desse vírus na região Amazônica apontam para a possibilidade de OROV causar problemas gestacionais, afinal houve um aumento da incidência de abortos (Mercer, 2003). Dados não publicados desenvolvidos por um aluno do Prof. Dr. Eurico Arruda da FMRP-USP mostram que OROV é teratogênico após infecção em ovo embrionado de galinhas e em camundongos C57BL/6. Além disso, o mesmo grupo relata que OROV pode infectar células dissociadas de placentas.

Assim nossa hipótese é que o OROV tem potencial de atravessar a barreira hematoplacentária desencadeando resposta imunológicas capazes de afetar o desenvolvimento placentário e fetal.

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

O objetivo desse estudo foi verificar o papel das vias de reconhecimento imunológico e da produção de interferons do tipo I e III para a quebra da barreira placentária pelo vírus Oropouche.

3.2. Objetivos gerais

- Caracterizar a cinética de replicação viral após infecção intravenosa (i.v) de OROV em camundongos fêmeas não grávidas com genótipo selvagem (C57/bl6), heterozigoto e homozigoto para o receptor de IFN-I (Ifnar1).
- Estabelecer um modelo de transmissão materno-fetal através da infecção intravenosa (iv.) de OROV em fêmeas grávidas utilizando os modelos murino com deficiência em Ifnar1 e o animal selvagem (C57/BL6).
- Determinar se o genótipo materno, paterno ou fetal assim como as diferentes proporções de homozigotos e heterozigotos presentes na prole resultante afetam a dispersão viral por OROV durante a gestação em cruzamentos com animais selvagens e com deficiência em Ifnar1.
- Caracterizar o papel do IFN-III no controle da replicação de OROV em camundongos deficientes em Il28r.
- Caracterizar o papel das vias imunológicas de reconhecimento viral no controle da replicação de OROV durante a gestação utilizando camundongos deficientes em Myd88 e MAVS.
- Determinar o efeito de IFN-I para a arquitetura placentária durante a infecção por OROV através da análise histológica da placenta de camundongos grávidas infectados.
- Determinar se a infecção afeta a produção de partículas infecciosas na placenta de camundongos infectados por OROV.
- Caracterizar o efeito in vitro de OROV sobre linhagens de células placentárias de humanos, caracterizando a cinética de replicação, a expressão de genes relacionados à resposta imune inata, a produção de citocinas após infecção com OROV. Determinar o papel do IFN-I na replicação de OROV na presença de anticorpo capaz de bloquear o receptor de IFN.

4. Metodologia

Células: Esse estudo foi realizado utilizando as seguintes linhagens celulares estabelecidas: Vero E6 (rim de macaco *Cercopithecus aethiops*; ATCC® No. CRL-1586), C6/36 (*Aedes albopictus* mosquito; ATCC® No. CRL-1660), BeWo (células de coriocarcinoma humano; ATCC® CCL-98) e JEG-3 (células de coriocarcinoma humano; ATCC® HTB-3). Essas células foram cultivadas em DMEM (Vero E6) RPMI (BeWo e JEG-3) ou Leibovitz (C636) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de Penicilina-estreptomicina (10000UI/mL penicilina e 200 mM de estreptomicina) seguindo instruções da ATCC em incubadora a 37°C com 5% de CO₂.

Os experimentos utilizando as células BeWo e JEG-3 foram realizados em placas de 24 poços utilizando 2x10⁵ células/mL. As células foram infectadas com OROV utilizando duas MOI (*multiplicity of infection*) de 0.1 e 1 por duas horas em meio DMEM sem SFB. Após, as células foram lavadas com PBS 1x e foi adicionado meio DMEM com SFB. As células foram incubadas por até 48 horas. Quando indicado, as células foram pré tratadas com um anticorpo anti-Ifnar 5 ng/mL (Abcam, ab10739) 30 min antes da infecção com OROV.

Vírus: Neste projeto foi utilizado o vírus Oropouche da linhagem BeAn 19991 que foi cedido pelo Prof. Dr. Luiz Tadeu Morais Figueiredo (FMRP-USP). O estoque viral de OROV foi obtido após três passagens sucessivas em células Vero e C636. Para a primeira passagem, o vírus foi adicionado à monocamada de células com confluência de 80% e em garrafa de cultura de 25 cm³ e coletado após o aparecimento de efeito citopático ou em aproximadamente 84 horas após a infecção. O conteúdo coletado foi centrifugado a 10.000 x g por 5 minutos para clarificação e distribuído em criotubos. Após, o estoque foi rapidamente congelado em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C. Para as passagens seguintes, a propagação viral foi feita em garrafas de cultura de 175 cm² com coleta após aparecimento de efeito citopático (24-30 horas pós infecção). Os estoques foram titulados por ensaio de foco infeccioso conforme descrito posteriormente.

Camundongos: O alojamento e o cuidado de animais de laboratório foram conduzidos de acordo com as diretrizes para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório. A criação de animais e os experimentos foram realizados de acordo com as diretrizes e após aprovação pelo Comitê Institucional de Cuidados e Uso de Animais da *Washington University* na Escola de Medicina de

St Louis (número 21-0246), do Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade de Campinas (Unicamp) (protocolo número 5302-1/2019) e da Universidade de São Paulo (USP) (protocolo número 6025140319). Camundongos C57BL/6, C57BL/6 *Ifnar*^{-/-}, C57BL/6 *Myd88*^{-/-} e C57BL/6 *Mavs*^{-/-} foram adquiridos do The Jackson Laboratory. Os camundongos SJL foram gentilmente doados pelo Dr. Jean Pierre Schatzmann Peron (Universidade de São Paulo). Todos os camundongos tiveram acesso *ad libitum* a alimentos e água e foram manipuladas em instalações de Nível de Biossegurança 2.

Genotipagem: Para genotipagem de camundongos adultos e fetos, aproximadamente 1 mm² da cauda do camundongo foi digerido em 75 µl de tampão de lise alcalina (NaOH 25 mM e EDTA 0,2 mM, pH 12) por 15 min a 95 °C e neutralizado com 75 µl de tampão de neutralização (Tris-HCl 40 mM pH 5). As amostras foram então clarificadas por centrifugação a 10.000 x g por 10 min e genotipadas e sexadas por PCR convencional (Tabela 2 e 3). O PCR foi realizado utilizando o kit Q5[®]-Hot Start High-Fidelity 2x Master Mix (New England BioLabs) com amplificação em termociclador seguindo as condições de tempo e temperatura informadas na Tabela 2. O produto obtido do PCR foi então submetido a eletroforese em gel de agarose 2% junto a um marcador com peso molecular conhecido. O gel foi visualizado no fotodocumentador iBright (Thermo Fisher Scientific).

Tabela 2: Ciclagem utilizada no PCR convencional

| Passo | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|-------|------|------|----------------|-------|-------|-------|------|-----|
| | 5:00 | 0:15 | 00:30 | 00:40 | 00:15 | 00:30 | 2:00 | ∞ |
| | 94°C | 94°C | 65°C* | 72°C | 94°C | 55°C | 72°C | 4°C |
| | | 10x | *declínio -1°C | | 30x | | | |

Tabela 3: Oligonucleotídeos utilizados para PCR convencional

| Alvo | Sequência | Tamanho (pb) |
|---------------|---|--------------------|
| <i>Ifnar1</i> | F:UM4 (Comum): 5'-AAGATGTGCTGTTCCCTTCCTCGCTCTCA-3' | WT: 150 KO: 180 |
| | R1:UM5 (WT): 3'-ATTATTAAGAAAAGACGAGGCGAAGTGG-5' | |
| | R2:Neo P3 (KO): 3'-ATTCGCAGGGCATCGCCTTCTATCGCC-5' | |
| <i>Sry</i> | F: 5'-CATGAACGCATTCATCGTGTGGTC-3' | 280 |
| | R: 3'-CTGCGGGAAGCAAAGTCAATTCT T-5' | |

Titulação viral: A quantidade de vírus viável foi determinada por ensaio de foco infeccioso (UFF). Para tanto, os sobrenadantes armazenados foram descongelados e clarificados por centrifugação a 5000 xg por 10 minutos. Foram preparadas diluições seriadas decimais para cada amostra em meio sem SFB e passados 100uL para monocamadas de células Vero E6 (4×10^4 células/mL) crescidas em placas de 96 poços, em duplicata. As placas foram incubadas por duas horas a 37° e 5% CO₂ para adsorção viral. Após a adsorção, foi adicionado meio semissólido contendo DMEM 2x, carboximetilcelulose 1,5% (CMC), SFB 4% e Penicilina/estreptomicina 2% de modo a obter uma concentração final de DMEM 1x, CMC 0.75%, SFB 4% e Penicilina/estreptomicina 1% no poço. As placas foram incubadas novamente por 48 horas a 37° e 5% CO₂. Para fixação das placas, foi adicionado 70uL de paraformaldeído (PFA) 1% e elas foram mantidas a 4°C até o momento da revelação.

Para revelação dos focos, o paraformaldeído foi removido e as placas foram lavadas com PBS. As placas foram permeabilizadas com uma solução contendo PBS, saponina 0.1% e albumina bovina sérica 0.1% (BSA) por 30 minutos a temperatura ambiente.

As placas foram lavadas com tampão de permeabilização 1x três vezes antes da adição de 50 µL de anticorpo primário policlonal anti-OROV (fluído ascítico, ATCC VR-1228AF) na proporção 1:1000. As placas foram então mantidas sob agitação intermitente por 2 horas, em temperatura ambiente. Em seguida foram novamente lavadas com tampão de permeabilização 1x, e foram acrescentados 50 µL do anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Sigma, A4416) na proporção 1:2000. A leitura foi realizada pela presença de foco azul após revelação com o substrato para peroxidase TrueBlue (KPL). Os resultados foram expressos como UFF por mL de sobrenadante ou grama de tecido.

Real time RT-PCRs: A carga viral foi medida na decídua, placenta, feto e outros tecidos maternos (soro, linfonodo inguinal, fígado, cérebro, baço, útero e ovários). Os tecidos foram pesados e após homogeneizados em tubos contendo esferas de zircônia e meio DMEM sem SFB usando um MagNA Lyser (Roche LifeScience). Os homogeneizados foram clarificados por centrifugação a 10.000 x g durante 10 min, e o RNA foi extraído usando o kit 5X MagMax Viral Isolation (Applied Biosystems) em um robô de extração Kingfisher Flex (Thermo Scientific) seguindo as instruções do kit. O RNA foi amplificado usando o kit TaqMan RNA-to-CT 1-Step (Thermo Fisher) e PrimeTime qPCR Assay (IDT) (mix de sonda e primer) específicos para o segmento S do OROV.

A amostra foi amplificada em um QuantStudio 6 Flex System (Applied Biosystem) da seguinte forma: 48°C por 15 min seguido de 2 min a 95°C; a seguir 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto. A quantidade de RNA foi expressa como equivalentes de RNA viral por grama (tecido) ou mL (soro) após interpolação em uma curva padrão de diluições seriadas do RNA de OROV obtido de um estoque com concentração conhecida.

As quantificações da expressão dos genes relacionados a resposta imune inata foram realizadas por qRT-PCR pela metodologia de Syber Green (BioRad iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix). As amostras extraídas foram quantificadas em NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific) e utilizadas para obtenção de cDNA com kit High Capacity cDNA Reversion Transcription (Applied Biosystems) segundo instruções do fabricante. Para a transcrição reversa, foi utilizado o termociclador SimpliAmp (Thermo Fisher Scientific). Após quantificação de cDNA, as amostras foram normalizadas de modo a obter 500 ng/uL de cDNA. Para a expressão genica, foram utilizados primers (Tabela 4) nas seguintes condições: 95°C por 3 minutos e 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento-extensão a 60°C por 1 minuto. Como controle endógeno, usamos a amplificação do gene GAPDH. A quantificação foi determinada de forma relativa em comparação com células não infectadas, depois da normalização com o controle endógeno escolhido.

Tabela 4: Sequencias dos primers utilizados para qPCR

| Camundongo | | | |
|-------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------------------|
| Alvo | Sequência (5'-3') | Sequência (3'-5') | Ref |
| Axl | ATCGGAGGAAGAAGGAGACTCG | CTCCATACCATGGCAATGTCTG | Caraux <i>et al.</i> , 2006 |
| Gapdh | GGCAAATTCAACGGCACAGT | AGATGGTGATGGGCTTCCC | Van Roeyen <i>et al.</i> , 2011 |
| Gas6 | AACTGGCTGAACGGGGAAG | CTTCCCAGGTGGTTTCCGT | Huang <i>et al.</i> , 2021 |
| Hif1 α | CAAGAAACCACCCATGAC | GGCTCATAACCCATCAAC | Chen <i>et al.</i> , 2019 |
| Ifit1 | GCCTATCGCCAAGATTTAGATGA | TTCTGGATTTAACCGGACAGC | Das <i>et al.</i> , 2016 |
| Ifn- λ R1 | GACGAGTACAGGCAGCTTCC | AGCATTGACCCTTAGGATCTTCTC | Galani <i>et al.</i> , 2017 |
| Ifn- α | CCTGAGAGAGAAGAAACACAGCC | TCTGCTCTGACCACYTCCCAG | Brzostek-Racine <i>et al.</i> , 2011 |
| Ifnar1 | ACTCAGGTTTCGCTCCATCAG | CTTTAAACCACTTCGCCTCG | Protocol 27369 - Ifnar1 |
| Ifn- β | ATGAGTGGTGGTTGCAGGC | TGACCTTCAAATGCAGTAGATTCA | Zhang <i>et al.</i> , 2015 |
| Ifn- γ | ACTGGCAAAAGGATGGTGAC | TGAGCTCATTGAATGCTTGG | Oikonomou <i>et al.</i> , 2016 |
| Ifngr1 | CCTGTCAGAGGTGTCCCTCG | GGGAGACCTTAGGACAGCTC | Wang <i>et al.</i> , 2007 |
| Ifn- λ 2 | TCCCAGTGAAGCAAAGGATTG | TCAAGCACCTCTTCTCGATGG | Okamoto <i>et al.</i> , 2014 |

| | | | |
|-------------------|--------------------------|---------------------------|-----------------------------------|
| Ifn- λ 3 | AGCTGCAGGTCCAAGAGCG | GGTGGTCAGGGCTGAGTCATT | Antony <i>et al.</i> , 2021. |
| IL10Rb | TCAGTGCAGCTTCTCTCATCT | TGCATCTCAGGAGGTCCAATG | Numasaki <i>et al.</i> , 2007 |
| Il1 β | CCCTGCAGCTGGAGAGTGTGGA | TGTGCTCTGCTTGTGAGGTGCTG | Sun; Zhao; Hu, 2013 |
| Irf3 | GGACTTGCACATCTCCAACA | TTGCTCCACGTAGGGACAAT | de Almeida <i>et al.</i> , 2011 |
| Irf5 | AATACCCACACCTTTTGA | TTGAGATCCGGGTTTGTAGAT | Takaoka <i>et al.</i> , 2005 |
| Irf7 | CACCCCATCTTCGACTTCA | CCAAAACCCAGGTAGATGGTGTGA | Khoroshi; Owens, 2010 |
| Ldh-a | TGTCTCCAGCAAAGACTACTGT | GACTGTACTTGACAATGTTGGGA | Song <i>et al.</i> , 2018 |
| Mavs | AGCCCTCCAGAGAGCATCAA | GAGGCAACATTTGCTGCGT | Oshiumi <i>et al.</i> , 2010 |
| Mertk | ACCTCCACACCTTCTGTGA | CGTGGAGAAGGTAGTCGTACATCT | Caraux <i>et al.</i> , 2006 |
| Nf-kB | GAAATTCCTGATCCAGACAAAAAC | CTACACAGAGGCCATTGAAGTGAT | Yamamoto <i>et al.</i> , 2009 |
| Oas1b | TTCTACGCCAATCTCATCAGTG | GGTCCCCAGCTTCTCCTTAC | Bordignon <i>et al.</i> , 2008 |
| Oasl | GGATGCCTGGGAGAGAATCG | TCGCCTGCTCTTCGAAACTG | Sommereyns <i>et al.</i> , 2008 |
| Pfkfb3 | CAACTCCCAACCGTGATTGT | TGAGGTAGCGAGTCAGCTTCT | Jiang <i>et al.</i> , 2016 |
| Pkm2 | GCTATTCGAGGAACCTCCGCC | AAGGTACAGGCACTACACGC | Walls <i>et al.</i> , 2020 |
| ProS1 | CGCCGTGCAAATACCTTGTT | AATGAGCCAACACGGAATGC | Zagórska <i>et al.</i> , 2014 |
| RigI | CAGACAGATCCGAGACACTA | TGCAAGACCTTTGGCCAGTT | Yount <i>et al.</i> , 2008 |
| RnaseL | CTGCAACCACAAAACATCTTAATA | AGATCTGGAAATGTCTTCTGAAAAT | Gupta; Rath, 2014 |
| Slc2a1 – Glut1 | GCTGTGCTTATGGGCTTCTC | CACATACATGGCACAAAGC | Montel-Hagen <i>et al.</i> , 2008 |
| Tim1 | TGGTTGCCTTCCGTGTCTCT | TCAGCTCGGGAATGCACAA | Umetsu <i>et al.</i> , 2005 |
| Tlr3 | TTAGAGTCCAACGGCTTAGAT | AACGGATTGAAGCGCATA | Takaoka <i>et al.</i> , 2005 |
| Tlr9 | ATGGACGGAACTGCTACTACA | GACCTTGAACCAGGAAGAGTT | Takaoka <i>et al.</i> , 2005 |
| Tyro-3 | CATTCCAGAGCAGCAGTTCAC | CCACACACACTGTCATGTCCT | Caraux <i>et al.</i> , 2006 |

Humano

| Alvo | Sequência (5'-3') | Sequência (3'-5') | Ref |
|--------------------|-------------------------|---------------------------|--------------------------------|
| Gapdh | CCCATGTTCTGTCATGGGTGT | TGGTCATGAGTCCTTCCACGATA | Micke <i>et al.</i> , 2006 |
| Ifit1 | AGAAGCAGGCAATCACAGAAAA | CTGAAACCGACCATAGTGGAAT | Santer <i>et al.</i> , 2017 |
| Ifit2 | GGTCTTTCAGCATTATTGGTG | TGCCGTAGGCTGCTCTCCA | Imaizumi <i>et al.</i> , 2014 |
| Ifitm2 | ATCCCGTAACCCGATCAC | CTTCTGTCCCTAGACTTCAC | Warren <i>et al.</i> , 2014 |
| Ifitm3 | ATGTCGTCTGGTCCCTGTTT | GTCATGAGGATGCCAGAAT | Anafu <i>et al.</i> , 2013 |
| Ifn- α | TCCATGAGVTGATBCAGCAGA | ATTCTGCTCTGACAACCTCCC | Harper <i>et al.</i> , 2015 |
| Ifn- β | GCTTGGATTCTACAAAAGAAGCA | ATAGATGGTCAATGCGGCGTC | Li <i>et al.</i> , 2016 |
| Ifn- λ 2/3 | CTGCCACATAGCCCAGTTCA | AGAAGCGACTCTTCTAAGGCATCTT | Khaitov <i>et al.</i> , 2009 |
| Irf1 | CGAATCGTCTCTGCAGCAGA | GCCCAGCTCCGGAACAAACA | Andersen <i>et al.</i> , 2007 |
| Irf3 | AGCAGAGGACCGGAGCAA | AGAGGTGTCTGGCTGGGAAA | Reimer; Schweizer; Jungi, 2007 |
| Irf7 | TGTGCCGAGTGCACCTAGAG | GAAGCACTCGATGTCGTCATAGAG | Reimer; Schweizer; Jungi, 2007 |
| Isg15 | TGGTGAGGAATAACAAGGGC | CAGATTCATGAACACGGTGC | Santer <i>et al.</i> , 2017 |
| Mavs | GTCACCTCCTGCTGAGA | TGCTCTGAATTCTCTCCT | Jacobs <i>et al.</i> , 2014 |
| Mda5 | CAAAGCTGAAGAACACAT | ATCTTCTCTGGTTGCATCT | Shao <i>et al.</i> , 2018 |
| Myd88 | GACGACGTGCTGCTGGAGCTG | GATGAAGGCATCGAAACGCTCAG | Isnardi <i>et al.</i> , 2008 |

| | | | |
|----------|---------------------------|-------------------------|-------------------------------------|
| NFkb/p65 | ATCCCATCTTTGACAATCGTGC | CTGGTCCCGTGAAATACACCTC | Yi <i>et al.</i> , 2014 |
| Oasl | CAAGCTCAAGAGCCTCATCC | TGGGCTGTGTTGAAATGTGT | Santer <i>et al.</i> , 2017 |
| Oasl | GGGACAGAGATGGCACTGAT | AAATGCTCCTGCCTCAGAAA | Santer <i>et al.</i> , 2017 |
| Rig-I | TGTGCTCCTACAGGTTGTGGA | CACTGGGATCTGATTGCAAAA | Schöbel; Rösch; Herker, 2018 |
| Tlr3 | TGGTTGGGCCACCTAGAAGTA | TCTCCATTCTGGCCTGTG | Perrot <i>et al.</i> , 2010 |
| Tlr3 | TGGTTGGGCCACCTAGAAGTA | TCTCCATTCTGGCCTGTG | Perrot <i>et al.</i> , 2010 |
| Tlr7 | CTCCCTGGATCTGTACACCTGTGAG | CTCCACAGAGCCTTTCCGGAGCT | Schaefer <i>et al.</i> , 2004 |
| Tlr7 | CTCCCTGGATCTGTACACCTGTGAG | CTCCACAGAGCCTTTCCGGAGCT | Schaefer <i>et al.</i> , 2004 |
| Tlr9 | TTATGGACTTCCTGCTGGAGGTGC | CTGCGTTTTGTGCAAGACCA | Kokkinopoulos; Jordan; Ritter, 2005 |
| Trif | GGCCCATCACTTCCTAGCG | GAGAGATCTGGCCTCAGTTT | Hong <i>et al.</i> , 2015 |

Inoculação viral e coleta dos tecidos: As gestações programadas foram estabelecidas e o dia embrionário E0.5 foi determinado após a detecção dos tampões vaginais. As fêmeas foram inoculadas com 10^5 UFF (C57BL/6, Myd88^{-/-}, Mavs^{-/-}, Ifnar1^{+/-} e SJL), 10^2 UFF (Ifnar1^{-/-}) ou com sobrenadante de cultura celular como controle por via intravenosa e por via retro-orbital sob anestesia com isoflurano no dia embrionário E6.5 ou E9.5 conforme indicado. Nos dias E16.5 (6dpi), E12.5 (3dpi), E14.5 (5dpi) ou E17.5 (8dpi), os animais foram eutanasiados com superdosagem de cetamina e xilazina (i.p.). Os tecidos maternos e fetos foram coletados em superfície resfriada e imediatamente armazenados em gelo seco. A decídua foi dissecada da placenta fetal conforme descrito anteriormente (Qu, 2014). A coleta de sangue foi realizada por punção cardíaca em tubo para coleta de sangue (BD), centrifugado a 2000 xg por 6 minutos a 4°C e o soro foi aliquoteado em um novo criotubo. Para determinação do tamanho fetal, imagens dos fetos obtidas na hora da coleta em superfície com medidas pré-determinadas foram analisadas utilizando o software ImageJ considerando o comprimento cabeça-nádega (*crown-rump length-CRL*) e a distância focinho-occipital (*snout-occipital distance-SOD*). Todas as amostras foram armazenadas em -80°C até o uso.

Histologia: Placentas individuais (incluindo a decídua) foram coletadas em E17.5 das fêmeas infectadas com OROV em E9.5 e as amostras foram fixadas em 4% de PFA à temperatura ambiente. As amostras foram reidratadas em etanol 70% e refrigeradas até o processamento para inclusão em parafina. O tecido foi cortado sagitalmente com um micrótomo em seções de 4 µm e montado pelo Núcleo de Histologia e Morfometria Musculoesquelética da *Washington University*. As seções foram hidratadas em PBS, seguidas de imersões em xilol e álcool (100%, 95%, 70% e

50%). A seguir, as secções foram coradas com hematoxilina (Vector, #H-3401), imergidas em solução de Hidróxido de Amônia 0.3%, e coradas com eosina (Sigma-Aldrich, #HT110132). Por fim, as secções foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol (70%, 80%, 95% e 100%) e xilol até a montagem seguindo procedimentos padrão. Secções completas da placenta foram digitalizadas com um Hamamatsu NanoZoomer (HT) com resolução de 20X. As medições das áreas placentárias foram realizadas usando o software QuPath (Bankhead et al., 2017) usando uma abordagem semi automática, na qual as regiões placentárias, incluindo o compartimento fetal (labirinto e zonas juncionais) e a decídua proximal, foram desenhadas e anotadas manualmente, e medido automaticamente pelo software.

Imunofluorescência: Os cortes obtidos das amostras parafinadas foram desparafinados e a recuperação antigênica foi realizada em solução de recuperação antigênica *Target Retrieval* (Dako #S1699). As amostras foram então bloqueadas por 30 min em tampão de bloqueio à temperatura ambiente (1% de BSA, 2% de soro de cabra e 0,1% de Triton em PBS) suplementado com anti-CD16/32 para bloquear a ligação do receptor Fc na diluição de 1/100 (Biolegend, #101302). Os anticorpos primários para Citoqueratina-7 (Ck7; Abcam, ab181598) e Vimentina (Vim; Abcam, ab992547) foram incubados durante a noite a 4 °C na diluição de 1:200 e, em sequência, incubados com anticorpo secundário *anti-rabbit* AF488 (A2106, Invitrogen) na diluição de 1:1.000 por 1h à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram coradas com Hoechst 33258 (Invitrogen, H3569) e montadas com ProLong Gold Antifade Mountant (Thermo Fisher Scientific, P36930). As secções da placenta foram digitalizadas em Hamamatsu NanoZoomer (HT) com resolução de 20X.

Ensaio de Spike: Os homogenatos das amostras controle ou infectada por OROV de placenta (pool de 5 amostras por genótipo) foram incubados com concentrações crescentes de OROV estoque (10^2 - 10^6 UFF) por 15 min a temperatura ambiente e, após, armazenados a -80°C. Posteriormente, foi feita a titulação por foco infeccioso das partículas viáveis de OROV como descrito anteriormente.

Análise de dados: Os dados foram plotados e analisados usando GraphPad Prism 8.4.3 (GraphPad Software). A expressão relativa do gene foi calculada usando o método $\Delta\Delta CT$. As imagens foram

analisadas utilizando o software ImageJ (tamanho do feto) e QuPath (regiões da placenta). O teste de hipóteses para cada experimento é descrito nas legendas usando valores de $p \leq 0,05$ para indicar diferenças estatisticamente significativas entre os grupos e representadas proporcionalmente por símbolos.

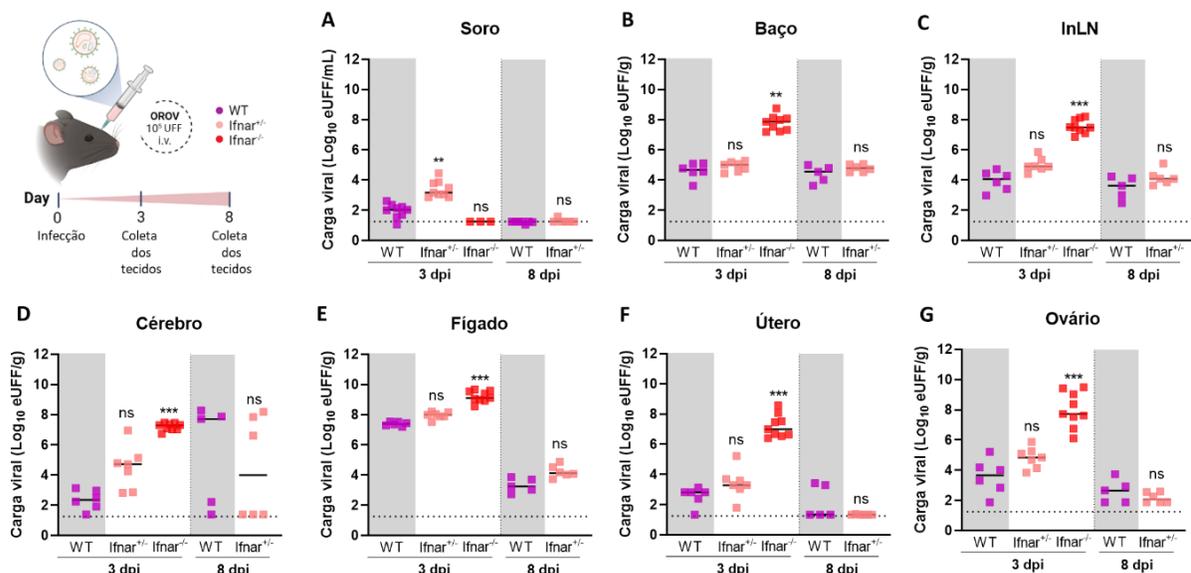
5. Resultados

5.1 Caracterização da cinética de replicação viral através da infecção intravenosa (i.v) de OROV em camundongos fêmeas não grávidas

Para melhor caracterizar a infecção por OROV em um modelo murino e sua capacidade de atingir tecidos reprodutivos, foram infectados camundongos fêmeas *Ifnar1*^{+/+} (selvagem; WT), *Ifnar1*^{+/-} e *Ifnar1*^{-/-} com 10⁵ unidades formadoras de foco (UFF) de OROV utilizando a via intravenosa (i.v) retro-orbital. Após 3 e 8 dias pós-infecção (dpi), coletamos soro, baço, linfonodo inguinal (InLN), cérebro, fígado, útero e ovário dos animais infectados. Não há dados relativos ao dia 8 pós-infecção para *Ifnar1*^{-/-} porque estes camundongos não sobreviveram após 3 dpi.

Embora tenhamos detectado RNA viral em todos os camundongos independentemente do genótipo, os camundongos *Ifnar1*^{-/-} exibiram as cargas virais significativamente mais altas no baço (p=0,0016), InLN (p=0,0001), cérebro (p=0,0002), fígado (p=0,0001), útero (p=0,0002) e ovário (p=0,0004) comparado ao animal WT em 3dpi. Nenhum efeito de haploinsuficiência foi detectado, já que os níveis de RNA viral foram semelhantes em camundongos WT e *Ifnar1*^{+/-} (Figura 8A-G).

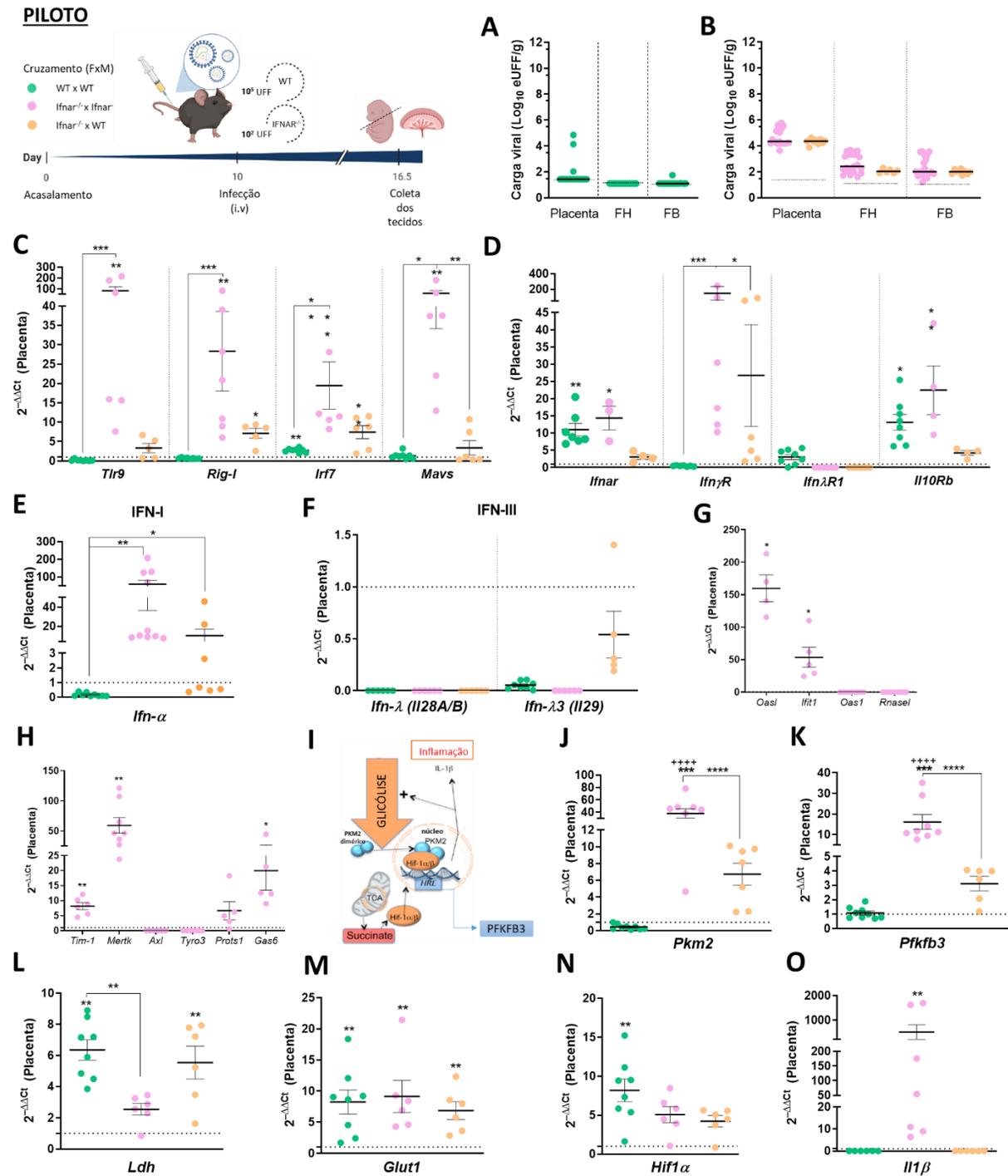
Figura 8: Infecção por OROV em camundongos não grávidos. As fêmeas de camundongos foram desafiadas i.v. com 10⁵ UFF de OROV seguido de coleta de tecidos no dia 3 (WT, *Ifnar1*^{+/-} e *Ifnar1*^{-/-}) e dia 8 pós-infecção (WT e *Ifnar1*^{+/-}). As cargas virais foram avaliadas por RT-qPCR (A-G). A análise estatística foi realizada utilizando Kruskal-Wallis seguido pelo Teste de Comparação Múltipla de Dunn comparando todos os grupos com o WT. Para comparações pareadas foi utilizado o teste de Mann-Whitney. **p<0,01, ***p<0,001. Linha tracejada corresponde ao limite de detecção.



5.2 Estabelecimento de um modelo de transmissão materno-fetal através da infecção intravenosa (i.v.) de OROV em fêmeas grávidas (modelo inicial E10-E16.5)

Inicialmente, com um intuito de estabelecer um modelo de infecção por OROV com transmissão materno-fetal, os camundongos foram infectados i.v. com OROV no dia E10 de gestação e eutanasiados no dia E16.5. As infecções diferiram em quantidade de vírus, enquanto os camundongos WT foram infectados com 10^5 UFF, os camundongos *Ifnar1*^{-/-} foram infectados com 10^2 UFF pois não sobreviveriam até o dia da coleta caso fosse utilizado um título maior (Proença-Modena, 2015a). Além disso, ocorreu a coleta apenas da placenta (+decídua) e feto.

Figura 9: Caracterização da infecção por OROV em animais com resposta parcial de IFN. As fêmeas de camundongos foram infectadas com 10^5 ou 10^2 UFF de OROV (WT e *Ifnar1*^{-/-}, respectivamente) i.v no dia E10 da gestação. Seis dias após a infecção, placenta e feto foram coletados. A carga viral da placenta, cabeça do feto e corpo do feto de camundongos foi determinada utilizando primers específicos para OROV. Os resultados foram expressos como Log_{10} equivalente FFU/g (A,B). A expressão gênica receptores e fatores de transcrição (TLR9, RIG-I, IRF7, MAVS na placenta de camundongos foi detectada por PCR quantitativo em tempo real utilizando primers e GAPDH como controle endógeno (C); a expressão gênica de IFN e receptores (*IFN α* , *IFN γ* , *IFN λ* , *Ifnar*, *IFN γ R*, *IFN λ 1R* e *IL10Rb*) (D-F); a expressão gênica de genes estimulados por interferon (*OASL*, *IFIT1*, *OAS1* e *RNaseL*) (G); a expressão gênica dos receptores TIM e TAM e seus ligantes (*TIM-1*, *Mertk*, *Axl*, *Tyro3*, *ProtS* e *Gas6*) (H); a expressão de genes glicolíticos relacionados à hipóxia (*PKM2*, *PFKFB3*, *Glut1*, *HIF1 α* e *IL1 β*) (J-O). Os dados foram analisados usando o método comparativo de CT ($\Delta\Delta\text{CT}$). Os dados estão expressos como o número de vezes sobre o respectivo controle e normalizados usando o gene GAPDH. Esquema representando o envolvimento de PKM2 (piruvato quinase M2) e PFKFB3 (6-fosfofructo-2-quinase / frutose-2,6-bifosfatase 3) com o gene HIF1 α (fator induzível por hipóxia) (I). Os dados são representativos de pelo menos 2 ninhadas independentes. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, Kruskal-Wallis com o teste de comparação múltipla de Dunn. Linha tracejada corresponde ao limite de detecção.



A linhagem mais acometida pela infecção é a dos camundongos *Ifnar1*^{-/-}, apresentando carga viral alta na placenta ($p < 0,0001$) e no feto ($p < 0,0001$) comparado ao animal WT (Figura 9A). Conseguimos obter uma carga viral igualmente alta quando usamos um modelo no qual as fêmeas *Ifnar1*^{-/-} são cruzadas com machos do tipo selvagem (WT), criando fetos *Ifnar1*^{+/-} (HET). Como

visto no modelo de infecção com camundongos *Ifnar1^{-/-}*, uma deficiência na sinalização de IFN do tipo I na mãe é necessária para permitir que o vírus cruze a barreira hematoplacentária e chegue ao feto. Uma resposta parcial de IFN do tipo I no feto e placenta, não é suficiente para reduzir a viremia fetal.

Para entender melhor o impacto de uma menor expressão de IFN do tipo I e III para o controle da infecção placentária e fetal por OROV, avaliamos a carga viral na placenta, cabeça e corpo dos fetos após infecção com 10^5 UFF de OROV i.v. durante a gestação (E10-E16.5) em camundongos SJL. Esses animais possuem uma sinalização intacta de IFN, mas com níveis basais menores de IFNs do tipo I e III, sendo usados como modelo para avaliar o impacto de outros arbovírus na gestação (Bayer, 2016; Cugola, 2016). Curiosamente, não fomos capazes de detectar OROV nem na placenta nem nos fetos dos animais sobreviventes (dado não apresentado).

Assim, para melhor compreender a resposta imunológica desencadeada pela infecção na placenta fetos de animais WT, HET e KO, analisamos a expressão gênica de IFNs do tipo I e III na placenta de camundongos provenientes dos cruzamentos com WT, *Ifnar1^{-/-}* e *Ifnar1^{+/-}* (Figura 9D-G). A expressão de IFN- α está elevada na placenta de camundongos proveniente do cruzamento *Ifnar1^{-/-}* x *Ifnar1^{-/-}* ($p < 0,0001$) quando comparada aos outros modelos de infecção utilizados. Não foram encontradas diferenças na expressão gênica de outros IFNs. Ainda, foram analisados a expressão dos receptores específicos de IFN (Tipo I: *Ifnar*; Tipo II: *IFN γ R*; Tipo III: *IFN λ R1/IL10Rb*). Curiosamente, houve um aumento na expressão do receptor de IFN do tipo I em placentas do cruzamento entre camundongos *Ifnar1^{-/-}* x *Ifnar1^{-/-}* sugerindo que a resposta à infecção se mostra em parte dependente desse receptor, contudo a intervenção utilizada para criar o modelo nocaute faz com que esses camundongos produzam uma proteína truncada e não-funcional o que justifica a detecção do gene nesse modelo. Além do receptor de IFN- α , houve um aumento significativo na expressão do receptor de IFN- γ e na subunidade IL10Rb do receptor de IFN- λ (Figura 9D).

Como tivemos uma grande produção de IFN- α na ausência de seu receptor além da ativação de fatores de transcrição e ISGs (OASL e IFIT1) envolvidos na sinalização de IFN (Figura 9C,G), estudos mais detalhados precisam ser realizados para explicar se essa produção de IFN não é devido a algum mecanismo compensatório materno que ativaria vias convergentes à esses fatores e genes estimulados por IFN.

Para examinar possíveis anormalidades na placenta que acarretariam danos ao feto, tais como recrutamento de células imunes, perda da arquitetura placentária, diminuição da proliferação e morte celular, nós analisamos genes glicolíticos que estão presentes na hipóxia (Figura 9I-O).

Vimos anteriormente uma elevada transcrição de IFN- α no tecido placentário de camundongos *Ifnar1*^{-/-} sendo um dos fatores que pode contribuir para o dano tecidual e consequente diminuição no tamanho do feto. Concomitantemente encontramos níveis elevados de ambas as enzimas PKM2 e PFKFB3, importantes durante a hipóxia, na placenta dos camundongos *Ifnar1*^{-/-} (Figura 9J,K). Para melhor entender a resposta de hipóxia no camundongo *Ifnar1*^{-/-}, analisamos a expressão de Glut1, HIF1 α e uma das citocinas produzidas em resposta a hipóxia e inflamação, a IL1- β . Estes genes estão superexpressos na placenta, principalmente IL1- β , sugerindo que a infecção por OROV é precedida por hipóxia (Figura 9L-O). Não houve diferença significativa na expressão dos genes glicolíticos nas placentas dos outros grupos. Esses achados revelam que a produção e sinalização mediada por IL1- β pode ser um determinante para o dano placentário induzido por OROV.

Por fim, analisamos os receptores TIM (TIM-1) e TAM (Tyro3/Axl/Mer e seus ligantes Gas6 e Proteína S) que participam na remoção de células apoptóticas e fagocitose dependente de fosfatidilserina (Figura 9H). Houve um aumento na expressão do receptor TIM-1 e Merk na placenta de camundongos *Ifnar1*^{-/-} assim como dos ligantes Gas6 e ProtS indicando que esses receptores podem estar interagindo com proteínas do envelope viral do OROV (Figura 9H).

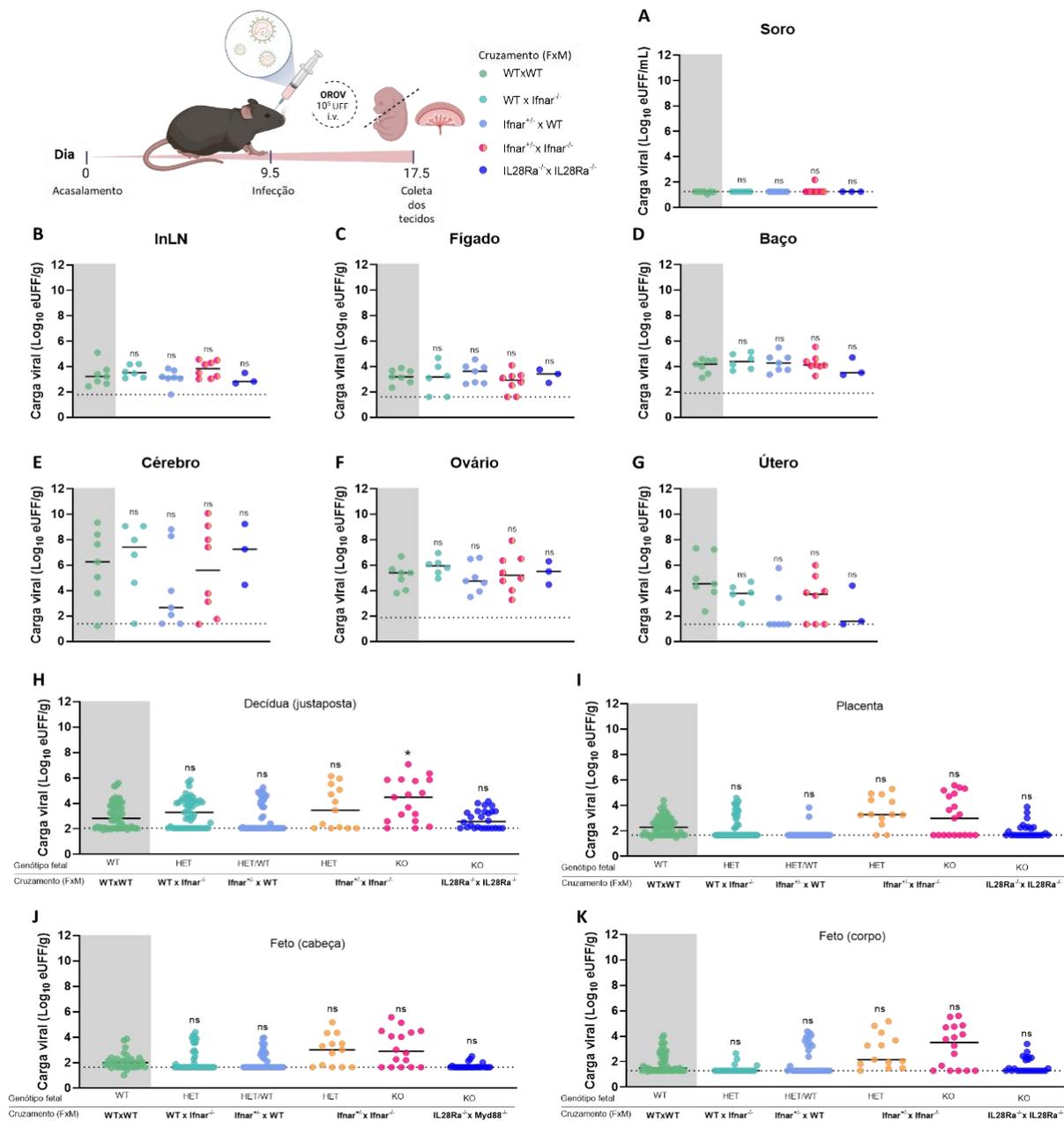
5.3 Estabelecimento de um modelo de transmissão materno-fetal através da infecção intravenosa (iv.) de OROV em fêmeas grávidas (modelo inicial E9.5-E17.5)

Após caracterizar brevemente o perfil imunológico apresentado durante a infecção por OROV em fêmeas durante a gestação e verificar a importância da resposta de IFN- α na proteção contra o vírus, algumas modificações foram realizadas quanto ao tempo gestacional utilizado para infecção e coleta sem alterar a via de administração (i.v.). Agora, os camundongos foram infectados no E9.5 (período em que a placentação também está completa) e o tempo até a coleta foi de 8 dias (próximo ao nascimento).

Como as imunodeficiências maternas podem confundir a análise da infecção na interface materno-fetal, estabelecemos um modelo de infecção por OROV em mães imunocompetentes (Figura 10). A fim de avaliar como o background genético afetaria as cargas virais, verificamos primeiro se havia haploinsuficiência materna ou fetal cruzando fêmeas *Ifnar1*^{+/-} ou WT com

machos *Ifnar1*^{-/-} ou WT. Esses cruzamentos produziram diferentes misturas de genótipos fetais, enquanto a decídua teria o mesmo genótipo da mãe. O objetivo foi avaliar se as imunodeficiências no compartimento fetal da placenta poderiam ter efeito na infecção placentária e fetal. Não encontramos diferenças nas cargas virais das mães (Figura 10A-G), embora nos cruzamentos *Ifnar1*^{+/-} x *Ifnar1*^{-/-} tenha havido um aumento da carga viral na decídua ($p=0,0231$) e uma tendência ao aumento das cargas virais no feto (FH $p=0,2321$ FB $p=0,0836$), quando comparado ao cruzamento WT x WT no momento D8 (Figura 10H-K). Como visto no modelo de infecção com camundongos *Ifnar1*^{-/-}, uma deficiência na sinalização de IFN do tipo I na mãe é necessária para permitir que o vírus atravesse a barreira hematoplacentária e chegue ao feto. Assim, a deleção parcial do *Ifnar1* no compartimento fetal da placenta não foi suficiente para afetar significativamente a suscetibilidade placentária ou fetal à infecção por OROV. Para avaliar o efeito do IFN do tipo III na restrição contra a quebra da barreira hematoplacentária contra OROV, avaliamos a replicação de OROV durante a infecção de camundongos nocautes para o receptor de IFN do tipo III porém a deleção do receptor não afetou a carga viral encontrada na mãe e no feto.

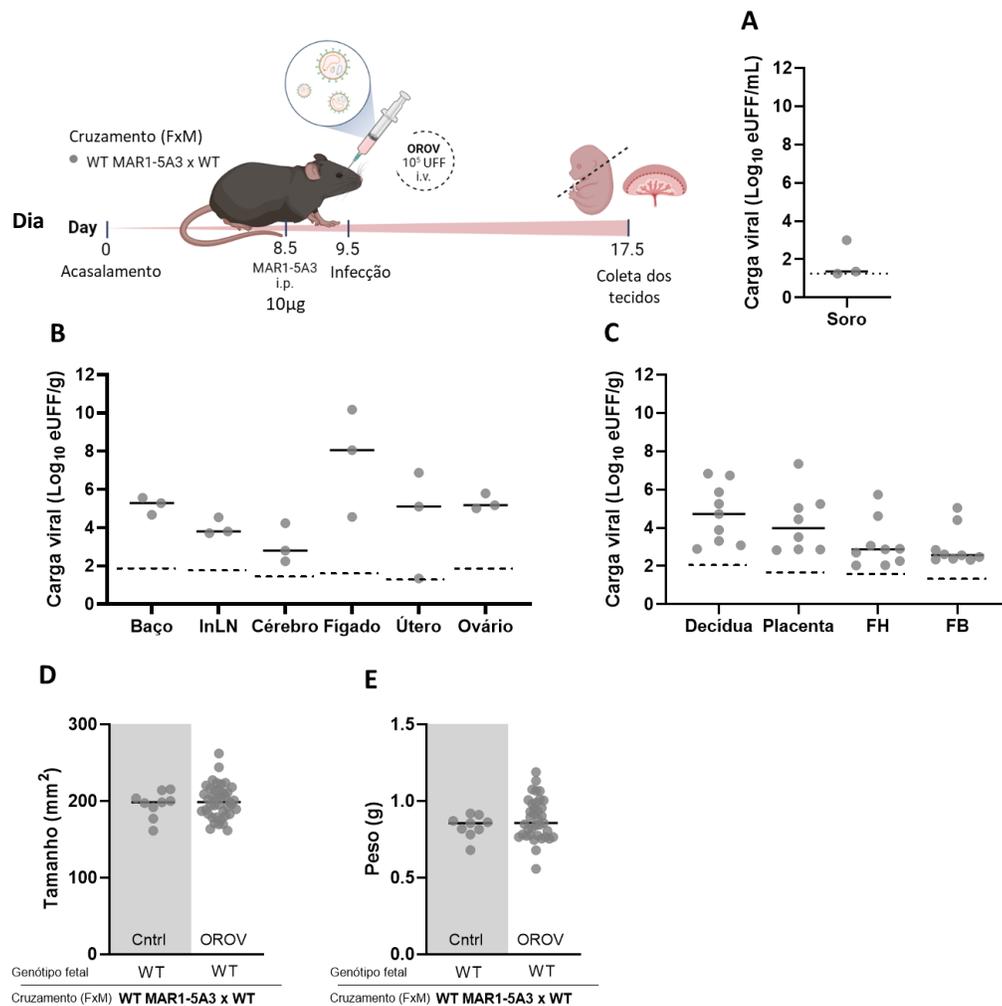
Figura 10: Diferentes backgrounds genéticos em camundongos prenhes infectados com OROV. As fêmeas de camundongos foram infectadas com 10^5 UFF de OROV i.v no dia E9.5 da gestação e tecidos maternos e fetais foram coletados 8 dias após a infecção. As cargas virais nos tecidos maternos (A-H), placenta (I) e cabeça (J) e corpo do feto (K) foram avaliadas por RT-qPCR. A análise estatística foi realizada utilizando Kruskal-Wallis seguido pelo Teste de Comparação Múltipla de Dunn comparando todos os grupos com camundongos WT. Linha tracejada corresponde ao limite de detecção.



Como resultados anteriores com cruzamentos *Ifnar*^{-/-} x *Ifnar*^{-/-} resultaram em altas cargas virais na mãe, fetos e placentas, testamos se a administração de um anticorpo anti-*Ifnar* aumentaria as cargas virais em camundongos WT (Figura 11). Começamos com camundongos não grávidos administrando 2.000 µg de MAR1-5A3 por via intraperitoneal (i.p.) e diminuindo até 10 µg. Os camundongos que receberam 2.000-30 µg morreram 3 dias após a infecção, enquanto os que receberam 10 µg sobreviveram por 8 dias (dados não mostrados). Assim, utilizando as mesmas

condições dos outros cruzamentos (infecção em E9.5 e coleta em E17.5), administramos 10 µg de MAR1-5A3 a camundongos prenhes um dia antes da infecção. Foi possível encontrar RNA viral nos tecidos da mãe, placenta e fetos (Figura 11A-C).

Figura 11: Infecção por OROV em camundongos prenhes que receberam anti-Ifnar em comparação com WT. As fêmeas de camundongos receberam i.p 10 µg de MAR1-5A3, um inibidor do receptor de IFN do tipo I, e no dia seguinte infectadas com 10^5 UFF de OROV i.v no E9.5 de gravidez. 8 dias após a infecção os camundongos foram sacrificados e os tecidos foram coletados para medição de carga viral (A-C) e medições fetais (D,E). O tamanho foi obtido pelo comprimento cabeça-nádega (CRL) e distância focinho-occipital (SOD). O peso do feto foi obtido pelos valores individuais da cabeça fetal e do corpo fetal. Para comparações pareadas foi utilizado o teste de Mann-Whitney. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. Linha tracejada corresponde ao limite de detecção.

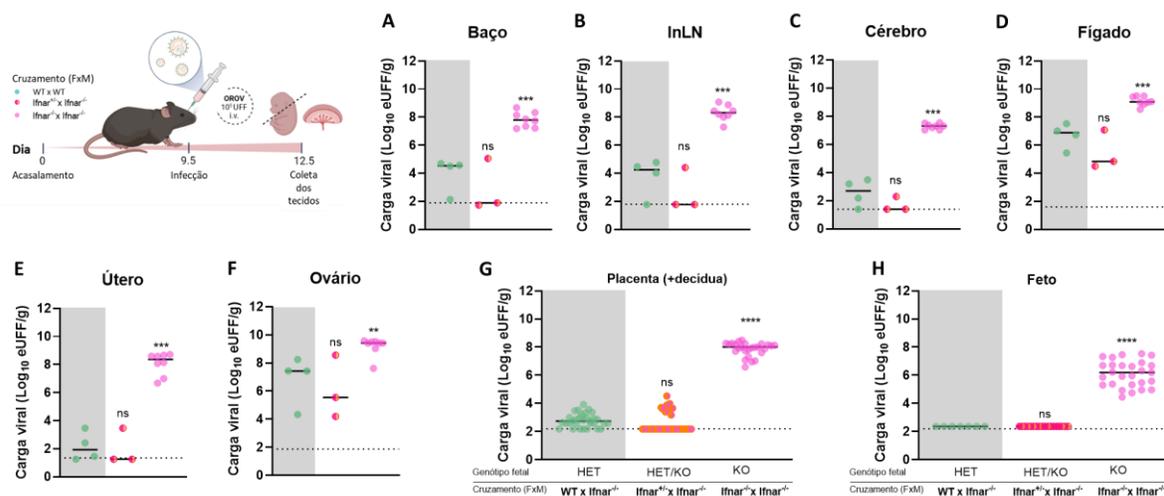


Nos tecidos maternos, durante o uso de MAR1-5A3, observamos um aumento nas cargas virais apenas no fígado em comparação com o cruzamento WT x WT ($p=0.0357$) (Figura 11B). No entanto, houve um aumento significativo na suscetibilidade da placenta ($p=0.0002$), decídua ($p=0.0093$) e tecidos fetais (FH $p=0.0004$ e FB $p=0.0371$) ao OROV comparado ao cruzamento

WT x WT (Figura 11C). Embora o vírus tenha conseguido chegar ao feto, não observamos diferenças de tamanho e peso em comparação com os animais controle (Figura 11D,E). Esses resultados destacam a importância da resposta do IFN Tipo I durante a gravidez, embora não possam recapitular totalmente os resultados obtidos com camundongos *Ifnar1*^{-/-} x *Ifnar1*^{-/-}.

Para determinar se os resultados obtidos foram devido à resolução da infecção em momentos anteriores ao analisado anteriormente, executamos uma análise temporal para determinar a dinâmica de infecção neste modelo. Os tecidos foram coletados no dia 3 e 5 (dados não apresentados) pós-infecção e as cargas virais foram avaliadas por RT-qPCR (Figura 12). As cargas virais dos tecidos maternos e da placenta foram significativamente diferentes comparando amostras dos cruzamentos *Ifnar1*^{+/-} x *Ifnar1*^{-/-} (fetos HET e KO), *Ifnar1*^{-/-} x *Ifnar1*^{-/-} (fetos KO) ou WT x WT (fetos WT) em D3 (Figura 12A-H). Assim, a deleção parcial do *Ifnar1* no compartimento fetal da placenta foi suficiente para afetar significativamente a suscetibilidade placentária à infecção por OROV no D3 e sendo infecção mantida com baixas concentrações virais ou até eliminada até o D8. Contudo a completa deleção permite a placenta albergar títulos virais significativamente maiores e que coincidem com a morte da mãe.

Figura 12: Coleta de tecido de camundongos prenhes infectados com OROV 3 dias após a placentação. As fêmeas de camundongos foram infectadas com 10⁵ UFF de OROV i.v no dia E9.5 da gestação. 3 dias após a infecção, as cargas virais foram avaliadas por RT-qPCR nos tecidos da mãe (A-F), placenta (G) e feto (H). Imagens do feto e placenta (I). A análise estatística foi realizada utilizando Kruskal-Wallis seguido pelo Teste de Comparações Múltiplas de Dunn. Para comparações pareadas foi utilizado o teste de Mann-Whitney. **p<0,01; ****p<0,0001. Linha tracejada corresponde ao limite de detecção.



Embora não tenhamos encontrado diferenças nas cargas virais no D8, inferimos que a infecção por OROV pode afetar os resultados fetais em outros hospedeiros, já que a sinalização de IFN tipo I afeta a viabilidade fetal em um modelo de infecção por outros vírus, como ZIKV (Gérardin, 2008). Durante a gestação, há mudanças no sistema imune materno que levam a uma distinta resposta a infecções. Bordt e colaboradores (2021) mostraram que fetos humanos do sexo masculino apresentam maior abundância de receptores Fc, expressão de ISGs e transferência de anticorpos vírus-específicos. Contudo diferenças sexo-específicas não são comumente abordadas nos estudos (Bordt, 2021; Flemming, 2021). Assim, diferenças fetais podem proporcionar diferentes graus de imunidade para os fetos e podem assim influenciar indiretamente na resposta imunológica materna.

Não houve diferenças nas proporções de sexo e genótipo dos fetos para cada cruzamento entre animais controle ou infectados, juntamente como não houve diferenças na taxa de reabsorção no D8 (Tabela 5 e 6).

Tabela 5: Genótipo fetal e proporções sexuais de cada cruzamento.

| F x M | Controle- sexo | | OROV- sexo | | P | Controle-genótipo | | | OROV-genótipo | | | P |
|---|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|----|----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|----|
| | F %±DP | M %±DP | F %±DP | M %±DP | | WT %±DP | HET %±DP | KO %±DP | WT %±DP | HET %±DP | KO %±DP | |
| WT x WT | 38.46±1.50 (5/13) | 61.54±1.00 (8/13) | 51.16±1.49 (22/43) | 48.84±1.46 (21/43) | ns | 100±0.00 (13/13) | - | - | 100±0.00 (43/43) | - | - | ns |
| WT x Ifnar ^{-/-} | 26.67±0.00 (4/15) | 73.33±1.50 (11/15) | 50.00±1.60 (26/52) | 50.00±1.70 (26/52) | ns | - | 100±0.00 (15/15) | - | - | 100±0.00 (52/52) | - | ns |
| Ifnar ^{-/-} x WT | 75.00±3.4 (9/12) | 25.00±0.50 (3/12) | 52.73±2.75 (29/55) | 38.18±1.06 (21/55) | ns | 41.67±2.50 (5/12) | 58.33±1.55 (7/12) | - | 47.27±2.25 (26/55) | 43.64±1.99 (24/55) | - | ns |
| Ifnar ^{-/-} x Ifnar ^{-/-} | 37.50±0.82 (12/32) | 62.5±2.05 (20/32) | 23.00±1.83 (20/43) | 20.00±1.41 (20/43) | ns | - | 43.75±0.94 (13/32) | 56.25±1.41 (18/32) | - | 41.86±1.39 (18/43) | 58.14±2.03 (25/43) | ns |

*Teste qui-quadrado. As amostras foram comparadas com o controle de cada cruzamento. F-fêmea. M-macho. WT-tipo selvagem. HET-heterozigoto. KO-Nocaute

Tabela 6: Taxa de reabsorção entre cruzamentos

| F x M | Controle | OROV | p |
|---|------------|------------|----|
| | %±DP | %±DP | |
| WT x WT | 0.00±0.00 | 6.97±0.80 | ns |
| WT x Ifnar ^{-/-} | 20.00±0.50 | 4.16±0.47 | ns |
| Ifnar ^{-/-} x WT | 0.00±0.00 | 2.04±0.37 | ns |
| Ifnar ^{-/-} x Ifnar ^{-/-} | 0.00±0.00 | 21.56±1.32 | ns |

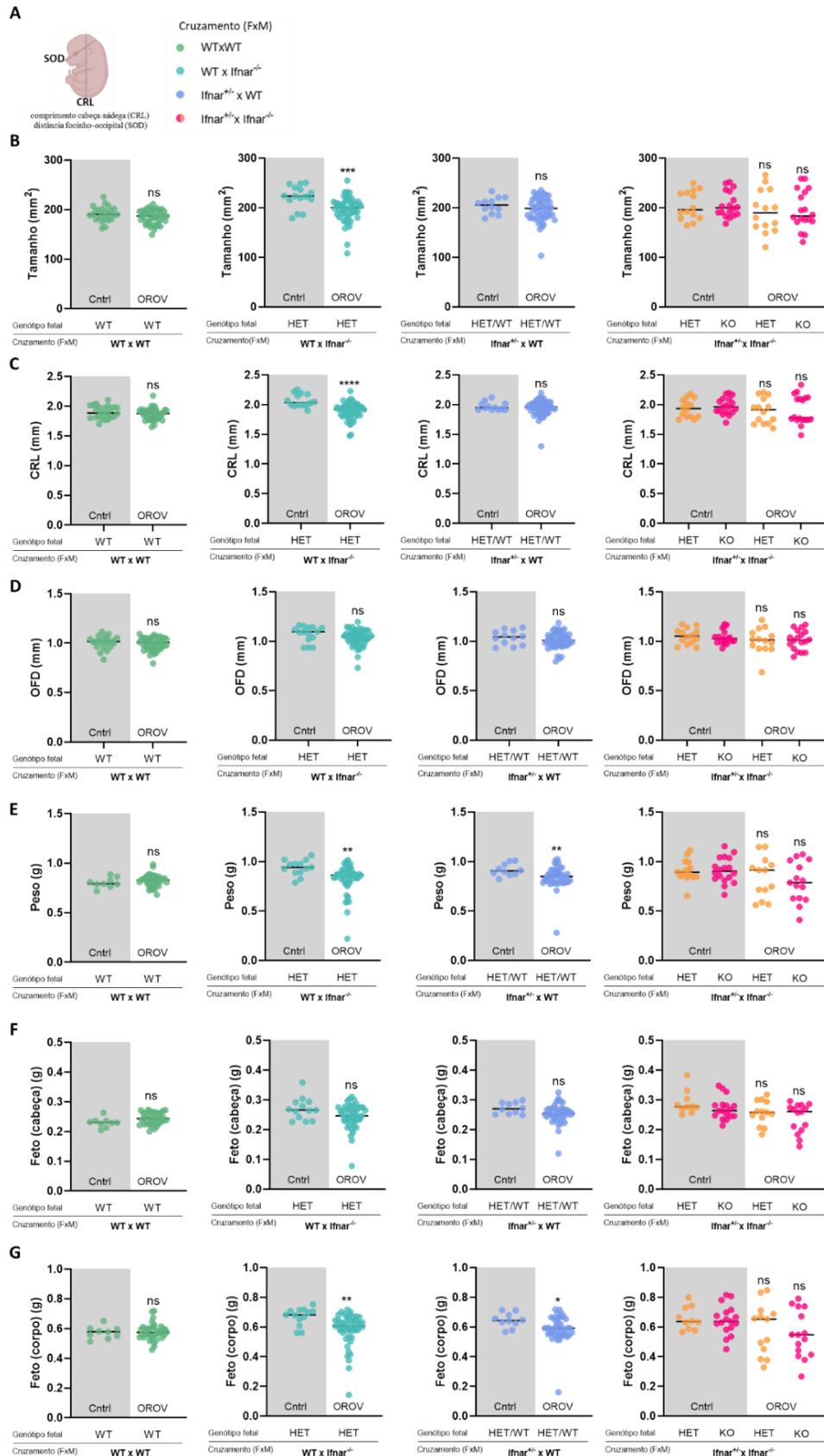
*Teste qui-quadrado. As amostras foram comparadas com o controle de cada cruzamento.

Os fetos foram posteriormente analisados quanto ao tamanho fetal e peso. Para o tamanho fetal foram consideradas as medidas do comprimento cabeça-nádega (*crown-rump length-CRL*) x distância focinho-occipital (*snout-occipital distance-SOD*). No modelo *Ifnar1^{-/-}* e *Ifnar1^{+/-}*, no qual as fêmeas grávidas foram infectadas com 10^2 UFF de OROV e os tecidos foram coletados 6 dias pós infecção, foi possível observar uma redução significativa no tamanho ($p=0,0200$) e peso ($p=0,0003$) dos fetos infectados comparado ao seu controle com mesmo genótipo não infectado. Mesmo quando os fetos possuem uma sinalização parcial por IFN (*Ifnar^{+/-}*), mas o genótipo materno é *Ifnar1^{-/-}* a diferença no tamanho ($p=0,0003$) e peso ($p=0,0028$) permanece quando comparado ao controle não infectado (dados não apresentados). Concluímos assim que há uma proteção do feto durante a infecção quando há o receptor de IFN do tipo I. Não foram encontradas diferenças significativas nos parâmetros de peso e tamanho fetal nos camundongos WT e SJL considerando as mesmas condições do camundongo *Ifnar1^{-/-}*, porém com uma dose de 10^5 UFF de OROV (dados não apresentados).

A análise macroscópica dos fetos no D8 (Figura 13) dos cruzamentos *Ifnar1^{+/-}* x *Ifnar1^{-/-}* não revelou diferenças claras no tamanho ou peso fetal, embora eles tendessem a ser menores em tamanho (HET $p=0,4824$; KO $p=0,1810$) e peso (HET $p=0,5912$; KO $p=0,0674$) em comparação com o grupo controle. Por outro lado, um leve efeito foi observado nos fetos dos cruzamentos WT x *Ifnar1^{-/-}* ($p=0,0006$; tamanho e $p=0,0012$; peso) e *Ifnar1^{+/-}* x WT ($p=0,0095$; peso) que foram significativamente menores em comparação ao grupo controle (Figura 13). As diferenças encontradas sugerem que há uma menor distância CRL (Figura 13B) assim como menor peso do corpo fetal (Figura 13F), sugerindo uma possível diferença no crescimento.

Assim, estudos comportamentais pós-natais poderiam evidenciar sequelas da infecção gestacional por OROV e que possam estar associadas com as diferenças discretas aqui relatadas, como as alterações de tamanho e peso do feto observadas durante a infecção por OROV.

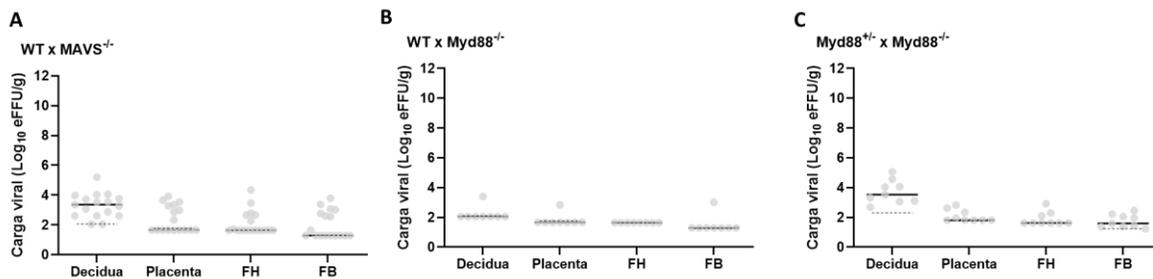
Figura 13: Tamanho e peso dos fetos de camundongos após infecção materna com OROV. As fêmeas de camundongos foram infectadas com 10^5 UFF de OROV i.v no E9.5 de gravidez. 8 dias após a infecção, os camundongos foram sacrificados e os fetos foram coletados para medições fetais (A). O tamanho foi obtido pelo comprimento cabeça-nádega (CRL) e distância focinho-occipital (SOD), também representados individualmente (B-D). O peso do feto foi obtido pelos valores individuais da cabeça fetal e do corpo fetal (E-G). Para comparações pareadas foi utilizado o teste de Mann-Whitney contra sua respectiva solução salina. * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$; **** $p<0,0001$.



5.4 Caracterização do papel das vias imunológicas de reconhecimento viral no controle da replicação de OROV durante a gestação utilizando camundongos deficientes em Myd88 e MAVS.

Para avaliar o impacto de moléculas presentes em vias de sinalização que levam a produção de IFN para o controle da infecção congênita por OROV, analisamos as consequências da infecção em cruzamentos entre camundongos WT e aqueles com deficiência em Myd88 e MAVS. Os resultados revelaram que a deleção parcial desses componentes da resposta imune inata não interfere nas cargas virais da decídua, placenta e feto. No cruzamento WT x *Mavs*^{-/-} vemos uma carga viral similar ao cruzamento WT x WT (Figura 14A) enquanto nos cruzamentos com Myd88 a carga viral medida em quantidade de RNA viral é muito baixa ou indetectável (Figura 14B,C). Adicionalmente a infecção de camundongos *Mavs*^{-/-} durante a gestação com OROV se mostrou pouco produtiva uma vez que baixos títulos virais foram encontrados na placenta e praticamente indetectável no feto quando coletados 6 dias pós-infecção (dado não apresentado).

Figura 14: Carga viral em camundongos deficientes para as vias inatas de Myd88 e MAVS. As fêmeas de camundongos foram infectadas com 10⁵ UFF de OROV i.v no dia E9.5 da gestação e tecidos maternos e fetais foram coletados 8 dias após a infecção. As cargas virais na decídua, placenta, e cabeça e corpo do feto foram avaliadas por RT-qPCR. Não foram realizados testes estatísticos. Linha tracejada corresponde ao limite de detecção.

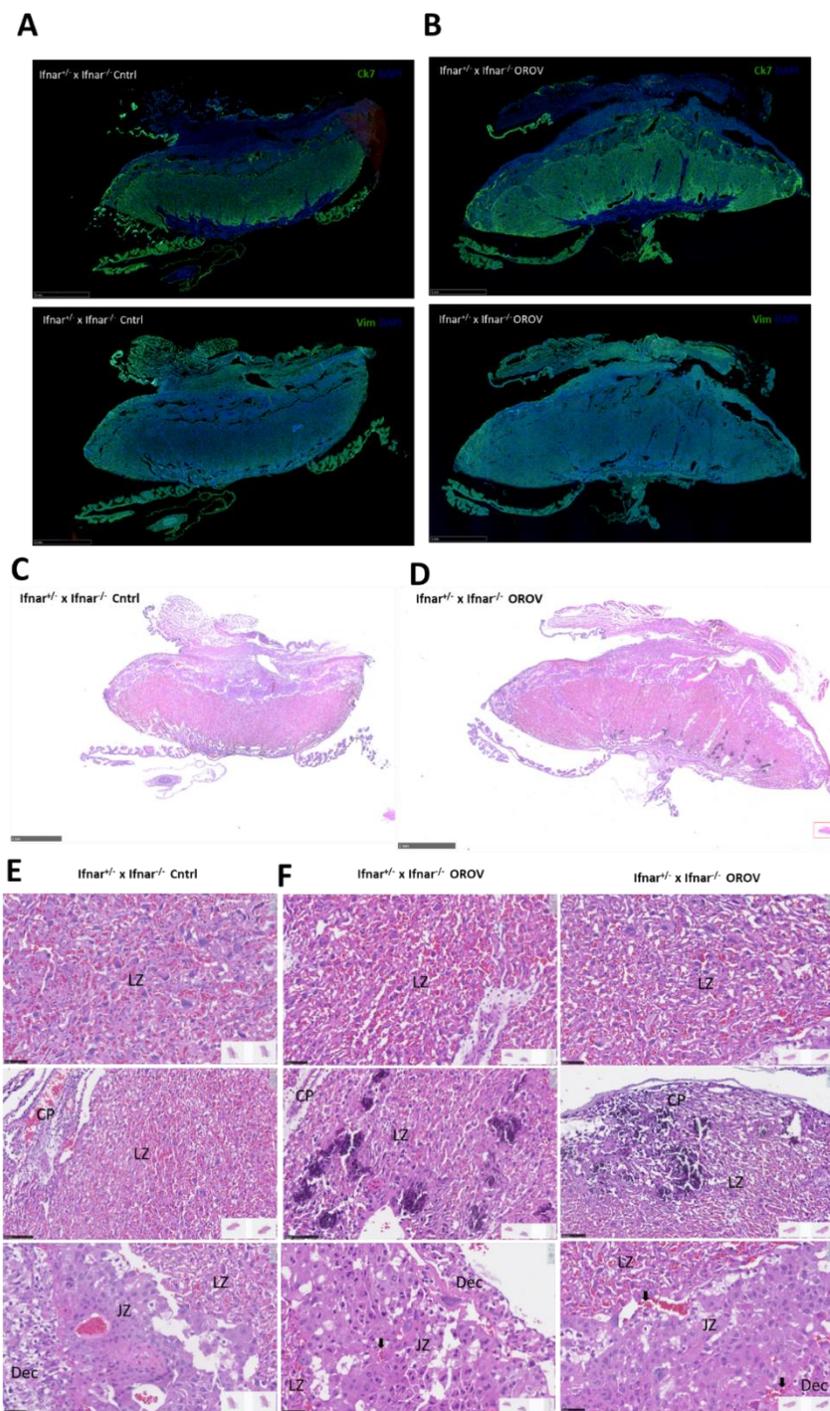


5.5 Determinação do efeito de IFN-I na arquitetura placentária durante a infecção por OROV através da análise histológica da placenta de camundongos grávidas infectados.

Para saber se a infecção por OROV na placenta poderia causar disfunção placentária neste modelo, realizamos análise histológica com hematoxilina e eosina (H&E) e imunofluorescência, utilizando marcadores de trofoblastos, citoqueratina 7, (Ck7) e de células endoteliais e mesenquimais, Vimentina (Vim), nas placentas do cruzamento *Ifnar1*^{+/-} x *Ifnar1*^{-/-} no D8 (Figura 15). Não foram encontradas diferenças entre a placenta controle e infectada quanto a expressão de Ck7 e Vim (Figura 15A,B). Ainda, não foram encontradas diferenças entre placentas infectadas com OROV e controle em relação ao tamanho e arquitetura. Pela coloração H&E, observamos o

mesmo padrão de camadas (ou zonas) sem diferenças grosseiras na quantidade de glóbulos vermelhos ou infiltração de células imunes no tecido (Figura 15 C-F).

Figura 15: Análise histológica de cruzamentos *Ifnar1^{+/-}* x *Ifnar1^{-/-}* em E17.5 após infecção com OROV. As fêmeas de camundongos foram infectados com 10^5 UFF de OROV i.v no dia E9.5 de gestação. 8 dias após a infecção, os camundongos foram sacrificados e as placentas foram coletadas para histologia e imunofluorescência em parafina. As placentas foram marcadas com anticorpos pan-trofoblasto Ck7 e vimentina (células endoteliais e mesenquimais) contrastado com DAPI (A,B). A placenta foi corada com hematoxilina e eosina (H&E). Menor ampliação (C,D). Maior ampliação das camadas placentárias (D,E). Seções completas da placenta foram digitalizadas com ampliação de 2,5X (barras de escala: 1 mm); ampliação de 20X (barras de escala: 50 μ m). Dec-decídua; JZ-Zona juncional; LZ-Zona do labirinto; CP-Placa coriônica.



5.6 Detecção de partículas infecciosas na placenta de camundongos infectados por OROV.

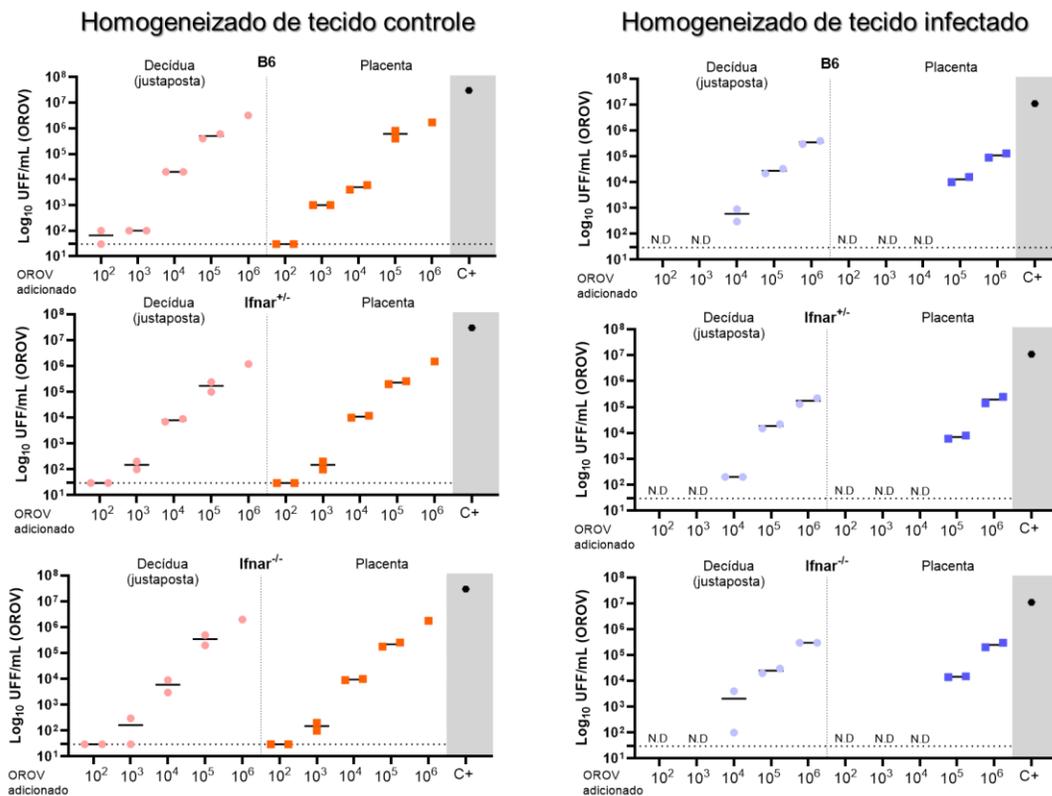
Para avaliar se os dados de quantificação de genoma de OROV na placenta se refletiam em diferenças na carga de partículas virais infecciosas, resolvemos titular por ensaio de formação de foco infeccioso a quantidade de OROV em amostras de decídua, placenta e feto de todos os

cruzamentos D8 usando um anticorpo para OROV em células Vero. Entretanto, não conseguimos detectar nenhum vírus viável nessas amostras independente do cruzamento (dado não apresentado). Ainda, quando tecidos maternos foram titulados (cérebro e baço), fomos capazes de detectar vírus viável apenas nas amostras de cérebro com mais de 10^9 eUFF/g com obtenção de um título de 10^6 UFF/mL (dado não apresentado).

Para descartar qualquer inibição tecidual que pudesse afetar o ensaio, fizemos um experimento adicional no qual é adicionado vírus às amostras de decíduo controle ou infectada (justaposta) ou amostras de placenta de amostras *Ifnar1*^{+/+}, *Ifnar1*^{-/-} e WT (identificadas pelo genótipo do feto) (Figura 16). Pudemos detectar vírus independentemente da quantidade de vírus adicionada (10^2 a 10^6 UFF) ao titular as amostras controle (Figura 16A). No entanto, ao adicionar o OROV em amostras de animais infectados, detectamos apenas vírus infecciosos quando foram adicionadas quantidades mais elevadas de vírus (Figura 16B). O mesmo ocorre quando utilizamos a linhagem de camundongo 3T3 (resposta intacta de IFN, ao contrário da célula Vero) incubada com MAR1-5A3 pré- e pós-infecção (dado não apresentado).

Isto pode sugerir que a infecção por OROV não é produtiva a longo prazo na interface materno-fetal, apesar da presença de RNA viral ou que existem fatores presentes no tecido infeccioso que poderiam inibir a detecção de vírus viáveis.

Figura 16: Titulação de homogenatos de decídua e placenta por ensaio de foco infeccioso. Tecidos controle e infectados com OROV coletados no dia E17.5 de gestação foram enriquecidos com OROV até 10^2 - 10^6 UFF e posteriormente titulados em células Vero por ensaio de foco (A,B). Os homogenatos (pool de 5 amostras para cada condição) de decídua e placenta foram agrupados por genótipo fetal. Linha tracejada corresponde ao limite de detecção.



5.7 Caracterização do efeito *in vitro* de OROV sobre linhagens de células placentárias de humanos, caracterizando a cinética de replicação, a expressão de genes relacionados à resposta imune inata, a produção de citocinas após infecção com OROV.

Para determinar se o OROV é capaz de se replicar em células de placenta humana foram realizadas infecções *in vitro*, com a linhagem, não sincicializada, BeWo (ATCC® CCL-98™) e, não fusogênica, JEG-3 (ATCC® HTB-3), ambas linhagens trofoblásticas (Figura 17 e Figura 18). Caracterizamos a cinética de replicação viral com dois MOIs diferentes (0,1 e 1) nos tempos 0, 6, 12, 24 e 48 h pós-infecção. Ambas as células apresentam replicação viral com produção de partículas virais no sobrenadante (Figura 17A e Figura 18A). O pico de replicação viral ocorre em 48h seguido de perda de viabilidade celular em 72h caracterizada microscopicamente pela perda de fenótipo e aderência.

Posteriormente, para caracterizar quais vias da resposta imune inata podem ser ativadas durante a infecção por OROV na linhagem BeWo, analisamos a expressão de receptores Toll-like (Tlr3, Tlr7 e Tlr9); receptores citoplasmáticos (Rig-1 e Mda5); moléculas adaptadoras (Myd88, Trif e Mavs); fatores reguladores de interferon (Irf1, Irf3, Irf7); fator de transcrição (Nfkb); interferons tipo I e tipo III (Ifn- α , Ifn- β E Ifn- λ); e genes induzidos por interferon (Ifit1, Ifit2, Ifitm2,

Ifitm3, Isg15, Oasl e Oas1) em 6 e 24 hpi por RT-PCR (Figura 17D-J). Para os genes com diferença em sua expressão, foi realizado o mesmo experimento com a linhagem JEG-3 (Figura 18D,E).

Figura 17: Cinética de replicação de OROV em linhagens de células BeWo. As células BeWo foram infectadas com duas multiplicidades diferentes de infecção (MOI = 0,1 e MOI = 1) de OROV. Quando indicado, as células foram incubadas com um anticorpo anti-Ifnar (5 ng/mL) 30 min antes da infecção com OROV. O título do vírus no sobrenadante foi determinado por RT-qPCR e ensaio de formação de foco em 0, 6, 12, 24 e 48 h após a infecção. A expressão gênica foi detectada por PCR quantitativo em tempo real utilizando primers específicos e GAPDH como controle endógeno. Os dados foram analisados usando o método comparativo de CT ($\Delta\Delta CT$). Os dados estão expressos como o número de vezes sobre o respectivo controle e normalizada usando o gene GAPDH. Os dados são representativos de 2 experimentos independentes realizados em triplicados e representam a média \pm DP usando ANOVA de duas vias com teste post-hoc de Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$. Linha tracejada corresponde ao limite de detecção.

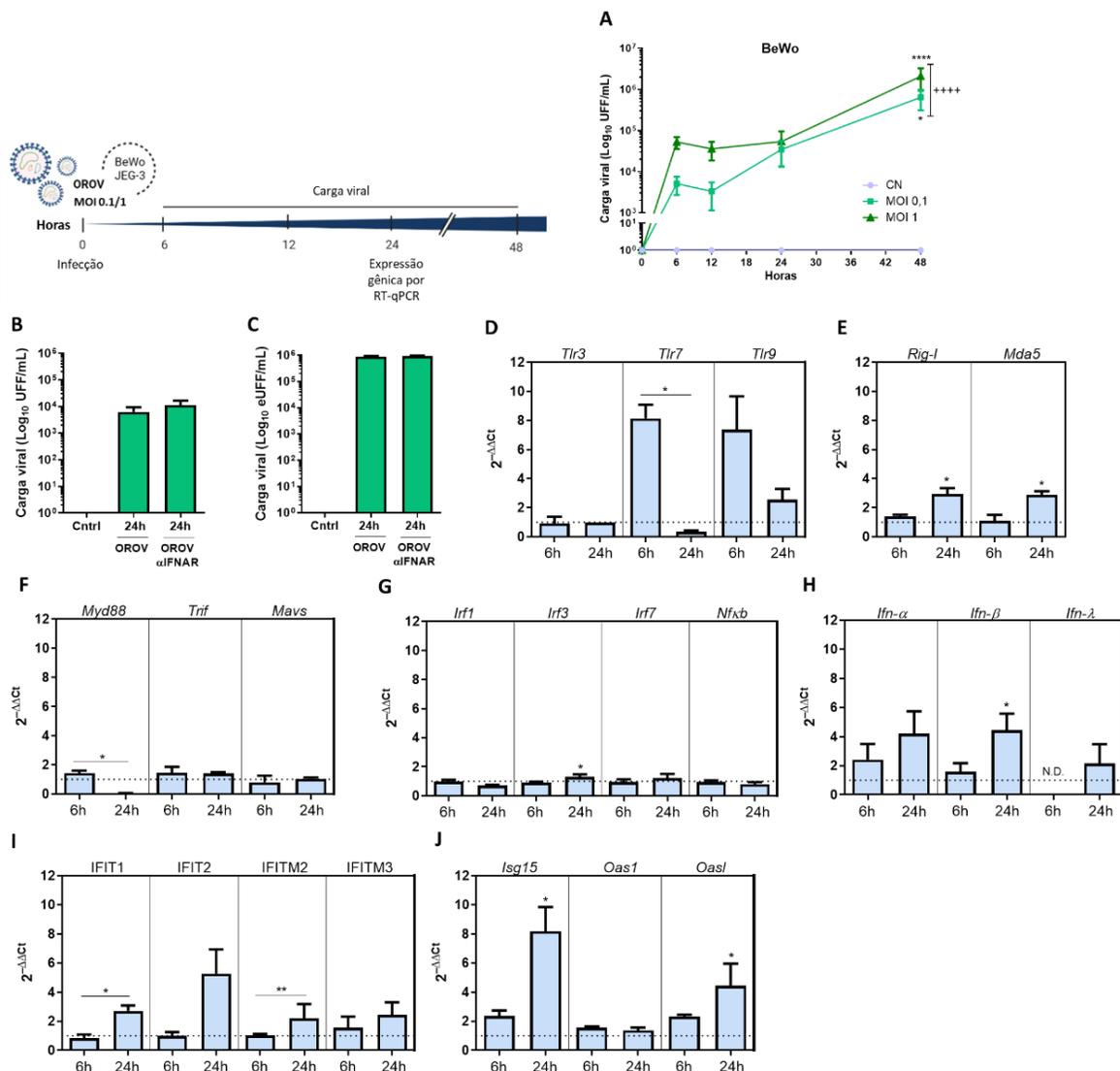
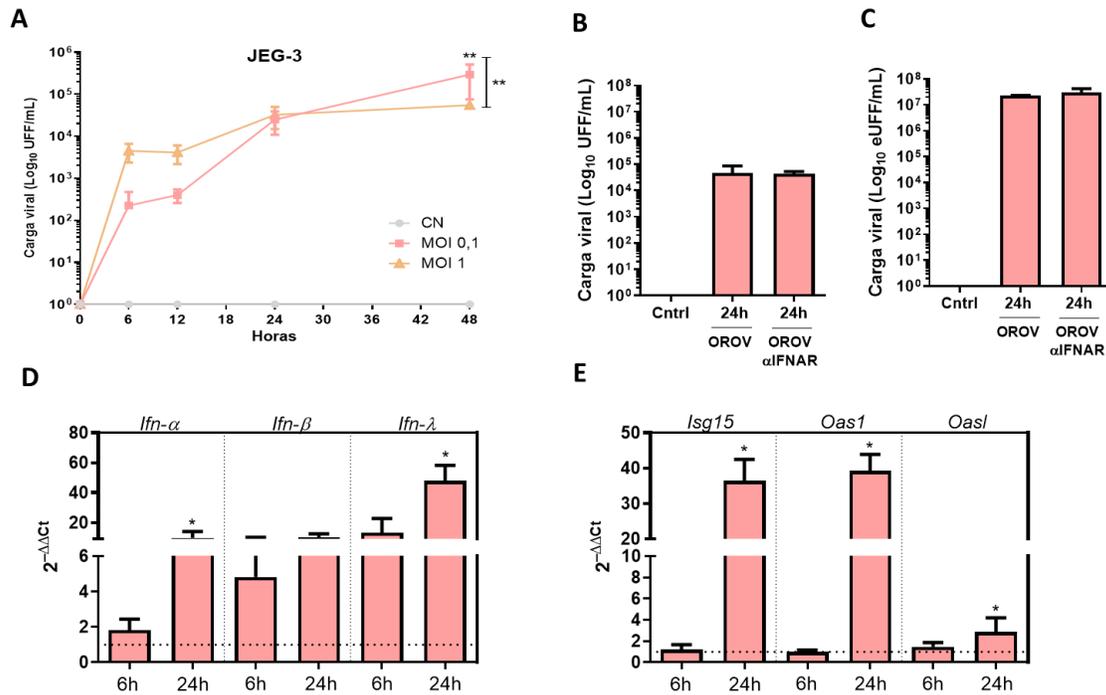


Figura 18: Cinética de replicação de OROV em linhagens de células JEG-3. As células JEG-3 foram infectadas com duas multiplicidades diferentes de infecção (MOI = 0,1 e MOI = 1) de OROV. Quando indicado, as células foram incubadas com um anticorpo anti-Ifnar (5 ng/mL) 30 min antes da infecção com OROV. O título do vírus no

sobrenadante foi determinado por RT-qPCR e ensaio de formação de foco em 0, 6, 12, 24 e 48 h após a infecção e os resultados foram expressos em Log_{10} unidade formadora de foco por mL (Log_{10} UFF/mL). A expressão gênica foi detectada por PCR quantitativo em tempo real utilizando primers específicos e GAPDH como controle endógeno. Os dados foram analisados usando o método comparativo de CT ($\Delta\Delta\text{CT}$). Os dados estão expressos como o número de vezes sobre o respectivo controle e normalizada usando o gene GAPDH. Os dados são representativos de 2 experimentos independentes realizados em triplicados e representam a média \pm DP usando ANOVA de duas vias com teste post-hoc de Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Linha tracejada corresponde ao limite de detecção.



Os dados mostram que a infecção com OROV induz a formação de uma resposta antiviral nessas células trofoblásticas culminando na produção de IFN tipo I e III com posterior transcrição de genes induzidos por interferon (ISGs) com conhecida atividade antiviral. A infecção das células BeWo com OROV levou ao aumento da expressão dos genes Tlr7 (6h $p = 0,1333$), Tlr9 (6h $p = 0,0571$ e 24h $p = 0,0571$), Rig-I (24h $p = 0,0286$), Mda5 (24h $p = 0,0286$), Irf3 (24h $p = 0,0286$), *Ifn-β* (24h $p = 0,0286$), *Isg15* (24h $p = 0,0286$) e *Oas1* (24h $p = 0,0286$) (Figura 10D-J). Da mesma forma, quando analisamos os genes nas células JEG-3 infectada com OROV encontramos diferenças na expressão de *Ifn-α* (24h $p = 0,0286$), *Ifn-β* (24h $p = 0,0571$), *Ifn-λ* (24h $p = 0,0286$), *Isg15* (24h $p = 0,0286$), *Oas1* (24h $p = 0,0286$), e *Oas1* (24h $p = 0,0286$).

Adicionalmente, para analisar o papel do IFN do tipo I na infecção de células da placenta *in vitro*, infectamos as linhagens celulares BeWo e JEG3 pré-tratadas com α -Ifnar com OROV (Fig.17B,C e 18B,C). Curiosamente, usando uma MOI=0,1, não observamos um aumento da carga viral no sobrenadante e no interior celular quando ambas as células foram tratadas com um

anticorpo α -Ifnar. Essa falta de diferença aponta, novamente, para mecanismos virais eficientes de antagonismo da via efetora de IFN do tipo I. Além disso, células de linhagens podem não ter uma resposta tão eficiente de IFN quanto células primárias de placenta, fazendo com que a inibição de Ifnar não seja suficiente para levar a um aumento da replicação viral. Isso indica que as linhagens celulares BeWo e JEG3 podem não ser capazes de produzir uma resposta antiviral efetiva com altos níveis de ISGs em modelos *in vitro*.

Em suma, com os dados *in vitro*, caracterizamos as vias de sinalização e de resposta antiviral induzidas pela infecção OROV em linhagens celulares de trofoblastos vilosos e extravilosos. Verificamos que a infecção por OROV leva a ativação de receptores capazes de reconhecer o genoma viral e induz a expressão de IFN do tipo I e III. Entretanto, a infecção por OROV parece ser capaz de modular a resposta induzida por IFNs, principalmente na célula BeWo, contribuindo para o estabelecimento de um cenário favorável à replicação viral.

6. Discussão

A resposta imunológica e a atividade antiviral na placenta são dependentes da expressão de receptores e produção de IFN do tipo I, principalmente em trofoblastos (Chatterjee, 2001; Gomez, 2008; Kwon, 2014; Racicot, 2017), e alguns vírus são capazes de estabelecer infecções de longo prazo na placenta, em parte por mecanismos dependentes do antagonismo das vias de IFN do tipo I (Racicot, 2017). De fato, a resposta dependente de IFN tipo I na placenta de camundongos durante a infecção pelo ZIKV tem um efeito deletério que resulta em uma arquitetura anormal da barreira materno-fetal. Assim, o IFN tipo I parece ser um importante mediador de complicações durante a gravidez em gestantes (Racicot, 2017; Yockey, 2018). Em contraste, o IFN tipo III, que é produzido pelos trofoblastos humanos, atua de maneira autócrina e parácrina e desempenha um papel essencial na manutenção da barreira placentária durante a infecção pelo ZIKV (Bayer, 2016).

Vimos anteriormente que a exposição a alguns arbovírus pode levar à transmissão materno-fetal e causar patologias durante a gravidez, como foi documentado para DENV, CCHFV, VEEV, JEEV, WEEV, WNV, YFV, ZIKV e com CHIKV (Shinefield, 1953; Copps, 1959; Chaturvedi, 1980; Justines, 1980; Hayes, 2003; Fritel, 2006; Bentlin, 2009; Ergonul, 2010; Argolo, 2013; Besnard, 2013; Kourtis, 2014; Sirois, 2014; Brasil, 2016; Calvet, 2016; Charlier, 2017). Na ausência de amostras de placenta humana positivas para OROV, nós utilizamos o modelo animal mais comumente utilizado para estudar a transmissão congênita.

Camundongos imunocompetentes adultos não são suscetíveis à infecção por OROV. Assim, os primeiros modelos animais descritos para OROV foram desenvolvidos após infecção intracerebral em camundongos lactentes e hamsters adultos ou com inoculação intracerebral em camundongos recém-nascidos (Araújo, 1978 e 1979; Rodrigues, 2007). Nós infectamos camundongos adultos não grávidos com deficiência na resposta de interferon tipo I e mostramos que o RNA viral foi detectado em até 8 dias de infecção. A proteção parcial de *Ifnar* é suficiente para sustentar a infecção em níveis mais baixos, bem como em camundongos WT e mostra que o OROV pode atingir os tecidos reprodutivos e potencialmente afetar a gravidez. Claramente, a linhagem mais acometida pela infecção é a dos camundongos *Ifnar1^{-/-}*.

Quando avaliamos os efeitos dos diferentes tipos de IFNs na infecção por OROV durante a gestação, vemos que uma deficiência na sinalização de IFN do tipo I na mãe é necessária para permitir que o vírus atravesse a barreira hematoplacentária. A resposta desencadeada pela sinalização via IFN do tipo I é essencial para o controle da infecção pois na sua ausência os camundongos são extremamente suscetíveis a infecção e morrem em decorrência da replicação viral e da grande quantidade de citocinas inflamatórias (Proença-Modena, 2015a). Camundongos imunocompetentes são capazes de reduzir o alcance fetal por OROV uma vez que a detecção do vírus na placenta e feto é baixa em camundongos WT e SJL. Contudo, uma vez administrado ao camundongo WT um anticorpo anti-*Ifnar* de modo a recapitular o fenótipo observado nos animais com completa deleção do receptor, vemos que uma vez bloqueada a sinalização por *Ifnar*, há um aumento na susceptibilidade viral da placenta e do feto. Camundongos SJL são utilizados como modelos de infecção congênita para ZIKV, devido a sinalização intacta de IFN, no qual os fetos apresentam restrição de crescimento fetal e sinais de microcefalia, assim como encontrado nas infecções por ZIKV em humanos (Cugola, 2016). No contexto de infecção congênita com OROV em camundongos WT e SJL, não foi possível detectar RNA viral na placenta e feto sugerindo uma alta sensibilidade viral à resposta de IFN do tipo I em modelo murino. Essa sensibilidade foi evidenciada também quando utilizamos diferentes concentrações de anti-*Ifnar* em camundongos WT sendo necessária a utilização da menor concentração de anticorpo testada de modo a garantir a sobrevivência do animal pelo período gestacional abordado.

A resposta imunológica desencadeada na placenta dos animais *Ifnar1^{-/-}* infectados por OROV encontra-se alterada quando analisada a expressão de alguns genes já conhecidos importantes na resposta ao OROV. Estudos já haviam demonstrado que a resposta imunológica

frente ao OROV depende dos receptores RLR, da sinalização via MAVS e dos fatores de transcrição IRF-3 e IRF-7 em modelo murino (Proença-Modena, 2015a). Além do aumento da expressão desses genes em nosso modelo, foi possível observar um aumento na expressão de *Ifn- α* na placenta dos camundongos *Ifnar1^{-/-}* apesar da ausência do seu receptor. Há pouca informação sobre a produção de IFN- α e consequente resposta induzida por interferon por vias independentes do receptor de IFN do tipo I. No entanto, o estudo de Malmgaard *et al.* (2002) mostrou que camundongos IFN- α/β KO infectados com o vírus da coriomeningite linfocítica (LCMV) produzem IFN- α por meio do receptor de IFN- γ e essa produção cessa quando são utilizados camundongos nocautes para o receptor IFN- $\alpha/\beta/\gamma$ (Malmgaard, 2002). Além disso, camundongos infectados com Orthomyxovirus SC35M podem produzir IFN- α dependente da sinalização de TLR, mas independente da retroalimentação do receptor de IFN- α (Höcker, 2015).

Quando analisados possíveis efeitos decorrentes da resposta por IFN do tipo I na placenta que afetariam tanto a arquitetura placentária quanto o desenvolvimento fetal, procuramos alguns elementos metabólicos importantes para a placentação ou que já foram descritos em patologias associadas a placenta.

Chen *et al*, mostrou que a durante a infecção com ZIKV ocorrem mudanças metabólicas de modo a promover a replicação viral em placentas humanas. Utilizando metabolômica em larga escala, foram encontradas alterações nas vias de lipogênese, rearranjo da membrana intracelular, disfunção mitocondrial e desbalanço de citocinas pro- e anti-inflamatórias (Chen, 2020).

Algumas mudanças metabólicas, como por exemplo para um estado glicolítico, são uma forma de adaptação a um ambiente hipóxico muito estudado em células tumorais (Ward, 2012; Biswas, 2015). Nesse estado, a via glicolítica está muito ativa assim como a expressão de transportadores de glicose tais como Glut1. Essa alteração metabólica pode levar a ativação de enzimas glicolíticas e a sinalização pela via de PI3K-AKT que interage diretamente com o complexo alvo da rapamicina mTOR que ativa e estabiliza HIF1 α (Semenza, 1994 e 2003; Cairns, 2011; Ward, 2012). PKM2 (piruvato quinase M2) é um regulador metabólico chave presente principalmente em células tumorais (Altenberg, 2004) e que quando translocado ao núcleo interage com HIF1 α , um fator induzível por hipóxia (Luo, 2011). HIF1 α é normalmente degradado em condições de normóxia e estabilizado em condições de hipóxia (Iyer, 1998; Gultice, 2009; Redman, 2009). Durante a placentação, ele é importante na diferenciação de trofoblastos, e quando presente em altos níveis pode levar ao desenvolvimento de desordens associadas à gravidez (Albers, 2019).

Já PFKFB3 (6-fosfofructo-2-quinase / frutose-2,6-bifosfatase 3) é uma enzima limitante na glicólise cuja expressão é maior em células vasculares, leucócitos e células tumorais (Cao, 2019). A glicólise mediada por PFKFB3 já havia sido associada a um aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias tais como TNF- α e IL1- β em células endoteliais do pulmão (Cao, 2019). Além disso, a resposta de PFKFB3 em uma linhagem trofoblástica e em explantes tratados com LPS foi associada a uma ativação da via de NF- κ B com consequente produção excessiva de IL-6, IL1- β e TNF- α o que ocasionou em defeitos na migração e capacidade de invasão dos trofoblastos (Zhang, 2021). De forma resumida, PKM2 interage diretamente com HIF1 α levando a transcrição de elementos de resposta à hipóxia (HRE) e aumento na atividade glicolítica de enzimas tais como PFKFB3 que contribuirão para o estabelecimento de um estado inflamatório. Girard *et al.* (2010), mostra que produtos microbianos tais como LPS desencadeiam a inflamação da placenta levando a desordens neurológicas e morte fetal (Girard, 2010). Este efeito é revertido quando utilizado modelos knockout ou antagonistas do receptor de IL1- β (Girard, 2010; Reis, 2020). Ainda, parte do efeito de IL1- β deve-se à ativação de vias do inflamassoma que culminam na produção dessa citocina na placenta em resposta à malária (Reis, 2020). Dessa forma, os resultados no nosso modelo de infecção congênita em camundongos *Ifnar*^{-/-} indicam um papel importante das vias glicolíticas e da hipóxia durante a infecção por OROV contudo limitado uma vez que não foram realizados testes ou utilização de animais específicos que permitam ver a ativação das vias metabólicas, via do inflamassoma e envolvimento da hipóxia na infecção.

Além disso, o OROV é sabidamente um vírus com capacidade de induzir apoptose em diferentes modelos celulares (Acrani, 2010). A fosfatidilserina está presente internamente na camada bi lipídica da célula e é exposta durante a apoptose. Esse controle é principalmente realizado por células fagocíticas, tais como células dendríticas e macrófagos, sendo uma forma de reduzir respostas autoimunes e inflamação. Os receptores TIM e TAM atuam na regulação negativa da resposta imunológica sendo importantes para o término da resposta inflamatória e início da reparação tecidual uma vez ativada a resposta adaptativa (Fadok, 1992; Verhoven, 1995; Lu, 2001; Savill, 2002; Rothlin, 2007; Freeman, 2010).

Recentemente os receptores TIM e TAM foram associados a ganhos de função em infecções por vírus envelopados. O receptor Axl pode facilitar a entrada dos vírus Ebola e do vírus Marburg através de uma interação indireta que promove sua internalização e fusão a membrana da célula hospedeira (Shimajima, 2006 e 2007; Brindley, 2011). Ainda, o ligante Gas6 pode promover

a ligação entre fosfatidilserinas presentes no envelope viral aos receptores TAM presentes na superfície celular facilitando a infecção por lentivírus, o vírus vaccínia e ZIKV (Morizono, 2011; Silva-Filho, 2021). O receptor TIM-1 também pode melhorar substancialmente a eficiência de infecção de vários vírus patogênicos. Jemielity *et al.* (2013), utilizou partículas semelhantes a vírus (VLPs-virus-like particles) contendo proteínas das famílias Flavivirus, Arenavirus e Alphavirus no estudo da interação entre as VLPs e o receptor TIM-1 e mostrou uma dependência da fosfatidilserina presente no envelope para promover a infecção (Jemielity, 2013). O vírus da Dengue pode interagir diretamente com os receptores TIM ou, através do ligante Gas6, com os receptores TAM sendo ambos considerados fatores de entrada do vírus (Meertens, 2012). Similarmente, à ligação aos receptores TIM e TAM pela fosfatidilserina presente no envelope viral pode ser um cofator para a infecção de monócitos pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) (Callahan, 2003; Chua, 2019). Na placenta, os níveis de Gas6 estão associados a complicações neurológicas causadas pelo vírus Zika assim como a diminuição da resposta de IFN do tipo I (Silva-Filho, 2021). O aumento na expressão de TIM-1 e Mertk em nosso modelo *Ifnar^{-/-}* infectado por OROV podem indicar uma possível interação entre o vírus e os receptores que promoveriam a infecção e o aumento no apoptose celular o que, conseqüentemente, estaria contribuindo para uma perda da arquitetura placentária e dano fetal.

Nosso modelo até então se limitou a caracterizar brevemente a resposta imunológica e suas possíveis conseqüências na gestação de modo a destacar a importância da resposta de IFN do tipo I na infecção por OROV em modelo murino.

Contudo, de modo a não se limitar a um modelo de nocaute global (para *Ifnar*) e para explorar como imunodeficiências maternas poderiam afetar a infecção por OROV, diferentes cruzamentos foram analisados criando diferentes backgrounds genéticos maternos e fetais. Nossos dados mostraram que não há haploinsuficiência materna ou fetal pois não foram encontradas diferenças significativas na carga viral nem nos tecidos maternos nem nos tecidos fetais dos cruzamentos entre fêmeas *Ifnar1^{+/-}* ou WT com machos *Ifnar1^{-/-}* ou WT em D8. Esses cruzamentos proporcionaram diferentes misturas de genótipos fetais, enquanto a decídua teria o mesmo genótipo da mãe. Mesmo que a prole tenha fetos KO (cruzamento entre *Ifnar1^{+/-}* e *Ifnar1^{-/-}*) que seriam mais suscetíveis a infecção devido à ausência do receptor de *Ifnar* na placenta (e parcial na decídua), não foram encontradas alterações na carga viral nos órgãos maternos ou nos fetos provenientes da mesma prole que indicassem um espalhamento viral relacionado ao genótipo fetal. No entanto,

quando realizado o cruzamento entre fêmeas *Ifnar1^{-/-}* com machos *Ifnar1^{-/-}*, pudemos observar uma alta carga viral que sugere que o genótipo materno com a completa ausência do receptor de *Ifnar* é necessário para que o vírus se dissemine e atravesse a placenta causando alterações macroscopicamente visíveis nos fetos em D3, contudo não mensuradas devido à fácil desestruturação dos fetos ao fazer a coleta.

Ainda, nos propusemos avaliar se diferentes proporções nos genótipos ou no sexo dos fetos afetaria de alguma forma a resposta ao vírus. Já havia sido observado que, em porcos, a infecção por ZIKV durante a gestação não levava a síndrome congênita de ZIKA na prole, entretanto eram observadas diferenças pós-nascimento na qual havia uma quantidade excessiva de IFN- α no soro dos animais. Análises por RNA-seq da placenta revelaram diferenças na resposta adquirida durante a infecção materna por ZIKV e uma relação sexo-específica. Sugere-se que machos teriam um potencial para resultados patológicos no cérebro maior que fêmeas (Trus, 2019). Camundongos C57BL/6 tratados com LPS (lipopolissacarídeo) durante a gestação apresentaram uma prole com diferenças na patologia placentária. Enquanto machos apresentaram maiores danos pré-natal além de hipóxia e diferenças comportamentais sociais, fêmeas exibiram um perfil inflamatório agudo, atraso no desenvolvimento corporal e ansiedade na vida adulta (Braun, 2019). No nosso modelo, não foram encontradas diferenças quanto a carga viral nos diferentes cruzamentos testados.

Como alterações na resposta imune inata podem em parte ser responsáveis pelo aumento da susceptibilidade e severidade da doença causada por alguns arbovírus devido à ausência de proteínas-chave na via de IFN do tipo I, utilizamos camundongos *Myd88* e *Mavs* deficientes no contexto da infecção por OROV (Couderc, 2008). Proença-Modena *et al.* (2015), mostrou anteriormente que MAVS restringe a infecção e patogênese pelo OROV. Camundongos *Mavs^{-/-}* são vulneráveis à infecção por OROV com uma taxa de mortalidade de 39% e com sinais clínicos visíveis e carga viral detectável em alguns animais a partir do 4 dia pós infecção (Proença-Modena, 2015). Contudo, no intervalo de tempo entre a infecção e a eutanásia das fêmeas 6-8 dias, alguns órgãos como fígado e baço, além do soro, já possuíam uma carga viral indetectável (Proença-Modena, 2015). É importante ressaltar que o vírus consegue estabelecer uma infecção na placenta quando outros órgãos já foram capazes de eliminar o vírus, contudo isso não é suficiente para que o vírus estabeleça uma infecção significativa nos fetos. Outros sensores da resposta inata podem estar agindo para compensar a ausência da sinalização por MAVS. Já camundongos deficientes da molécula adaptadora *Myd88* em células B tem uma resposta humoral prejudicada devido a perda

de capacidade neutralizante de IgM e IgG na infecção por OROV (Toledo-Teixeira, em submissão). Anticorpos maternos são uma das formas de proteção fetal durante o desenvolvimento placentário, contudo em nosso modelo o período de infecção abordado a ausência de Myd88 durante a gestação não permitiu que a placenta e feto albergassem grandes quantidades de vírus no período analisado.

Apesar de não termos encontrado diferenças na carga viral utilizando diferentes estratégias de cruzamento dos animais com deficiências na resposta de IFN I e III, realizamos a análise histológica das placentas em desenvolvimento coletadas em D8. A manutenção da arquitetura placentária é importante para troca de nutrientes, oxigênio e resíduos além de funcionar como fonte de energia para o desenvolvimento fetal (Pijnenborg, 2006; Burton, 2015; Woods, 2018). Muitos vírus causam restrição de crescimento fetal e até mesmo levam ao aborto devido a alterações nessa estrutura desencadeadas pela resposta ao vírus. Após o E10 em camundongos, a placentação está completa com quatro camadas distintas compreendidas pela decídua, zona juncional, zona do labirinto e placa coriônica (Elmore, 2022). A disfunção placentária pode se dar pelo recrutamento de células imunes, bloqueio da proliferação e indução de morte celular. No modelo *Ifnar^{+/-}* no qual camundongos fêmeas foram infectadas por ZIKA, foi possível observar perda vascular na zona do labirinto e apoptose através da marcação com caspase 3 (Yockey, 2018). Ainda, genes de resposta a hipoxia, tais como *Glut1* e *Pfkfb3*, foram significativamente regulados nos fetos infectados (Yockey, 2018). Placentas de ratos Sprague-Dawley (SD) infectadas pelo vírus da febre do Vale do Rift (RVFV) mostram sinais de necrose e hemorragia com congestão vascular e infiltrado celular que levam a letalidade fetal (McMillen, 2018). Nossos dados não mostraram alterações macroscópicas nas placentas coletadas em D8. Acreditamos que, devido a carga viral encontrada nos animais *Ifnar^{-/-}* em D3, possíveis alterações estariam histologicamente visíveis uma vez que os camundongos, mãe e fetos, não sobrevivem a infecção com 10^5 UFF de OROV por mais tempo.

Nosso estudo se limita a não observar tempos gestacionais anteriores no qual a placentação não está completa e por isso, o feto está mais exposto a patógenos. Dessa forma não poderíamos inferir o impacto da infecção nos primeiros meses de gestação. Ainda, apesar de não encontrarmos diferenças na carga viral dos cruzamentos estudados, não foram realizados experimentos comportamentais ou qualquer acompanhamento pós-nascimento.

Devido a diferenças no desenvolvimento placentário e na composição da barreira hemato-placentária, torna-se difícil comparar diretamente as alterações patológicas observadas na placenta

de camundongos com as dos seres humanos. Assim, de modo a recapitular a infecção observada em camundongos, utilizamos linhagens trofoblásticas humanas.

As linhagens BeWo e JEG-3 possuem características trofoblásticas, contudo são provenientes de diferentes regiões da placenta. Enquanto a BeWo representa citotrofoblastos presentes nas vilosidades placentárias e que na sua forma fusionada caracterizariam uma barreira contra patógenos, a JEG-3 representa citotrofoblastos extravilosos com grande capacidade proliferativa e que invadem a decídua (Orendi, 2010; Lee, 2016; Drwal, 2018). Considerando isso, ambas as células consistem em trofoblastos com perfis gênicos distintos (Burleigh, 2007).

A fim de relacionar os resultados obtidos em modelo murino a resposta em humanos, genes importantes para a resposta contra vírus foram analisados durante a infecção por OROV.

Os genes IFIT1 e IFIT2 pertencem a uma família de proteínas que reduzem a replicação viral através de mecanismos de ligação ao RNA viral ou alterações na síntese proteica e são importantes para o controle de alguns arbovírus tais como o vírus Oeste do Nilo (WNV) e o vírus da encefalite japonesa (JEV) (Saha, 2006; Wachter, 2007; Zhou, 2013). Entretanto, IFIT-1 parece não ser essencial para o controle dos vírus de RNA de polaridade negativa, já que a deleção desse gene não confere maior vulnerabilidade a camundongos após infecção com os vírus OROV, vírus influenza A, vírus La Crosse e vírus Ebola (Pinto, 2015). Parte desse efeito pode ser consequência de mecanismos virais de antagonismo a alguns dos genes induzidos por IFNs (ISGs). De fato, sabe-se que alguns membros da família *Peribunyaviridae* possuem mecanismos para antagonizar o efeito de ISG15, já que domínios proteases do gene L desses vírus são capazes de hidrolizar ISG15 ligado a proteínas-alvo, levando a perda do efeito antiviral (Frias-Staheli, 2007; Proença-Modena, 2015a). Desse modo, embora os citotrofoblastos estudados tenham demonstrado grande produção de IFN do tipo I e, principalmente de IFN do tipo III após infecção por OROV, mecanismos ainda não totalmente entendidos de antagonização do efeito de ISGs nessas células podem fazer com que o vírus consiga se replicar em altos títulos, mesmo quando utilizado uma baixa MOI. De fato, meio-condicionado obtido de células primárias trofoblásticas infectadas com ZIKV foram capazes de induzir a produção de ISG em células não placentárias, o que não ocorreu quando utilizado um meio condicionado das linhagens BeWo, JEG3, JAR ou HTR8 (Bayer, 2016).

Os altos níveis de IFN- λ , a maior produção de ISGs e a menor replicação de OROV na célula JEG indica que essas citocinas antivirais podem ter um papel importante para a proteção do

feto durante a gestação em humanos contra OROV, como visto para ZIKV (Bayer, 2016; Yockey, 2018).

Interessantemente, a expressão de alguns genes envolvidos na resposta imunológica, como Tlr7, Rig-I, Mda5, Ifit1, Ifit2, Isg15, Oas1 e Ifn- λ , estão com a sua expressão consideravelmente alta em JEG-3, superior ao que é apresentado na célula BeWo. Acreditamos que a maior expressão desses genes da resposta imune inata pode estar correlacionada com a menor carga viral observada em células JEG-3 em comparação com a BeWo.

Como demonstrado após infecção com vírus Zika, trofoblastos normalmente expressam grandes quantidades de IFN- λ que pode conferir um efeito antiviral autócrino nessas células (Bayer, 2016). Além disso, os altos níveis de IFN- λ podem ter um efeito antiviral parácrino, que podem contribuir com o controle da replicação viral em células chaves durante a invasão fetal, como células endoteliais e epiteliais. Consistente com isso, observamos uma grande expressão de IFN do tipo III em células JEG-3, que apresentaram título viral menor em comparação a BeWo.

Apesar de mostrarmos que linhagens de células trofoblásticas são susceptíveis a infecção por OROV, devido à complexidade da resposta imuno materna e sua influência no desenvolvimento fetal, estudos com células isoladas da placenta humana a termo ou modelos 3D de cotilédone duplo e perfusão (Villazana-Kretzer, 2022) reforçariam a importância do diagnóstico para OROV em gestantes.

Nossos dados mostram que a deleção parcial do receptor de interferon em camundongos pode restringir a infecção por OROV, mantendo baixos níveis virais até o dia 8, enquanto a ausência completa do receptor de IFN tipo I levou à letalidade no dia 3. Durante a gravidez, embora OROV seja capaz para infectar a placenta e os fetos, isso não afeta o crescimento fetal nem desestabiliza a arquitetura placentária, embora algumas diferenças no tamanho e peso fetal tenham sido observadas e não se possa inferir a ausência de complicações pós-natais. Estes dados complementam descobertas anteriores mostrando que uma deleção completa de *Ifnar* é necessária para que OROV cause infecção produtiva em camundongos e sugerem que a sinalização de *Ifnar1* precisa ser anulada tanto nos compartimentos maternos quanto fetais para que OROV infecte produtivamente e atravesse a interface materno-fetal para produzir resultados na gravidez.

A infecção de linhagens placentárias humanas evidencia a capacidade de transmissão transplacentária do OROV e a importância da resposta imunológica desencadeada durante a infecção. Assim, devido a grande circulação do vírus e surgimento de novas variantes estudos

epidemiológicos devem acompanhar mulheres grávidas infectadas com OROV e não descartar a possibilidade de transmissão fetal principalmente em um cenário em que há imuno comprometimento materno.

7. Conclusão

-Uma deleção completa do *Ifnar* é necessária para que o OROV cause infecção produtiva em camundongos e sugere que a sinalização do *Ifnar1* precisa ser anulada tanto nos compartimentos maternos quanto fetal para induzir resultados na gravidez.

-Não foi detectada haploinsuficiência materna ou fetal para o gene *Ifnar1* nos camundongos infectados por OROV.

-Não foram encontradas diferenças na susceptibilidade viral da prole entre camundongos fêmeas e machos.

- Foi detectado RNA viral por até 8 dias pós infecção nas placentas e fetos infectados por OROV, mas não foi possível detectar partículas virais viáveis nesse contexto.

-Linhagens trofoblásticas humanas são susceptíveis a infecção por OROV e respondem a infecção através da resposta de interferon do tipo I e III.

A abordagem da suscetibilidade ao OROV (e outras infecções por arbovírus) e as respostas teciduais no compartimento fetal da placenta podem ser fundamentais em um grande surto.

8. Referências bibliográficas

- ABUMAREE, M. H. et al. Trophoblast debris modulates the expression of immune proteins in macrophages: a key to maternal tolerance of the fetal allograft? **Journal of Reproductive Immunology**, v. 94, n. 2, p. 131–141, jun. 2012.
- ACRANI, G. O. et al. Apoptosis induced by Oropouche virus infection in HeLa cells is dependent on virus protein expression. **Virus Research**, v. 149, n. 1, p. 56–63, abr. 2010.
- ADAMS, M. J. et al. Changes to taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2017). **Archives of Virology**, v. 162, n. 8, p. 2505–2538, 22 abr. 2017.
- ADAMSON, S. L. et al. Interactions between trophoblast cells and the maternal and fetal circulation in the mouse placenta. **Developmental Biology**, v. 250, n. 2, p. 358–373, 15 out. 2002.
- AGARWAL, A.; PARIDA, M.; DASH, P. K. Impact of transmission cycles and vector competence on global expansion and emergence of arboviruses. **Reviews in Medical Virology**, v. 27, n. 5, p. e1941, 30 ago. 2017.
- 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, 20 set. 2011.
- ALBERS, R. E. et al. Trophoblast-Specific Expression of Hif-1 α Results in Preeclampsia-Like Symptoms and Fetal Growth Restriction. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 26 fev. 2019.
- RODRIGUES, A. H.; DE, E.; IVO, R. Replicação de vírus Oropouche em macrófagos Oropouche virus replication in macrophages. **Ambiência - Revista do Setor de Ciências Agrárias e Ambientais**, v. 3, n. 2, p. 201–210, 1 jan. 2007.
- Alerta epidemiológico -Oropouche na região das Américas - 2 de fevereiro de 2024 - OPAS/OMS | Organização Pan-Americana da Saúde.** Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/documentos/alerta-epidemiologico-oropouche-na-regiao-das-americas-2-fevereiro-2024>>. Acesso em: 24 mar. 2024.
- ALTENBERG, B.; GREULICH, K. O. Genes of glycolysis are ubiquitously overexpressed in 24 cancer classes. **Genomics**, v. 84, n. 6, p. 1014–20, 2004.
- ALTHOUSE, B. M.; HANLEY, K. A. The tortoise or the hare? Impacts of within-host dynamics on transmission success of arthropod-borne viruses. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 370, n. 1675, p. 20140299, 19 ago. 2015.
- ALVAREZ-FALCONI PP; RÍOS RUIZ BA. [Oropouche fever outbreak in Bagazan, San Martin, Peru: epidemiological evaluation, gastrointestinal and hemorrhagic manifestations]. **PubMed**, v. 30, n. 4, p. 334–40, 26 jan. 2011.
- ANAFU, A. A. et al. Interferon-inducible Transmembrane Protein 3 (IFITM3) Restricts Reovirus Cell Entry. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 24, p. 17261–17271, jun. 2013.
- ANDER, S. E.; DIAMOND, M. S.; COYNE, C. B. Immune responses at the maternal-fetal interface. **Science Immunology**, v. 4, n. 31, p. eaat6114, 11 jan. 2019.
- ANDERSEN, P. et al. EGFR induces expression of IRF-1 via STAT1 and STAT3 activation leading to growth arrest of human cancer cells. **International Journal of Cancer**, v. 122, n. 2, p. 342–349, 4 out. 2007.

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, 1 jul. 1961.

ANTONY, F. et al. IFN- λ Regulates Neutrophil Biology to Suppress Inflammation in Herpes Simplex Virus-1–Induced Corneal Immunopathology. **Journal of Immunology**, v. 206, n. 8, p. 1866–1877, 15 abr. 2021.

AQUINO, V. H.; MORELI, M. L.; MORAES FIGUEIREDO, L. T. Analysis of oropouche virus L protein amino acid sequence showed the presence of an additional conserved region that could harbour an important role for the polymerase activity. **Archives of Virology**, v. 148, n. 1, p. 19–28, 1 jan. 2003.

ARAÚJO, R. et al. Alterações ultra- estruturais no fígado de hamster após inoculação experimental com arbovírus Oropouche (tipo BEAN 19991). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 20, p. 45–54, 1978.

ARAÚJO, R. et al. Patogenia das lesões hepáticas na infecção experimental com o vírus Oropouche (BeAn 1991): análise comparativa das curvas virêmica e de infectividade com as alterações ultra-estruturais. **Hileia Medica**, 1 jan. 1979.

ARECHIGA CEBALLOS, N.; AGUILAR SETIEN, A. Alphaviral equine encephalomyelitis (Eastern, Western and Venezuelan). **Revue Scientifique et Technique de l'OIE**, v. 34, n. 2, p. 491–501, 1 ago. 2015.

ARGOLO, A. F. et al. Prevalence and incidence of dengue virus and antibody placental transfer during late pregnancy in central Brazil. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, 31 maio 2013.

Atualização Epidemiológica Dengue, chikungunya e Zika -25 de janeiro de 2023 - OPAS/OMS | Organização Pan-Americana da Saúde. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/documentos/atualizacao-epidemiologica-dengue-chikungunya-e-zika-25-janeiro-2023>>.

AYBAR CA et al. New Records of Culicoides Species (Diptera: Ceratopogonidae) for Bolivia. **Journal of The American Mosquito Control Association**, v. 27, n. 3, p. 306–307, 1 set. 2011.

BALAKRISHNAN, V. S. WHO launches global initiative for arboviral diseases. **The Lancet Microbe**, v. 3, n. 6, p. e407, jun. 2022.

BASTOS, M. DE S. 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, 1 abr. 2012.

BAUD, D. et al. An update on Zika virus infection. **The Lancet**, v. 390, n. 10107, p. 2099–2109, nov. 2017.

BAYER, A. et al. Human trophoblasts confer resistance to viruses implicated in perinatal infection. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 212, n. 1, p. 71.e1–71.e8, 1 jan. 2015.

BAYER, A. et al. Type III Interferons Produced by Human Placental Trophoblasts Confer Protection against Zika Virus Infection. **Cell Host & Microbe**, v. 19, n. 5, p. 705–712, maio 2016.

BENTLIN, M. Perinatal Transmission of Yellow Fever, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 9, p. 1779–1780, set. 2011.

BESNARD, M. et al. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. **Eurosurveillance**, v. 19, n. 13, p. 20751, 3 abr. 2014.

BISWAS, SUBHRA K. Metabolic Reprogramming of Immune Cells in Cancer Progression. **Immunity**, v. 43, n. 3, p. 435–449, set. 2015.

- BORDIGNON, J. et al. Expression profile of interferon stimulated genes in central nervous system of mice infected with dengue virus Type-1. **Virology**, v. 377, n. 2, p. 319–329, 1 ago. 2008.
- BORDT, E. A. et al. Maternal SARS-CoV-2 infection elicits sexually dimorphic placental immune responses. **Science Translational Medicine**, v. 13, n. 617, 27 out. 2021.
- BOWIE, A. G.; UNTERHOLZNER, L. Viral evasion and subversion of pattern-recognition receptor signalling. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 12, p. 911–922, dez. 2008.
- BRADY, O. J. et al. Global temperature constraints on *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* persistence and competence for dengue virus transmission. **Parasites & Vectors**, v. 7, n. 1, p. 338, 2014.
- BRASIL, P. et al. Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. **New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 24, p. 2321–2334, 15 dez. 2016.
- BRATHWAITE DICK, O. et al. The History of Dengue Outbreaks in the Americas. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 87, n. 4, p. 584–593, 3 out. 2012.
- BRAUN, A. E. et al. “Females Are Not Just ‘Protected’ Males”: Sex-Specific Vulnerabilities in Placenta and Brain after Prenatal Immune Disruption. **ENeuro**, v. 6, n. 6, p. ENEURO.0358-19.2019, 14 out. 2019.
- BRICKLE, D. S.; HAGAN, D. V. The Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae) of Belize, Central America. **Insecta Mundi**, v. 13, p. 39–44, 1 mar. 1999.
- BRIESE, T. et al. Batai and Ngari Viruses: M Segment Reassortment and Association with Severe Febrile Disease Outbreaks in East Africa. **Journal of Virology**, v. 80, n. 11, p. 5627–5630, 1 jun. 2006.
- BRINDLEY, M. A. et al. Tyrosine kinase receptor Axl enhances entry of Zaire ebolavirus without direct interactions with the viral glycoprotein. **Virology**, v. 415, n. 2, p. 83–94, jul. 2011.
- BRZOSTEK-RACINE, S. et al. The DNA Damage Response Induces IFN. **Journal of Immunology**, v. 187, n. 10, p. 5336–5345, 15 nov. 2011.
- BURT, F. J. et al. Chikungunya: a re-emerging virus. **The Lancet**, v. 379, n. 9816, p. 662–671, fev. 2012.
- BURTON, G. J.; JAUNIAUX, E. What is the placenta? **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 213, n. 4, Supplement, p. S6.e1–S6.e4, 1 out. 2015.
- CALLAHAN, M. K. et al. Phosphatidylserine on HIV Envelope Is a Cofactor for Infection of Monocytic Cells. **Journal of Immunology**, v. 170, n. 9, p. 4840–4845, 1 maio 2003.
- CALVET, G. et al. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 6, p. 653–660, jun. 2016.
- CAO, Y. et al. PFKFB3-mediated endothelial glycolysis promotes pulmonary hypertension. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 116, n. 27, p. 13394–13403, 18 jun. 2019.
- CAPPELLETTI, M. et al. Type I interferons regulate susceptibility to inflammation-induced preterm birth. **JCI Insight**, v. 2, n. 5, 9 mar. 2017.
- CARAUX, A. et al. Natural killer cell differentiation driven by Tyro3 receptor tyrosine kinases. **Nature Immunology**, v. 7, n. 7, p. 747–754, 4 jun. 2006.
- CARDOSO, B. F. et al. Detection of Oropouche virus segment S in patients and in *Culex quinquefasciatus* in the state of Mato Grosso, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 6, p. 745–754, set. 2015.

- CHARLIER, C. et al. Arboviruses and pregnancy: maternal, fetal, and neonatal effects. **The Lancet Child & Adolescent Health**, v. 1, n. 2, p. 134–146, out. 2017.
- CHATTERJEE, A. et al. Severe Intrauterine Herpes Simplex Disease with Placentitis in a Newborn of a Mother with Recurrent Genital Infection at Delivery. **Journal of Perinatology**, v. 21, n. 8, p. 559–564, 1 dez. 2001.
- CHATURVEDI, U. C. et al. Transplacental Infection with Japanese Encephalitis Virus. **Journal of Infectious Diseases**, v. 141, n. 6, p. 712–715, 1 jun. 1980.
- CHAVEZ, R.; COLAN, E.; PHILIPS, I. Fiebre de Oropouche em Iquitos: reporte preliminar de 5 casos. **Revista de Farmacologia y Terapeutica**, v. 1, p. 12–14, 1992.
- CHEN, Q. et al. Metabolic reprogramming by Zika virus provokes inflammation in human placenta. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 2967, 11 jun. 2020.
- CHEN, X. et al. Salidroside ameliorated hypoxia-induced tumorigenesis of BxPC-3 cells via downregulating hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α and LOXL2. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 121, n. 1, p. 165–173, 4 jun. 2019.
- CHUA, B. A. et al. Roles of phosphatidylserine exposed on the viral envelope and cell membrane in HIV-1 replication. **Cell Communication and Signaling : CCS**, v. 17, 21 out. 2019.
- CNN, D. **Rio de Janeiro registra primeiro caso de Febre Oropouche**. Disponível em: <<https://www.cnnbrasil.com.br/saude/rio-de-janeiro-registra-primeiro-caso-de-febre-oropouche/>>. Acesso em: 24 mar. 2024.
- COPPS, S. C.; GIDDINGS, L. E. Transplacental transmission of western equine encephalitis; report of a case. **PubMed**, v. 24, n. 1, p. 31–3, 1 jul. 1959.
- COSTARD, S. et al. Epidemiology of African swine fever virus. **Virus Research**, v. 173, n. 1, p. 191–197, abr. 2013.
- 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, 15 fev. 2008.
- COUTO-LIMA, D. et al. Potential risk of re-emergence of urban transmission of Yellow Fever virus in Brazil facilitated by competent Aedes populations. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 7 jul. 2017.
- CUGOLA, F. R. et al. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. **Nature**, v. 534, n. 7606, p. 267–71, 2019.
- CULQUICHICÓN, C. et al. Bibliometric analysis of Oropouche research: impact on the surveillance of emerging arboviruses in Latin America. **F1000Research**, v. 6, p. 194, 28 fev. 2017.
- DA COSTA, V. G. et al. Silent emergence of Mayaro and Oropouche viruses in humans in Central Brazil. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 62, p. 84–85, set. 2017.
- DAS, A. et al. Transcriptome sequencing reveals that LPS-triggered transcriptional responses in established microglia BV2 cell lines are poorly representative of primary microglia. **Journal of Neuroinflammation**, v. 13, n. 1, 11 jul. 2016.
- DE ALMEIDA, L. A. et al. MyD88 and STING Signaling Pathways Are Required for IRF3-Mediated IFN- β Induction in Response to Brucella abortus Infection. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, p. e23135, 2 ago. 2011.
- DE OLIVEIRA, E. et al. IFN- α as a time-sensitive biomarker during Oropouche virus infection in early and late seroconverters. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 29 nov. 2019.

- DEGUINE, J.; BARTON, G. M. MyD88: a central player in innate immune signaling. **F1000Prime Reports**, v. 6, 4 nov. 2014.
- DELORME-AXFORD, E. et al. Human placental trophoblasts confer viral resistance to recipient cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 29, p. 12048–12053, jul. 2013.
- DIAGNE, C. T. et al. Mayaro Virus Pathogenesis and Transmission Mechanisms. **Pathogens**, v. 9, n. 9, p. 738, 8 set. 2020.
- DRWAL, E.; RAK, A.; GREGORASZCZUK, E. Co-culture of JEG-3, BeWo and syncBeWo cell lines with adrenal H295R cell line: an alternative model for examining endocrine and metabolic properties of the fetoplacental unit. **Cytotechnology**, v. 70, n. 1, p. 285–297, 30 set. 2017.
- ELBADRY, M. A. et al. Orthobunyaviruses in the Caribbean: Melao and Oropouche virus infections in school children in Haiti in 2014. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 6, p. e0009494–e0009494, 16 jun. 2021.
- ELLIOTT, R. M. Orthobunyaviruses: recent genetic and structural insights. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 10, p. 673–685, 8 set. 2014.
- ELMORE, S. A. et al. Histology Atlas of the Developing Mouse Placenta. **Toxicologic pathology**, v. 50, n. 1, p. 60–117, 1 jan. 2022.
- ERGONUL et al. Pregnancy and Crimean-Congo haemorrhagic fever. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 16, n. 6, p. 647–650, 1 jun. 2010.
- FADOK, V. et al. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. **Journal of Immunology**, v. 148, n. 7, p. 2207–16, 1992.
- FIGUEIREDO, L. T. M. Emergent arboviruses in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 2, p. 224–229, abr. 2007.
- FIGUEIREDO, M. L. G. DE; FIGUEIREDO, L. T. M. Review on Infections of the Central Nervous System by St. Louis Encephalitis, Rocio and West Nile Flaviviruses in Brazil, 2004-2014. **Advances in Microbiology**, v. 04, n. 13, p. 955–961, 2014a.
- FIGUEIREDO, M. L. G. DE; FIGUEIREDO, L. T. M. Emerging alphaviruses in the Americas: Chikungunya and Mayaro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 6, p. 677–683, dez. 2014b.
- FILES, M. A. et al. Baseline mapping of Oropouche virology, epidemiology, therapeutics, and vaccine research and development. **npj Vaccines**, v. 7, n. 1, 17 mar. 2022.
- FLEMMING, A. Foetal sex affects maternal and placental immune responses to SARS-CoV-2. **Nature Reviews Immunology**, 5 nov. 2021.
- FORSHEY, B. M. et al. Arboviral Etiologies of Acute Febrile Illnesses in Western South America, 2000–2007. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 8, 10 ago. 2010.
- FREEMAN, G. J. et al. TIMgenes: a family of cell surface phosphatidylserine receptors that regulate innate and adaptive immunity. **Immunological Reviews**, v. 235, n. 1, p. 172–189, 28 abr. 2010.
- FRIAS-STACHELI, N. et al. Ovarian Tumor Domain-Containing Viral Proteases Evade Ubiquitin- and ISG15-Dependent Innate Immune Responses. **Cell Host & Microbe**, v. 2, n. 6, p. 404–416, dez. 2007.
- FRITEL, X. et al. Chikungunya Virus Infection during Pregnancy, Réunion, France, 2006. **Emerging**

Infectious Diseases, v. 16, n. 3, p. 418–425, mar. 2010.

GALANI, I. E. et al. Interferon- λ Mediates Non-redundant Front-Line Antiviral Protection against Influenza Virus Infection without Compromising Host Fitness. **Immunity**, v. 46, n. 5, p. 875–890.e6, maio 2017.

GARIGLIANY, M.-M. et al. Schmallerberg virus: A new Shamonda/Sathuperi-like virus on the rise in Europe. **Antiviral Research**, v. 95, n. 2, p. 82–87, ago. 2012.

GÉRARDIN, P. et al. Multidisciplinary Prospective Study of Mother-to-Child Chikungunya Virus Infections on the Island of La Réunion. **PLoS Medicine**, v. 5, n. 3, p. e60, 18 mar. 2008.

GIRARD, S. et al. IL-1 receptor antagonist protects against placental and neurodevelopmental defects induced by maternal inflammation. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 184, n. 7, p. 3997–4005, 1 abr. 2010.

GOMEZ, L. M. et al. Placental infection with human papillomavirus is associated with spontaneous preterm delivery. **Human Reproduction**, v. 23, n. 3, p. 709–715, 1 mar. 2008.

GUBLER, D. J. Human Arbovirus Infections Worldwide. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 951, n. 1, p. 13–24, 25 jan. 2006.

GUBLER, D. J. The changing epidemiology of yellow fever and dengue, 1900 to 2003: full circle? **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p. 319–330, set. 2004.

GUIMOND, M.-J.; WANG, B.; CROY, B. A. Engraftment of Bone Marrow from Severe Combined Immunodeficient (SCID) Mice Reverses the Reproductive Deficits in Natural Killer Cell-deficient tg ϵ 26 Mice. **Journal of Experimental Medicine**, v. 187, n. 2, p. 217–223, 19 jan. 1998.

GULTICE, A. D.; KULKARNI-DATAR, K.; BROWN, T. L. Hypoxia-Inducible Factor 1 α (HIF1A) Mediates Distinct Steps of Rat Trophoblast Differentiation in Gradient Oxygen1. **Biology of Reproduction**, v. 80, n. 1, p. 184–193, 1 jan. 2009.

GUPTA, A.; RATH, P. C. Expression of mRNA and protein–protein interaction of the antiviral endoribonuclease RNase L in mouse spleen. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 69, p. 307–318, ago. 2014.

GUTIERREZ, B. et al. Evolutionary Dynamics of Oropouche Virus in South America. **Journal of Virology**, v. 94, n. 5, 14 fev. 2020.

HALLIDAY, R. Prenatal and postnatal transmission of passive immunity to young rats. **Proceedings of the Royal Society of London**, v. 144, n. 916, p. 427–430, 29 nov. 1955.

HARPER, M. S. et al. Interferon- α Subtypes in an Ex Vivo Model of Acute HIV-1 Infection: Expression, Potency and Effector Mechanisms. **PLoS pathogens**, v. 11, n. 11, p. e1005254, 2015.

HAYES, J. M. et al. RISK FACTORS FOR INFECTION DURING A SEVERE DENGUE OUTBREAK IN EL SALVADOR IN 2000. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 69, n. 6, p. 629–633, 1 dez. 2003.

HOFFMANN, B. et al. Novel Orthobunyavirus in Cattle, Europe, 2011. **Emerging Infectious Diseases**, v. 18, n. 3, p. 469–472, mar. 2012.

HOFMANN, A. P.; GERBER, S. A.; CROY, B. A. Uterine natural killer cells pace early development of mouse decidua basalis. **Molecular Human Reproduction**, v. 20, n. 1, p. 66–76, 1 set. 2013.

- HONG, Y. et al. Innate immune evasion by hepatitis B virus-mediated downregulation of TRIF. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 463, n. 4, p. 719–725, 7 ago. 2015.
- HUANG, Y. et al. Microglia use TAM receptors to detect and engulf amyloid beta plaques. **Nature immunology**, v. 22, n. 5, p. 586–594, 1 maio 2021.
- IMAIZUMI, T. et al. ISG54 and ISG56 are induced by TLR3 signaling in U373MG human astrocytoma cells: Possible involvement in CXCL10 expression. **Neuroscience Research**, v. 84, p. 34–42, 1 jul. 2014.
- ISNARDI, I. et al. IRAK-4- and MyD88-Dependent Pathways Are Essential for the Removal of Developing Autoreactive B Cells in Humans. **Immunity**, v. 29, n. 5, p. 746–757, 14 nov. 2008.
- IVASHKIV, L. B.; DONLIN, L. T. Regulation of type I interferon responses. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, n. 1, p. 36–49, 23 dez. 2013.
- IYER, N. V. et al. Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1alpha. **Genes & Development**, v. 12, n. 2, p. 149–162, 15 jan. 1998.
- JACOBS, J. L. et al. Regulation of Mitochondrial Antiviral Signaling (MAVS) Expression and Signaling by the Mitochondria-associated Endoplasmic Reticulum Membrane (MAM) Protein Gp78. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 3, p. 1604–1616, jan. 2014.
- JEAN PAUL CARRERA et al. Eastern Equine Encephalitis in Latin America. **The New England Journal of Medicine**, v. 369, n. 8, p. 732–744, 22 ago. 2013.
- JEMIELITY, S. et al. TIM-family Proteins Promote Infection of Multiple Enveloped Viruses through Virion-associated Phosphatidylserine. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 3, 28 mar. 2013.
- JIANG, H. et al. PFKFB3-Driven Macrophage Glycolytic Metabolism Is a Crucial Component of Innate Antiviral Defense. **The Journal of Immunology**, v. 197, n. 7, p. 2880–2890, 26 ago. 2016.
- JUSTINES, G.; SUCRE, H.; ALVAREZ, O. Transplacental Transmission of Venezuelan Equine Encephalitis Virus in Horses *. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 29, n. 4, p. 653–656, 1 jul. 1980.
- KARABATSOS, N. Supplement to International Catalogue of Arboviruses Including Certain Other Viruses of Vertebrates. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 27, n. 2_Part_2, p. 372–372, 1 mar. 1978.
- KETKAR, H.; HERMAN, D.; WANG, P. Genetic Determinants of the Re-Emergence of Arboviral Diseases. **Viruses**, v. 11, n. 2, p. 150, 12 fev. 2019.
- KHAIKOV, M. R. et al. Respiratory virus induction of alpha-, beta- and lambda-interferons in bronchial epithelial cells and peripheral blood mononuclear cells. **Allergy**, v. 64, n. 3, p. 375–386, mar. 2009.
- KHOROOSHI, R.; OWENS, T. Injury-Induced Type I IFN Signaling Regulates Inflammatory Responses in the Central Nervous System. **The Journal of Immunology**, v. 185, n. 2, p. 1258–1264, 18 jun. 2010.
- KIM, J. et al. FcRn in the Yolk Sac Endoderm of Mouse Is Required for IgG Transport to Fetus. **Journal of Immunology**, v. 182, n. 5, p. 2583–2589, 1 mar. 2009.
- KOKKINOPOULOS, I.; JORDAN, W. J.; RITTER, M. A. Toll-like receptor mRNA expression patterns in human dendritic cells and monocytes. **Molecular Immunology**, v. 42, n. 8, p. 957–968, maio 2005.
- KOURTIS, A. P.; READ, J. S.; JAMIESON, D. J. Pregnancy and Infection. **New England Journal of Medicine**, v. 370, n. 23, p. 2211–2218, 5 jun. 2014.

- KWAN, M. et al. Dynamic changes in maternal decidual leukocyte populations from first to second trimester gestation. **Placenta**, v. 35, n. 12, p. 1027–1034, dez. 2014.
- KWON, J.-Y.; ROMERO, R.; MOR, G. New Insights into the Relationship between Viral Infection and Pregnancy Complications. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 71, n. 5, p. 387–390, 7 abr. 2014.
- LADNER, J. T. et al. Genomic and phylogenetic characterization of viruses included in the Manzanilla and Oropouche species complexes of the genus Orthobunyavirus, family Bunyaviridae. **Journal of General Virology**, v. 95, n. 5, p. 1055–1066, 1 maio 2014.
- LAMBERSON, C.; PAPPAS, C. D.; PAPPAS, L. G. Pupal Taxonomy of the Tree-Hole Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae) in Eastern North America. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 85, n. 2, p. 111–120, 1 mar. 1992.
- LAZEAR, H. M. et al. Interferon- λ restricts West Nile virus neuroinvasion by tightening the blood-brain barrier. **Science Translational Medicine**, v. 7, n. 284, 22 abr. 2015.
- LEDNICKY, J. et al. Mayaro Virus in Child with Acute Febrile Illness, Haiti, 2015. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 11, p. 2000–2002, nov. 2016.
- LEE, C. Q. E. et al. What Is Trophoblast? A Combination of Criteria Define Human First-Trimester Trophoblast. **Stem Cell Reports**, v. 6, n. 2, p. 257–272, fev. 2016.
- LI, K. et al. Activation of Cyclic Adenosine Monophosphate Pathway Increases the Sensitivity of Cancer Cells to the Oncolytic Virus M1. **Molecular Therapy**, v. 24, n. 1, p. 156–165, 1 jan. 2016.
- LOPES, N.; NOZAWA, C.; LINHARES, R. E. C. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 5, n. 3, fev. 2014.
- LU, Q. Homeostatic Regulation of the Immune System by Receptor Tyrosine Kinases of the Tyro 3 Family. **Science**, v. 293, n. 5528, p. 306–311, 13 jul. 2001.
- LUO, W. et al. Pyruvate Kinase M2 Is a PHD3-Stimulated Coactivator for Hypoxia-Inducible Factor 1. **Cell**, v. 145, n. 5, p. 732–744, maio 2011.
- MACKAY, I. M.; ARDEN, K. E. Mayaro virus: a forest virus primed for a trip to the city? **Microbes and Infection**, v. 18, n. 12, p. 724–734, dez. 2016.
- MALASSINE, A.; FRENDO, J. - L.; EVAIN-BRION, D. A comparison of placental development and endocrine functions between the human and mouse model. **Human Reproduction Update**, v. 9, n. 6, p. 531–539, 1 nov. 2003.
- MALTEPE, E.; FISHER, S. J. Placenta: the forgotten organ. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 31, p. 523–552, 2015.
- MARTIN, E. et al. Culicoides species community composition and infection status with parasites in an urban environment of east central Texas, USA. **Parasites & Vectors**, v. 12, n. 1, 16 jan. 2019.
- MCGREGOR, B. L.; CONNELLY, C. R.; KENNEY, J. L. Infection, Dissemination, and Transmission Potential of North American *Culex quinquefasciatus*, *Culex tarsalis*, and *Culicoides sonorensis* for Oropouche Virus. **Viruses**, v. 13, n. 2, p. 226, 2 fev. 2021.
- MCMILLEN, C. M. et al. Rift Valley fever virus induces fetal demise in Sprague-Dawley rats through direct placental infection. **Science Advances**, v. 4, n. 12, 7 dez. 2018.

- MEERTENS, L. et al. The TIM and TAM families of phosphatidylserine receptors mediate dengue virus entry. **Cell Host & Microbe**, v. 12, n. 4, p. 544–557, 18 out. 2012.
- MELLOR, P. S.; BOORMAN, J.; BAYLIS, M. Culicoides Biting Midges: Their Role as Arbovirus Vectors. **Annual Review of Entomology**, v. 45, n. 1, p. 307–340, jan. 2000.
- MERCER, D. R. et al. Biting Rates and Developmental Substrates for Biting Midges (Diptera: Ceratopogonidae) in Iquitos, Peru. **Journal of Medical Entomology**, v. 40, n. 6, p. 807–812, 1 nov. 2003.
- MICKE, P. et al. Biobanking of fresh frozen tissue: RNA is stable in nonfixed surgical specimens. **Laboratory Investigation**, v. 86, n. 2, p. 202–211, 9 jan. 2006.
- MONTEL-HAGEN, A. et al. Erythrocyte Glut1 Triggers Dehydroascorbic Acid Uptake in Mammals Unable to Synthesize Vitamin C. **Cell**, v. 132, n. 6, p. 1039–1048, mar. 2008.
- MORIZONO, K. et al. The Soluble Serum Protein Gas6 Bridges Virion Envelope Phosphatidylserine to the TAM Receptor Tyrosine Kinase Axl to Mediate Viral Entry. **Cell Host & Microbe**, v. 9, n. 4, p. 286–298, abr. 2011.
- MOURÃO, M. P. G. et al. Oropouche Fever Outbreak, Manaus, Brazil, 2007–2008. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 12, p. 2063–2064, dez. 2009.
- MUSSO, D. et al. Unexpected outbreaks of arbovirus infections: lessons learned from the Pacific and tropical America. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 11, p. e355–e361, nov. 2018.
- MUSSO, D.; GUBLER, D. J. Zika Virus. **Clinical microbiology reviews**, v. 29, n. 3, p. 487–524, 2016.
- NAVARRO, J.-C. et al. Isolation of Madre de Dios Virus (Orthobunyavirus; Bunyaviridae), an Oropouche Virus Species Reassortant, from a Monkey in Venezuela. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 2, p. 328–338, 3 ago. 2016.
- NAVECA, F. G.; BELLO, G. **Emergence of a novel reassortant Oropouche virus drives persistent outbreaks in the Brazilian Amazon region from 2022 to 2024**. Disponível em: <<https://virological.org/t/emergence-of-a-novel-reassortant-oropouche-virus-drives-persistent-outbreaks-in-the-brazilian-amazon-region-from-2022-to-2024/955>>. Acesso em: 24 mar. 2024.
- NOHA MOUSAAD ELEMAM; TALAAT, I. M.; MAGHAZACHI, A. A. CXCL10 Chemokine: A Critical Player in RNA and DNA Viral Infections. **Viruses**, v. 14, n. 11, p. 2445–2445, 3 nov. 2022.
- NUMASAKI, M. et al. IL-28 Elicits Antitumor Responses against Murine Fibrosarcoma. **Journal of Immunology**, v. 178, n. 8, p. 5086–5098, 15 abr. 2007.
- NUNES, M. R. T. et al. Oropouche Virus Isolation, Southeast Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 10, p. 1610–1613, out. 2005.
- OIDTMAN, R. J.; ESPAÑA, G.; PERKINS, T. A. Co-circulation and misdiagnosis led to underestimation of the 2015–2017 Zika epidemic in the Americas. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 3, p. e0009208, 1 mar. 2021.
- OKAMOTO, M. et al. IPS-1 Is Essential for Type III IFN Production by Hepatocytes and Dendritic Cells in Response to Hepatitis C Virus Infection. **Journal of Immunology**, v. 192, n. 6, p. 2770–2777, 15 mar. 2014.
- ORENDI, K. et al. The choriocarcinoma cell line BeWo: syncytial fusion and expression of syncytium-specific proteins. **Reproduction**, v. 140, n. 5, p. 759–766, nov. 2010.

Oropouche virus disease - French Guiana, France. Disponível em: <<https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/oropouche-virus-disease---french-guiana-france>>.

ORTIZ-MARTÍNEZ, Y.; PATIÑO-BARBOSA, A. M.; RODRIGUEZ-MORALES, A. J. Yellow fever in the Americas: the growing concern about new epidemics. **F1000Research**, v. 6, p. 398, 25 abr. 2017.

OSHIUMI, H. et al. 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, dez. 2010.

PAIXÃO, E. S. et al. Dengue during pregnancy and adverse fetal outcomes: a systematic review and meta-analysis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 16, n. 7, p. 857–865, jul. 2016.

PAPPAS, L. G.; MOYER, S.; PAPPAS, C. D. Tree hole Culicoides (Diptera: Ceratopogonidae) of the Central Plains in the United States. **PubMed**, v. 7, n. 4, p. 624–7, 1 dez. 1991.

PATTERSON, J. L.; HOLLOWAY, B.; D KOLAKOFSKY. La Crosse virions contain a primer-stimulated RNA polymerase and a methylated cap-dependent endonuclease. **Journal of Virology**, v. 52, n. 1, p. 215–222, 1 out. 1984.

PERROT, I. et al. TLR3 and Rig-Like Receptor on Myeloid Dendritic Cells and Rig-Like Receptor on Human NK Cells Are Both Mandatory for Production of IFN- γ in Response to Double-Stranded RNA. **Journal of Immunology**, v. 185, n. 4, p. 2080–2088, 15 ago. 2010.

PERRY, A. K. et al. The host type I interferon response to viral and bacterial infections. **Cell Research**, v. 15, n. 6, p. 407–422, jun. 2005.

PIACENTINI, M.; AUTUORI, F. Immunohistochemical localization of tissue transglutaminase and Bcl-2 in rat uterine tissues during embryo implantation and post-partum involution. **Differentiation**, v. 57, n. 1, p. 51–61, jun. 1994.

PIJNENBORG, R.; VERCRUYSSSE, L.; HANSENS, M. The Uterine Spiral Arteries In Human Pregnancy: Facts and Controversies. **Placenta**, v. 27, n. 9-10, p. 939–958, set. 2006.

PINHEIRO, F. et al. Oropouche virus. I. A review of clinical, epidemiological, and ecological findings. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 30, p. 149–160, 1981.

PINHEIRO, F. et al. Oropouche fever. In: **Textbook of Pediatric Infectious Diseases**. [s.l.] W.B. Saunders, 2004.

PINHEIRO, F.; TRAVASSOS DA ROSA, A. Arboviral Zoonoses of Central and South America. In: **Handbook of Zoonoses Section B: Viral Zoonoses**. [s.l.] CRC Press, 1994.

PINHEIRO, F.; TRAVASSOS DA ROSA, A.; VASCONCELOS, P. In: **Feigin and Cherry's textbook of pediatric infectious diseases**. [s.l.] Saunders, 2014.

PINTO, A. K. et al. Human and Murine IFIT1 Proteins Do Not Restrict Infection of Negative-Sense RNA Viruses of the Orthomyxoviridae, Bunyaviridae, and Filoviridae Families. **Journal of Virology**, v. 89, n. 18, p. 9465–9476, 8 jul. 2015.

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, 25 fev. 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, jan. 2016.

Protocol 27369 - Ifnar1. Disponível em: <https://www.jax.org/Protocol?stockNumber=028256&protocolID=27369>. Acesso em: 24 mar. 2024.

PURSE, B. V. et al. Bionomics of Temperate and Tropical Culicoides Midges: Knowledge Gaps and Consequences for Transmission of Culicoides-Borne Viruses. **Annual Review of Entomology**, v. 60, n. 1, p. 373–392, 7 jan. 2015.

QU, D. et al. Layer-Enriched Tissue Dissection of the Mouse Placenta in Late Gestation. In: **The Guide to Investigation of Mouse Pregnancy**. [s.l.] Academic Press, 2014.

RA, C.; IS, H.; TW, M. Re: Regulation of Cancer Cell Metabolism. **Journal of Urological Surgery**, p. 222–222, 27 dez. 2017.

RACICOT, K. et al. Cutting Edge: Fetal/Placental Type I IFN Can Affect Maternal Survival and Fetal Viral Load during Viral Infection. **The Journal of Immunology**, v. 198, n. 8, p. 3029–3032, 6 mar. 2017.

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, 1 jan. 2008.

REDMAN, C. W. G.; SARGENT, I. L. Placental Stress and Pre-eclampsia: A Revised View. **Placenta**, v. 30, p. 38–42, mar. 2009.

REIMER, T.; SCHWEIZER, M.; JUNGI, T. W. Type I IFN Induction in Response to *Listeria monocytogenes* in Human Macrophages: Evidence for a Differential Activation of IFN Regulatory Factor 3 (IRF3). **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 2, p. 1166–1177, 3 jul. 2007.

REIS, A. S. et al. Inflammasome activation and IL-1 signaling during placental malaria induce poor pregnancy outcomes. **Science Advances**, v. 6, n. 10, 6 mar. 2020.

RIBEIRO AMORIM, M 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**, v. 12, n. 7, p. 785–785, 21 jul. 2020.

ROBERTS, D. et al. Vectors and natural reservoirs of Oropouche virus in the Amazon region. **US Army Medical Research and Development Command, Washington, DC**, 1977.

RODRIGUES, A. H. et al. Oropouche virus experimental infection in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). **Virus Research**, v. 155, n. 1, p. 35–41, jan. 2011.

ROMERO-ALVAREZ, D.; ESCOBAR, L. E. Oropouche fever, an emergent disease from the Americas. **Microbes and Infection**, v. 20, n. 3, p. 135–146, mar. 2018.

ROSSETTO, E. V.; ANGERAMI, R. N.; LUNA, E. J. DE A. What to expect from the 2017 yellow fever outbreak in Brazil? **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 59, n. 0, 2017.

ROTHLIN, C. V. et al. TAM Receptors Are Pleiotropic Inhibitors of the Innate Immune Response. **Cell**, v. 131, n. 6, p. 1124–1136, dez. 2007.

ROWE, J. H. et al. Pregnancy imprints regulatory memory that sustains anergy to fetal antigen. **Nature**, v. 490, n. 7418, p. 102–106, 26 set. 2012.

SAEED, M. F. et al. Nucleotide sequences and phylogeny of the nucleocapsid gene of Oropouche virus. **Journal of General Virology**, v. 81, n. 3, p. 743–748, 1 mar. 2000.

- SAEED, M. F. et al. Jatobal virus is a reassortant containing the small RNA of Oropouche virus. **Virus Research**, v. 77, n. 1, p. 25–30, ago. 2001.
- SAHA, S. et al. Identification of Japanese encephalitis virus-inducible genes in mouse brain and characterization of GARG39/IFIT2 as a microtubule-associated protein. **Journal of General Virology**, v. 87, n. 11, p. 3285–3289, 1 nov. 2006.
- SAHU, U. et al. Interleukin-17—A multifaceted cytokine in viral infections. **Journal of Cellular Physiology**, v. 236, n. 12, p. 8000–8019, 16 jun. 2021.
- SANTER, D. M. et al. A novel method for detection of IFN-lambda 3 binding to cells for quantifying IFN-lambda receptor expression. **Journal of Immunological Methods**, v. 445, p. 15–22, jun. 2017.
- SANTOS, R. et al. Spread of Oropouche Virus into the Central Nervous System in Mouse. **Viruses**, v. 6, n. 10, p. 3827–3836, 10 out. 2014.
- SANTOS, R. I. et al. Experimental infection of suckling mice by subcutaneous inoculation with Oropouche virus. **Virus Research**, v. 170, n. 1-2, p. 25–33, dez. 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, dez. 2008.
- SAVILL, J. et al. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 12, p. 965–975, dez. 2002.
- SCHAEFER, T. M. et al. Toll-like receptor (TLR) expression and TLR-mediated cytokine/chemokine production by human uterine epithelial cells. **Immunology**, v. 112, n. 3, p. 428–436, jul. 2004.
- SCHMALJOHN, C.; NICHOL, S. Bunyaviridae. In: **Fields virology**. [s.l.] Philadelphia, 2007.
- SCHÖBEL, A.; RÖSCH, K.; HERKER, E. Functional innate immunity restricts Hepatitis C Virus infection in induced pluripotent stem cell-derived hepatocytes. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 1 mar. 2018.
- SEMENZA, G. L. et al. Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 38, p. 23757–23763, set. 1994.
- SEMENZA, G. L. Targeting HIF-1 for cancer therapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 10, p. 721–732, dez. 2003.
- SHAO, W. et al. Double-stranded RNA innate immune response activation from long-term adeno-associated virus vector transduction. **JCI Insight**, v. 3, n. 12, 21 jun. 2018.
- SHIMOJIMA, M. et al. Tyro3 Family-Mediated Cell Entry of Ebola and Marburg Viruses. **Journal of Virology**, v. 80, n. 20, p. 10109–10116, 15 out. 2006.
- SHIMOJIMA, M.; IKEDA, Y.; KAWAOKA, Y. The Mechanism of Axl-Mediated Ebola Virus Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 196, n. s2, p. S259–S263, 15 nov. 2007.
- SHINEFIELD, H. R.; TOWNSEND, T. E. Transplacental transmission of western equine encephalomyelitis. **The Journal of Pediatrics**, v. 43, n. 1, p. 21–25, 1 jul. 1953.
- SHOPE, R.; MEEGAN, J. Arboviruses. In: **Viral Infections of Humans**. [s.l.] New York: Springer Science+Business Media, 1997.
- SILVA, J. R. et al. A Saint Louis encephalitis and Rocio virus serosurvey in Brazilian horses. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, n. 4, p. 414–417, ago. 2014.

- SILVA-FILHO, J. L. et al. Gas6 drives Zika virus-induced neurological complications in humans and congenital syndrome in immunocompetent mice. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 97, p. 260–274, 1 out. 2021.
- SIROIS, P. A. et al. Developmental outcomes in young children born to mothers with west nile illness during pregnancy. **Birth Defects Research**, v. 100, n. 10, p. 792–796, 5 set. 2014.
- SMITH GC; FRANCY DB. Laboratory studies of a Brazilian strain of *Aedes albopictus* as a potential vector of Mayaro and Oropouche viruses. **PubMed**, v. 7, n. 1, p. 89–93, 1 mar. 1991.
- SMITH, K. E. et al. MONITORING OF CULICOIDES SPP. AT A SITE ENZOOTIC FOR HEMORRHAGIC DISEASE IN WHITE-TAILED DEER IN GEORGIA, USA. **Journal of Wildlife Diseases**, v. 32, n. 4, p. 627–642, 1 out. 1996.
- SOMMEREYNS, C. et al. IFN-Lambda (IFN- λ) Is Expressed in a Tissue-Dependent Fashion and Primarily Acts on Epithelial Cells In Vivo. **PLoS Pathogens**, v. 4, n. 3, p. e1000017, 14 mar. 2008.
- SONG, Y. et al. Inhibition of lactate dehydrogenase A suppresses inflammatory response in RAW 264.7 macrophages. **Molecular Medicine Reports**, 20 nov. 2018.
- SUN, J.; ZHAO, Y.; HU, J. Curcumin Inhibits Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Inflammation by Inhibiting IL-1beta and IL-6 Production in Mice. **PLoS ONE**, v. 8, n. 6, p. e67078, 25 jun. 2013.
- TABACHNICK, W. J. Climate Change and the Arboviruses: Lessons from the Evolution of the Dengue and Yellow Fever Viruses. **Annual Review of Virology**, v. 3, n. 1, p. 125–145, 29 set. 2016.
- 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. 243–249, 1 mar. 2005.
- TARLINTON, R. et al. The challenge of Schmallenberg virus emergence in Europe. **The Veterinary Journal**, v. 194, n. 1, p. 10–18, out. 2012.
- THEILER, M.; DOWNS, W. G. **The Arthropod-borne Viruses of Vertebrates**. [s.l.] Yale University Press, 1973.
- TILSTON-LUNEL, N. L. et al. Generation of Recombinant Oropouche Viruses Lacking the Nonstructural Protein NSm or NSs. **Journal of Virology**, v. 90, n. 5, p. 2616–2627, mar. 2016.
- TOLEDO-TEIXEIRA, D. et al. B cells require MyD88 signalling to generate antibody responses that prevent Oropouche virus-induced neurological disease in mice. **eBioMedicine**, v. Em submissão, 2024.
- TRAVASSOS DA ROSA, J. F. T. et al. Oropouche Virus: Clinical, Epidemiological, and Molecular Aspects of a Neglected Orthobunyavirus. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, p. 16-0672, 6 fev. 2017.
- TRUS, I. et al. Subclinical in utero Zika virus infection is associated with interferon alpha sequelae and sex-specific molecular brain pathology in asymptomatic porcine offspring. **PLOS Pathogens**, v. 15, n. 11, p. e1008038–e1008038, 14 nov. 2019.
- UMETSU, S. E. et al. TIM-1 induces T cell activation and inhibits the development of peripheral tolerance. **Nature Immunology**, v. 6, n. 5, p. 447–454, 27 mar. 2005.
- VAN ROEYEN, C. et al. Induction of progressive glomerulonephritis by podocyte-specific overexpression of platelet-derived growth factor-D. **Kidney International**, v. 80, n. 12, p. 1292–1305, 1 dez. 2011.
- VASCONCELOS, H. B. et al. Molecular Epidemiology of Oropouche Virus, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 5, p. 800–806, maio 2011.

- VASILIS OIKONOMOU et al. Noncanonical Fungal Autophagy Inhibits Inflammation in Response to IFN- γ via DAPK1. **Cell Host & Microbe**, v. 20, n. 6, p. 744–757, 1 dez. 2016.
- VERHOVEN, B.; SCHLEGEL, R. A.; WILLIAMSON, P. Mechanisms of phosphatidylserine exposure, a phagocyte recognition signal, on apoptotic T lymphocytes. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 182, n. 5, p. 1597–1601, 1 nov. 1995.
- VILLAZANA-KRETZER, D. L. et al. ZIKV can infect human term placentas in the absence of maternal factors. **Communications Biology**, v. 5, n. 1, 18 mar. 2022.
- WACHER, C. et al. Coordinated Regulation and Widespread Cellular Expression of Interferon-Stimulated Genes (ISG) ISG-49, ISG-54, and ISG-56 in the Central Nervous System after Infection with Distinct Viruses. **Journal of Virology**, v. 81, n. 2, p. 860–871, 1 nov. 2006.
- WACK, A.; TERCZYŃSKA-DYLA, E.; HARTMANN, R. Guarding the frontiers: the biology of type III interferons. **Nature Immunology**, v. 16, n. 8, p. 802–809, 21 jul. 2015.
- WALLS, J. et al. Metabolic but not transcriptional regulation by PKM2 is important for natural killer cell responses. **eLife**, v. 9, 19 ago. 2020.
- WALTON, W.; REISEN, W. Influence of climate change on mosquito development and bloodfeeding patterns. In: **Viral Infections and Global Change**. [s.l.] Hoboken, NJ: Wiley, 2014. p. 35–56.
- WANG, H. et al. Inflammation Activates the Interferon Signaling Pathways in Taste Bud Cells. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 40, p. 10703–10713, 3 out. 2007.
- WARD, PATRICK S.; THOMPSON, CRAIG B. Metabolic Reprogramming: A Cancer Hallmark Even Warburg Did Not Anticipate. **Cancer Cell**, v. 21, n. 3, p. 297–308, mar. 2012.
- WARREN, C. J. et al. The Antiviral Restriction Factors IFITM1, 2 and 3 Do Not Inhibit Infection of Human Papillomavirus, Cytomegalovirus and Adenovirus. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, p. e96579, 14 maio 2014.
- WASAY, M.; KHATRI, I. A.; ABD-ALLAH, F. Arbovirus infections of the nervous system: Current trends and future threats. **Neurology**, v. 84, n. 4, p. 421–423, 27 jan. 2015.
- WATTS, D. M. et al. Oropouche Virus Transmission in the Amazon River Basin of Peru. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 56, n. 2, p. 148–152, 1 fev. 1997.
- WEAVER, S. C. et al. VENEZUELAN EQUINE ENCEPHALITIS. **Annual Review of Entomology**, v. 49, n. 1, p. 141–174, jan. 2004.
- WEAVER, S. C.; LECUIT, M. Chikungunya virus and the global spread of a mosquito-borne disease. **The New England journal of medicine**, v. 372, n. 13, p. 1231–9, 2015.
- WEAVER, S. C.; REISEN, W. K. Present and future arboviral threats. **Antiviral Research**, v. 85, n. 2, p. 328–345, 1 fev. 2010.
- WILLIAMS, P. J. et al. Decidual leucocyte populations in early to late gestation normal human pregnancy. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 82, n. 1, p. 24–31, out. 2009.
- WIRTH, W. W.; FELIPPE-BAUER, M. L. The neotropical biting midges related to *Culicoides paraensis* (Diptera: Ceratopogonidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 84, n. suppl 4, p. 551–565, 1989.
- WOODS, L.; PEREZ-GARCIA, V.; HEMBERGER, M. Regulation of Placental Development and Its Impact on Fetal Growth—New Insights From Mouse Models. **Frontiers in Endocrinology**, v. 9, 27 set. 2018.

- YAMAMOTO, H. et al. The influence of NF- κ B signal-transduction pathways on the murine inner ear by acoustic overstimulation. **Journal of Neuroscience Research**, v. 87, n. 8, p. 1832–1840, 30 jan. 2009.
- YEH, C.-C.; CHAO, K.-C.; HUANG, S. J. Innate Immunity, Decidual Cells, and Preeclampsia. **Reproductive Sciences**, v. 20, n. 4, p. 339–353, 18 jul. 2012.
- YI, B. et al. Nuclear NF- κ B p65 in Peripheral Blood Mononuclear Cells Correlates with Urinary MCP-1, RANTES and the Severity of Type 2 Diabetic Nephropathy. **PLOS ONE**, v. 9, n. 6, p. e99633–e99633, 17 jun. 2014.
- YOCKEY, L. J. et al. Type I interferons instigate fetal demise after Zika virus infection. **Science Immunology**, v. 3, n. 19, 26 jan. 2018.
- YOUNT, J. S. et al. MDA5 Participates in the Detection of Paramyxovirus Infection and Is Essential for the Early Activation of Dendritic Cells in Response to Sendai Virus Defective Interfering Particles. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 7, p. 4910–4918, 19 mar. 2008.
- ZAGÓRSKA et al. Diversification of TAM receptor tyrosine kinase function. **Nature Immunology**, v. 15, n. 10, p. 920–928, 7 set. 2014.
- ZANLUCA, C. et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p. 569–572, 9 jun. 2015.
- ZHANG, X. et al. Neddylation is required for herpes simplex virus type I (HSV-1)-induced early phase interferon-beta production. **Cellular & Molecular Immunology**, v. 13, n. 5, p. 578–583, 11 maio 2015.
- ZHANG, Y. et al. PFKFB3 regulates lipopolysaccharide-induced excessive inflammation and cellular dysfunction in HTR-8/Svneo cells: Implications for the role of PFKFB3 in preeclampsia. **Placenta**, v. 106, p. 67–78, 1 mar. 2021.
- ZHANG, Y.; HANSEN, A.; BI, P. Climate change and vector-borne viral diseases. In: **Viral Infections and Global Change**. [s.l.] Hoboken, NJ: Wiley , 2014. p. 3–20.
- ZHOU, D. et al. Japanese Encephalitis Virus NS1' Protein Antagonizes Interferon Beta Production. **Virologica Sinica/Virologica sinica**, v. 33, n. 6, p. 515–523, 1 dez. 2018.

ANEXO I- ARTIGOS PUBLICADOS NÃO ASSOCIADOS À TESE- 1ª AUTORIA



RESEARCH ARTICLE



SARS-CoV-2 uses CD4 to infect T helper lymphocytes

Natalia S Brunetti^{1†}, Gustavo G Davanzo^{2†}, Diogo de Moraes^{3,4†}, Allan JR Ferrari^{5†}, Gabriela F Souza^{6†}, Stéfanie Primon Muraro^{6†}, Thiago L Knittel^{3†}, Vinicius O Boldrini^{1†}, Lauer B Monteiro^{2†}, João Victor Virgílio-da-Silva^{2†}, Gerson S Profeta^{3‡}, Natália S Wassano^{7‡}, Luana Nunes Santos^{8‡}, Victor C Carregari^{9‡}, Artur HS Dias^{5‡}, Flavio P Veras^{10,11,12}, Lucas A Tavares¹³, Julia Forato⁶, Icaro MS Castro¹⁴, Lícia C Silva-Costa⁹, André C Palma¹⁵, Eli Mansour¹⁵, Raísa G Ulaf¹⁵, Ana F Bernardes¹⁵, Thyago A Nunes¹⁵, Luciana C Ribeiro¹⁵, Marcus V Agrela¹⁵, Maria Luiza Moretti¹⁵, Lucas I Buscaratti⁸, Fernanda Crunfli⁹, Raissa G Ludwig³, Jaqueline A Gerhardt⁷, Natália Munhoz-Alves¹, Ana Maria Marques¹, Renata Sesti-Costa^{1,16}, Mariene R Amorim⁶, Daniel A Toledo-Teixeira⁶, Pierina Lorencini Parise⁶, Matheus Cavalheiro Martini⁶, Karina Bispos-dos-Santos⁶, Camila L Simeoni⁶, Fabiana Granja⁶, Virgínia C Silvestrini¹⁷, Eduardo B de Oliveira¹⁷, Vitor M Faca¹⁷, Murilo Carvalho^{18,19}, Bianca G Castelucci^{18,19}, Alexandre B Pereira¹⁸, Laís D Coimbra¹⁸, Marieli MG Dias¹⁸, Patricia B Rodrigues²⁰, Arilson Bernardo SP Gomes²⁰, Fabricio B Pereira¹⁶, Leonilda MB Santos^{21,22}, Louis-Marie Bloyet²³, Spencer Stumpf²³, Marjorie C Pontelli²³, Sean Whelan²³, Andrei C Sposito²⁴, Robson F Carvalho⁴, André S Vieira²⁵, Marco AR Vinolo^{20,26,27}, André Damasio^{7,26}, Lício Velloso^{15,27}, Ana Carolina M Figueira¹⁸, Luis LP da Silva¹⁰, Thiago Mattar Cunha^{10,12}, Helder I Nakaya¹⁴, Henrique Marques-Souza^{7,8}, Rafael E Marques¹⁸, Daniel Martins-de-Souza^{9,26,28,29}, Munir S Skaf⁵, Jose Luiz Proenca-Modena^{6,26}, Pedro MM Moraes-Vieira^{2,26,27}, Marcelo A Mori^{3,26,27*}, Alessandro S Farias^{1,23,26,27*}

*For correspondence: morima@unicamp.br (MAM); asfarias@unicamp.br (ASF)

†These authors contributed equally to this work

‡These authors also contributed equally to this work

Competing interest: The authors declare that no competing interests exist.

Funding: See page 18

Preprinted: 28 September 2020

Received: 30 November 2022

Accepted: 13 July 2023

Published: 31 July 2023

Reviewing Editor: Frank L van de Veerdonk, Radboud University Nijmegen Medical Centre, Netherlands

© Copyright Brunetti, Davanzo, de Moraes et al. This article is distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use and redistribution provided that the original author and source are credited.

¹Autoimmune Research Laboratory, Department of Genetics, Microbiology and Immunology, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil; ²Laboratory of Immunometabolism, Department of Genetics, Microbiology and Immunology, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil; ³Laboratory of Aging Biology, Department of Biochemistry and Tissue Biology, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil; ⁴Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biosciences, Sao Paulo State University (UNESP), Botucatu, Brazil; ⁵Institute of Chemistry and Center for Computing in Engineering and Sciences, University of Campinas, Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil; ⁶Laboratory of Emerging Viruses, Department of Genetics, Microbiology and Immunology, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil; ⁷Department of Biochemistry and Tissue Biology, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil; ⁸Brazilian Laboratory on Silencing Technologies (BLaST), Department of Biochemistry and Tissue Biology, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil; ⁹Laboratory of Neuroproteomics, Department of Biochemistry and Tissue Biology, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil; ¹⁰Center of Research in Inflammatory Diseases, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil; ¹¹Department of BioMolecular Sciences, School of Pharmaceutical Sciences, University of São

Article

Clusters of SARS-CoV-2 Lineage B.1.1.7 Infection after Vaccination with Adenovirus-Vectored and Inactivated Vaccines

William M. de Souza ^{1,2,†}, Stéfanie P. Muraro ^{3,†}, Gabriela F. Souza ^{3,†}, Mariene R. Amorim ^{3,†}, Renata Sesti-Costa ^{4,5,†}, Luciana S. Mofatto ³, Julia Forato ³, Priscilla P. Barbosa ³, Daniel A. Toledo-Teixeira ³, Karina Bispo-dos-Santos ³, Pierina L. Parise ³, Natalia S. Brunetti ⁶, Joselia C. O. Moreira ⁷, Vitor A. Costa ⁵, Daniela M. Cardozo ⁸, Maria L. Moretti ⁹, Silvia Barros-Mazon ⁸, Gabriela F. Marchesi ¹⁰, Christiane Ambrosio ¹⁰, Fernando R. Spilki ¹¹, Valeria C. Almeida ¹⁰, Andre S. Vieira ⁷, Lair Zambon ⁹, Alessandro S. Farias ^{6,12,13}, Marcelo Addas-Carvalho ⁵, Bruno D. Benites ⁵, Rafael E. Marques ⁴, Ester C. Sabino ^{14,15}, Andrea B. Von Zuben ¹⁰, Scott C. Weaver ^{2,16}, Nuno R. Faria ^{15,17,18}, Fabiana Granja ^{3,19,†}, Rodrigo N. Angerami ^{9,10,†} and José Luiz Proença-Módena ^{3,13,*,†}



Citation: de Souza, W.M.; Muraro, S.P.; Souza, G.F.; Amorim, M.R.; Sesti-Costa, R.; Mofatto, L.S.; Forato, J.; Barbosa, P.P.; Toledo-Teixeira, D.A.; Bispo-dos-Santos, K.; et al. Clusters of SARS-CoV-2 Lineage B.1.1.7 Infection after Vaccination with Adenovirus-Vectored and Inactivated Vaccines. *Viruses* **2021**, *13*, 2127. <https://doi.org/10.3390/v13112127>

Academic Editors:
Luis Martínez-Sobrido and
Fernando Almazan Toral

Received: 11 September 2021
Accepted: 15 October 2021
Published: 22 October 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- ¹ Virology Research Centre, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto 14049-900, Brazil; wmdesouz@utmb.edu
- ² Department of Microbiology and Immunology, University of Texas Medical Branch, Galveston, TX 77555, USA; sweaver@utmb.edu
- ³ Laboratory of Emerging Viruses, Department of Genetics, Microbiology and Immunology, Institute of Biology, University of Campinas, Campinas 13083-862, Brazil; stefaniemuraro@gmail.com (S.P.M.); gabriela.sfabiano@gmail.com (G.F.S.); mariene.ramorim@gmail.com (M.R.A.); luciana.mofatto@gmail.com (L.S.M.); foratojulia@gmail.com (J.F.); priscillapaschoal@hotmail.com (P.P.B.); teixeiradatt@gmail.com (D.A.T.-T.); karina.bsantos@hotmail.com (K.B.-d.-S.); pierinalp@gmail.com (P.L.P.); fabi.granja@yahoo.com.br (F.G.)
- ⁴ Brazilian Biosciences National Laboratory, Brazilian Centre for Research in Energy and Materials, Campinas 13083-100, Brazil; renata.sesti@gmail.com (R.S.-C.); rempsufmg@gmail.com (R.E.M.)
- ⁵ Hematology and Hemotherapy Center, University of Campinas, Campinas 13083-862, Brazil; vitorc@unicamp.br (V.A.C.); maddas@unicamp.br (M.A.-C.); benites@unicamp.br (B.D.B.)
- ⁶ Autoimmune Research Laboratory, Department of Genetics, Microbiology and Immunology, Institute of Biology, University of Campinas, Campinas 13083-862, Brazil; nbrunetti.bio@gmail.com (N.S.B.); asfarias@unicamp.br (A.S.F.)
- ⁷ Department of Structural and Functional Biology, Institute of Biology, University of Campinas, Campinas 13083-862, Brazil; jocris@unicamp.br (J.C.O.M.); vieira.as@gmail.com (A.S.V.)
- ⁸ Department of Clinical Pathology, School of Medical Sciences, University of Campinas, Campinas 13083-862, Brazil; danielamcardozo@hc.unicamp.br (D.M.C.); sbmazon@unicamp.br (S.B.-M.)
- ⁹ Department of Internal Medicine, School of Medical Sciences, University of Campinas, Campinas 13083-862, Brazil; lmoretti@unicamp.br (M.L.M.); lzambon@fcm.unicamp.br (L.Z.); rodrigo.angerami@gmail.com (R.N.A.)
- ¹⁰ Campinas Department of Public Health Surveillance, Campinas 13015-904, Brazil; gabriela.marchesi@campinas.sp.gov.br (G.F.M.); christiane.ambrosio@campinas.sp.gov.br (C.A.); valcalmeida@gmail.com (V.C.A.); andreabrunovonzuben@gmail.com (A.B.V.Z.)
- ¹¹ One Health Laboratory, Feevale University, Novo Hamburgo 93510-235, Brazil; fernandors@feevale.br
- ¹² Obesity and Comorbidities Research Center, University of Campinas, Campinas 13083-862, Brazil
- ¹³ Experimental Medicine Research Cluster, University of Campinas, Campinas 13083-862, Brazil
- ¹⁴ Tropical Medicine Institute, Medical School, University of São Paulo, São Paulo 05403-907, Brazil; sabinoc@gmail.com
- ¹⁵ Department of Infectious and Parasitic Disease, Medical School, University of São Paulo, São Paulo 05403-000, Brazil; n.faria@imperial.ac.uk
- ¹⁶ Institute for Human Infection and Immunity, University of Texas Medical Branch, Galveston, TX 77555, USA
- ¹⁷ Department of Zoology, University of Oxford, Oxford OX1 2JD, UK
- ¹⁸ MRC Centre for Global Infectious Disease Analysis, J-IDEA, Imperial College London, London SW7 2AZ, UK
- ¹⁹ Biodiversity Research Centre, Federal University of Roraima, Boa Vista 72000-000, Brazil
- * Correspondence: jlmodena@unicamp.br
- † These authors contributed equally to this work.
- ‡ These senior authors contributed equally to this work.

Abstract: A SARS-CoV-2 B.1.1.7 variant of concern (VOC) has been associated with increased transmissibility, hospitalization, and mortality. This study aimed to explore the factors associated with B.1.1.7 VOC infection in the context of vaccination. On March 2021, we detected SARS-CoV-2 RNA

ANEXO II- ARTIGOS PUBLICADOS NÃO ASSOCIADOS À TESE

Please cite this article in press as: de Souza et al., Pathophysiology of chikungunya virus infection associated with fatal outcomes, *Cell Host & Microbe* (2024), <https://doi.org/10.1016/j.chom.2024.02.011>

Cell Host & Microbe

CellPress
OPEN ACCESS

Resource

Pathophysiology of chikungunya virus infection associated with fatal outcomes

William M. de Souza,^{1,2,3,4,35,37,*} Marcilio J. Fumagalli,^{5,35} Shirlene T.S. de Lima,^{6,7,35} Pierina L. Parise,^{7,8,35} Deyse C.M. Carvalho,^{2,9,35} Cristian Hernandez,¹⁰ Ronaldo de Jesus,^{11,12} Jeany Delafiori,¹³ Darlan S. Candido,^{14,15,16} Victor C. Carregari,¹⁷ Stefanie P. Muraro,⁷ Gabriela F. Souza,⁷ Leda M. Simões Mello,⁹ Ingra M. Claro,^{14,16,18} Yamilka Díaz,¹⁹ Rodrigo B. Kato,^{11,12} Lucas N. Trentin,²⁰ Clauber H.S. Costa,²⁰ Ana Carolina B.M. Maximo,⁶ Karene F. Cavalcante,⁶ Tayna S. Fiuza,^{6,21} Vânia A.F. Viana,⁶ Maria Elisabeth L. Melo,⁶

(Author list continued on next page)

¹Department of Microbiology, Immunology and Molecular Genetics, University of Kentucky, College of Medicine, Lexington, KY, USA

²Department of Microbiology and Immunology, University of Texas Medical Branch, Galveston, TX, USA

³World Reference Center for Emerging Viruses and Arboviruses, University of Texas Medical Branch, Galveston, TX, USA

⁴Global Virus Network, Baltimore, MD, USA

⁵Laboratory of Molecular Immunology, The Rockefeller University, New York, NY, USA

⁶Laboratório Central de Saúde Pública do Ceará, Fortaleza, Ceará, Brazil

⁷Laboratory of Emerging Viruses, Department of Genetics, Microbiology and Immunology, Institute of Biology, University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil

⁸Department of Pathology, University of Texas Medical Branch, Galveston, TX, USA

⁹Laboratory of Immunobiotechnology, Biotechnology Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil

¹⁰Department of Neurobiology, University of Texas Medical Branch, Galveston, TX, USA

¹¹Coordenação Geral dos Laboratórios de Saúde Pública, Secretaria de Vigilância em Saúde, Ministério da Saúde, Brasília, Brazil

¹²Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

¹³Innovare Biomarkers Laboratory, School of Pharmaceutical Sciences, University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil

¹⁴MRC Centre for Global Infectious Disease Analysis, Department of Infectious Disease Epidemiology, School of Public Health, Imperial College London, London, UK

¹⁵Department of Zoology, University of Oxford, Oxford, UK

¹⁶Instituto de Medicina Tropical, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

¹⁷Department of Biochemistry and Tissue Biology, Institute of Biology, University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil

¹⁸Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

¹⁹Department of Research in Virology and Biotechnology, Gorgas Memorial Institute of Health Studies, Panama, Panama

(Affiliations continued on next page)

SUMMARY

Chikungunya virus (CHIKV) is a mosquito-borne alphavirus that causes acute, subacute, and chronic human arthritogenic diseases and, in rare instances, can lead to neurological complications and death. Here, we combined epidemiological, virological, histopathological, cytokine, molecular dynamics, metabolomic, proteomic, and genomic analyses to investigate viral and host factors that contribute to chikungunya-associated (CHIK) death. Our results indicate that CHIK deaths are associated with multi-organ infection, central nervous system damage, and elevated serum levels of pro-inflammatory cytokines and chemokines compared with survivors. The histopathologic, metabolite, and proteomic signatures of CHIK deaths reveal hemodynamic disorders and dysregulated immune responses. The CHIKV East-Central-South-African lineage infecting our study population causes both fatal and survival cases. Additionally, CHIKV infection impairs the integrity of the blood-brain barrier, as evidenced by an increase in permeability and altered tight junction protein expression. Overall, our findings improve the understanding of CHIK pathophysiology and the causes of fatal infections.

INTRODUCTION

Chikungunya virus (CHIKV) is a mosquito-borne alphavirus that has caused over 10 million cases in more than 125 countries or territories over the last two decades.¹ Currently, 1.3 billion people live in tropical and subtropical areas at risk for CHIKV

transmission.² Recent outbreaks in the southern cone of South America (e.g., Argentina, Paraguay, and Uruguay)^{3,4} support predictions that climate change is likely expanding the CHIKV distribution, putting more highly populated temperate regions, including the United States of America, China, and continental Europe, at increased risk for epidemic transmission.⁵ In



Article

Entry receptor LDLRAD3 is required for Venezuelan equine encephalitis virus peripheral infection and neurotropism leading to pathogenesis in mice

Natasha M. Kafai,^{1,2} Hana Janova,¹ Matthew D. Cain,¹ Yael Alippe,¹ Stefanie Muraro,¹ Alan Sariol,¹ Michelle Elam-Noll,^{1,6} Robyn S. Klein,^{1,2,3} and Michael S. Diamond^{1,2,4,5,7,*}¹Department of Medicine, Washington University School of Medicine, St. Louis, MO 63110, USA²Department of Pathology and Immunology, Washington University School of Medicine, St. Louis, MO 63110, USA³Department of Neuroscience, Washington University School of Medicine, St. Louis, MO 63110, USA⁴Department of Molecular Microbiology, Washington University School of Medicine, St. Louis, MO 63110, USA⁵The Andrew M. and Jane M. Bursky Center for Human Immunology and Immunotherapy Programs, Washington University School of Medicine, St. Louis, MO 63110, USA⁶Deceased⁷Lead contact*Correspondence: mdiamond@wustl.edu<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2023.112946>

SUMMARY

Venezuelan equine encephalitis virus (VEEV) is an encephalitic alphavirus responsible for epidemics of neurological disease across the Americas. Low-density lipoprotein receptor class A domain-containing 3 (LDLRAD3) is a recently reported entry receptor for VEEV. Here, using wild-type and *Ldlrad3*-deficient mice, we define a critical role for LDLRAD3 in controlling steps in VEEV infection, pathogenesis, and neurotropism. Our analysis shows that LDLRAD3 is required for efficient VEEV infection and pathogenesis prior to and after central nervous system invasion. *Ldlrad3*-deficient mice survive intranasal and intracranial VEEV inoculation and show reduced infection of neurons in different brain regions. As LDLRAD3 is a determinant of pathogenesis and an entry receptor required for VEEV infection of neurons of the brain, receptor-targeted therapies may hold promise as countermeasures.

INTRODUCTION

Alphaviruses are mosquito-transmitted, enveloped, RNA viruses of the *Togaviridae* family that cause disease in millions of people worldwide.^{1–4} New World alphaviruses are zoonotic pathogens with the potential to cause severe neurological disease and include Eastern equine encephalitis (EEEV), Western equine encephalitis, and Venezuelan equine encephalitis (VEEV) viruses.⁵ In its epizootic cycle (subtypes IAB and IC), VEEV can have devastating consequences for equines (mortality rates of 50%–70%)⁶ with occasional spillover into humans.^{6–11} Enzootic VEE complex viruses (subtype ID-F and related species in subtypes II–VI) are less or non-virulent in equids but can still cause clinical disease in humans.¹² Enzootic strains generally circulate between mosquito vectors and small mammals^{13–16} including spiny (*Proechimys* species) and cotton (*Sigmodon* species) rats.^{17–19} Laboratory studies have shown that a variety of wild rodents can survive experimental infection and develop strong antibody responses after infection with VEEV.^{17,19,20} Nonetheless, some wild rodents develop severe disease after VEEV infection, though responses vary among geographic host populations and virus strains.^{5,21} Additionally, VEEV poses a risk as an aerosolized bioweapon.^{22,23} Despite its potential to cause severe disease and death, there are no approved human vaccines

or antiviral drugs against VEEV.²⁴ A live-attenuated vaccine against VEEV (serially passaged strain TC-83 and boosters of C-84, an inactivated form of TC-83) is available as an investigational drug product in the United States through the Army Special Immunizations Program but only for at-risk laboratory workers and military personnel.^{25–31}

Much of what is known about the VEEV infection life cycle is inferred from experiments with other alphaviruses. The alphavirus positive-sense RNA genome is approximately 11.5 kb and encodes four non-structural proteins, nsp1–4, and five structural proteins, capsid, E3, E2, 6K, and E1.³² The non-structural polyproteins are translated from genomic RNA in the host cell cytoplasm and regulate viral replication, protein processing, and immune evasion. A subgenomic 26S RNA encodes the structural polypeptide C-p62(E3-E2)-6K-E1, which is cleaved into proteins required for viral encapsidation, morphogenesis, and budding.³³ The mature VEEV virion includes a nucleocapsid surrounded by a lipid envelope embedded with heterodimers of surface envelope glycoproteins E2 and E1. E2-E1 heterodimers assemble into trimeric spikes on the viral surface to create a virion with $T = 4$ quasi-icosahedral symmetry.^{34,35} The E1 protein lies beneath E2 at the base of each trimeric spike and mediates low-pH endosomal fusion before release of the viral nucleocapsid in the cytoplasm.³³ The E2 protein, the target for most





COVID-19-related hyperglycemia is associated with infection of hepatocytes and stimulation of gluconeogenesis

Ester A. Barreto^{a,b}, Amanda S. Cruz^{a,b}, Flavio P. Veras^{a,b}, Ronaldo Martins^c, Rafaella S. Bernardelli^d, Isadora M. Paiva^{a,b}, Thais M. Lima^e, Youvika Singh^f, Raphael C. Guimarães^g, Samara Damasceno^{a,b}, Nayara Pereira^{a,b}, João Manoel Alves^{a,b}, Tiago T. Gonçalves^{a,b}, Julia Forato^h, Stéfanie P. Muraroⁱ, Gabriela F. Souza^h, Sabrina Setembre Batah^e, José L. Proença-Modena^{h,i}, Marcelo A. Mori^{f,i}, Fernando Q. Cunha^{a,b}, Paulo Louzada-Junior^{b,k}, Thiago M. Cunha^{a,b}, Helder I. Nakaya^{b,l}, Alexandre Fabro^e, Renê D. R. de Oliveira^a, Eurico Arruda^c, Rosângela Réa^{d,l}, Álvaro Réa Neto^{d,l}, Miguel M. Fernandes da Silva^a, and Luiz Osório Leiria^{a,b,1}

Edited by David E. Cohen, Brigham and Women's Hospital, Boston, MA; received October 7, 2022; accepted April 19, 2023 by Editorial Board Member C. Ronald Kahn

Occurrence of hyperglycemia upon infection is associated with worse clinical outcome in COVID-19 patients. However, it is still unknown whether SARS-CoV-2 directly triggers hyperglycemia. Herein, we interrogated whether and how SARS-CoV-2 causes hyperglycemia by infecting hepatocytes and increasing glucose production. We performed a retrospective cohort study including patients that were admitted at a hospital with suspicion of COVID-19. Clinical and laboratory data were collected from the chart records and daily blood glucose values were analyzed to test the hypothesis on whether COVID-19 was independently associated with hyperglycemia. Blood glucose was collected from a subgroup of nondiabetic patients to assess pancreatic hormones. *Postmortem* liver biopsies were collected to assess the presence of SARS-CoV-2 and its transporters in hepatocytes. In human hepatocytes, we studied the mechanistic bases of SARS-CoV-2 entrance and its gluconeogenic effect. SARS-CoV-2 infection was independently associated with hyperglycemia, regardless of diabetic history and beta cell function. We detected replicating viruses in human hepatocytes from *postmortem* liver biopsies and in primary hepatocytes. We found that SARS-CoV-2 variants infected human hepatocytes *in vitro* with different susceptibility. SARS-CoV-2 infection in hepatocytes yields the release of new infectious viral particles, though not causing cell damage. We showed that infected hepatocytes increase glucose production and this is associated with induction of PEPCK activity. Furthermore, our results demonstrate that SARS-CoV-2 entry in hepatocytes occurs partially through ACE2- and GRP78-dependent mechanisms. SARS-CoV-2 infects and replicates in hepatocytes and exerts a PEPCK-dependent gluconeogenic effect in these cells that potentially is a key cause of hyperglycemia in infected patients.

SARS-CoV-2 | liver | glucose

Diabetes constitutes a major risk factor for the development of severe forms of COVID-19 (1, 2). Moreover, several studies indicate that the incidence of hyperglycemia in COVID-19 patients is associated with longer periods of hospitalization and with worse clinical outcome (3, 4). Intriguingly, hyperglycemia resulting from COVID-19 is also prevalent in patients without a history of diabetes (5), which suggests that like other RNA viruses, SARS-CoV-2 may directly interfere with glucoregulatory pathways, resulting in increased blood glucose levels.

Other groups have tried to address the mechanistic link between the viral infection and hyperglycemia (6, 7). Beta cell infection and damage induced by SARS-CoV-2 was shown *in vitro*, but its clinical relevance is still controversial. On the contrary, COVID-19 is also associated with the onset of insulin resistance (8), which potentially contributes to the imbalance in blood glucose control. Since other viral infections caused by RNA viruses such as hepatitis C and B (HCV and HBV, respectively) can induce hepatic glucose production through the stimulation of gluconeogenesis in hepatocytes (9, 10), it is plausible that SARS-CoV-2 could act similarly.

A few studies have demonstrated by immunofluorescence in *postmortem* biopsies that SARS-CoV-2 can indeed infect hepatocytes and cause liver damage (11, 12). In addition, GP73 is a gluconeogenic protein secreted under SARS-CoV-2 infection and capable of stimulating gluconeogenesis in Huh7 hepatoma cell line (13). However, it is still unknown whether SARS-CoV-2 can directly stimulate glucose production in hepatocytes. Moreover, the mechanism of infection of hepatocytes and whether such an infection is productive or not are important questions that remain to be addressed.

Significance

Hyperglycemia is a prevalent complication in hospitalized COVID-19 patients that occurs regardless of the diabetes history and is associated with a worse clinical outcome. In this study, we found that COVID-19 is independently associated with in-hospital hyperglycemia and that SARS-CoV-2 is capable of infecting hepatocytes and stimulate these cells to produce glucose through gluconeogenesis. Moreover, our data suggest that SARS-CoV-2's entrance in hepatocytes is partially mediated by the cooperation between GRP78 and ACE2 cotransporters. Our data provide mechanistic insights on how COVID-19 pathophysiology impact glucose metabolism and shed light on the importance of in-hospital control of hepatic glucose production as a means to achieve better clinical outcome in COVID-19 patients.

The authors declare no competing interest.

This article is a PNAS Direct Submission. D.E.C. is a guest editor invited by the Editorial Board.

Copyright © 2023 the Author(s). Published by PNAS. This open access article is distributed under Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives License 4.0 (CC BY-NC-ND).

¹To whom correspondence may be addressed. Email: luizleiria@usp.br.

This article contains supporting information online at <https://www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.2217119120/-DCSupplemental>.

Published May 15, 2023.

Article

Lung Inflammation Induced by Inactivated SARS-CoV-2 in C57BL/6 Female Mice Is Controlled by Intranasal Instillation of Vitamin D

William Danilo Fernandes de Souza ^{1,*}, Sofia Fernanda Gonçalves Zorzella-Pezavento ¹, Marina Caçador Ayupe ², Caio Loureiro Salgado ², Bernardo de Castro Oliveira ², Francielly Moreira ², Guilherme William da Silva ², Stefanie Primon Muraro ³, Gabriela Fabiano de Souza ³, José Luiz Proença-Módena ³, Joao Pessoa Araujo Junior ¹, Denise Moraes da Fonseca ^{2,*} and Alexandrina Sartori ^{1,†}

¹ Department of Chemical and Biological Sciences, Institute of Biosciences, São Paulo State University (UNESP), Botucatu 18618-689, SP, Brazil

² Laboratory of Mucosal Immunology, Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo (USP), São Paulo 05508-000, SP, Brazil

³ Laboratory of Emerging Viruses, Department of Genetics, Evolution, Microbiology and Immunology, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas 13083-862, SP, Brazil

* Correspondence: wdansouza@hotmail.com (W.D.F.d.S.); denisefonseca@usp.br (D.M.d.F.)

† These authors contributed equally to this work.



Citation: Fernandes de Souza, W.D.; Zorzella-Pezavento, S.F.G.; Ayupe, M.C.; Salgado, C.L.; Oliveira, B.d.C.; Moreira, F.; da Silva, G.W.; Muraro, S.P.; de Souza, G.F.; Proença-Módena, J.L.; et al. Lung Inflammation Induced by Inactivated SARS-CoV-2 in C57BL/6 Female Mice Is Controlled by Intranasal Instillation of Vitamin D. *Cells* **2023**, *12*, 1092. <https://doi.org/10.3390/cells12071092>

Academic Editors: Vasso Apostolopoulos, Jack Feehan and Vivek P. Chavda

Received: 12 February 2023

Revised: 22 March 2023

Accepted: 24 March 2023

Published: 6 April 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The COVID-19 pandemic was triggered by the coronavirus SARS-CoV-2, whose peak occurred in the years 2020 and 2021. The main target of this virus is the lung, and the infection is associated with an accentuated inflammatory process involving mainly the innate arm of the immune system. Here, we described the induction of a pulmonary inflammatory process triggered by the intranasal (IN) instillation of UV-inactivated SARS-CoV-2 in C57BL/6 female mice, and then the evaluation of the ability of vitamin D (VitD) to control this process. The assays used to estimate the severity of lung involvement included the total and differential number of cells in the bronchoalveolar lavage fluid (BALF), histopathological analysis, quantification of T cell subsets, and inflammatory mediators by RT-PCR, cytokine quantification in lung homogenates, and flow cytometric analysis of cells recovered from lung parenchyma. The IN instillation of inactivated SARS-CoV-2 triggered a pulmonary inflammatory process, consisting of various cell types and mediators, resembling the typical inflammation found in transgenic mice infected with SARS-CoV-2. This inflammatory process was significantly decreased by the IN delivery of VitD, but not by its IP administration, suggesting that this hormone could have a therapeutic potential in COVID-19 if locally applied. To our knowledge, the local delivery of VitD to downmodulate lung inflammation in COVID-19 is an original proposition.

Keywords: SARS-CoV-2; COVID-19; lung; inflammation; mice; vitamin D

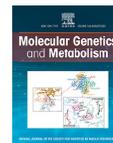
1. Introduction

SARS-CoV-2, a newly identified β -coronavirus, is the causative agent of the pandemic respiratory pathology known as COVID-19, whose peak occurred in 2020 and 2021. Even though most affected individuals are asymptomatic or develop mild symptoms, a minor proportion evolves towards a severe pathology. A plethora of factors related to the host, the environment, and the virus itself can affect the disease outcome [1]. Although the lung is considered the primary target of SARS-CoV-2, the virus can spread to many other organs such as the kidneys, intestine, liver, pancreas, spleen, muscles, and the nervous system [2,3]. Pulmonary manifestations vary from asymptomatic or mild pneumonia to a severe disease accompanied by hypoxia, shock, respiratory failure, and multiorgan deterioration or death [4]. The complexity of SARS-CoV-2 infection includes its aggravation by other comorbidities as hypertension, diabetes, and cardiovascular diseases [5] and



Contents lists available at ScienceDirect

Molecular Genetics and Metabolism

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ymgme

Phenotypic changes in low-density lipoprotein particles as markers of adverse clinical outcomes in COVID-19



Helison Rafael P. Carmo ^{a,1}, Marcos Y. Yoshinaga ^{b,1,*}, Alejandro Rosell Castillo ^a, Adriano Britto Chaves-Filho ^b, Isabella Bonilha ^a, Joaquim Barreto ^a, Stéfanie Primon Muraro ^c, Gabriela Fabiano de Souza ^c, Gustavo Gastão Davanzo ^d, Maurício W. Perroud Jr. ^e, Kishal Likhna ^f, Mpiko Ntsekhe ^f, Sean Davidson ^g, Lício A. Velloso ^h, Wilson Nadruz ^a, Luiz Sérgio F. Carvalho ^a, Miguel Sáinz-Jaspeado ⁱ, Alessandro S. Farias ^{j,k}, José Luiz Proença-Módena ^{c,k}, Pedro M. Moraes-Vieira ^{d,k}, Sotirios K. Karathanasis ^l, Derek Yellon ^g, Sayuri Miyamoto ^b, Alan T. Remaley ^l, Andrei C. Sposito ^{a,*}

^a Cardiology Division, Unicamp Medical School, SP, Brazil

^b Department of Biochemistry, Institute of Chemistry, University of São Paulo, SP, Brazil

^c Laboratory of Emerging Viruses, Department of Genetics, Microbiology and Immunology, Institute of Biology, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil

^d Laboratory of Immunometabolism, Department of Genetics, Evolution, Microbiology and Immunology, Institute of Biology, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil

^e Pneumology Division, Unicamp, SP, Brazil

^f Division of Cardiology, University of Cape Town, Cape Town, South Africa

^g Hatter Cardiovascular Institute, University College London, London, UK

^h Internal Medicine Department, Unicamp Medical School, SP, Brazil

ⁱ Mercoledì AB, Uppsala, Sweden

^j Laboratory of Neuroimmunomodulation, Department of Genetics, Evolution, Microbiology and Immunology, Institute of Biology, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil

^k Hub of Global Health (HGH), University of Campinas, Campinas, SP, Brazil

^l Lipoprotein Metabolism Laboratory Translational Vascular Medicine Branch National Heart, Lung and Blood Institute National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 October 2022

Received in revised form 22 February 2023

Accepted 23 February 2023

Available online 27 February 2023

Keywords:

Oxidized low-density lipoprotein
Lipoprotein-associated phospholipase A2
Quantitative lipidomics
COVID-19

ABSTRACT

Background and aims: Low-density lipoprotein (LDL) plasma concentration decline is a biomarker for acute inflammatory diseases, including coronavirus disease-2019 (COVID-19). Phenotypic changes in LDL during COVID-19 may be equally related to adverse clinical outcomes.

Methods: Individuals hospitalized due to COVID-19 ($n = 40$) were enrolled. Blood samples were collected on days 0, 2, 4, 6, and 30 (D0, D2, D4, D6, and D30). Oxidized LDL (ox-LDL), and lipoprotein-associated phospholipase A2 (Lp-PLA2) activity were measured. In a consecutive series of cases ($n = 13$), LDL was isolated by gradient ultracentrifugation from D0 and D6 and was quantified by lipidomic analysis. Association between clinical outcomes and LDL phenotypic changes was investigated.

Results: In the first 30 days, 42.5% of participants died due to Covid-19. The serum ox-LDL increased from D0 to D6 ($p < 0.005$) and decreased at D30. Moreover, individuals who had an ox-LDL increase from D0 to D6 to over the 90th percentile died. The plasma Lp-PLA2 activity also increased progressively from D0 to D30 ($p < 0.005$), and the change from D0 to D6 in Lp-PLA2 and ox-LDL were positively correlated ($r = 0.65$, $p < 0.0001$). An exploratory untargeted lipidomic analysis uncovered 308 individual lipids in isolated LDL particles. Paired-test analysis from D0 and D6 revealed higher concentrations of 32 lipid species during disease progression, mainly represented by lysophosphatidyl choline and phosphatidylinositol. In addition, 69 lipid species were exclusively modulated in the LDL particles from non-survivors as compared to survivors.

Conclusions: Phenotypic changes in LDL particles are associated with disease progression and adverse clinical outcomes in COVID-19 patients and could serve as a potential prognostic biomarker.

© 2023 Published by Elsevier Inc.

* Correspondence to: A. C. Sposito, Brazilian Heart Study group, State University of Campinas (Unicamp), 13084-971, Campinas, Sao Paulo, Brazil.

** Correspondence to: M. Y. Yoshinaga, University of São Paulo, Institute of Chemistry, Department of Biochemistry, 05508-900, Sao Paulo (SP), Brazil.

E-mail addresses: marcosyukio@gmail.com (M.Y. Yoshinaga), sposito@unicamp.com (A.C. Sposito).

¹ The two first authors have equally contributed to this study.

CORONAVIRUS

PD-1/PD-L1 blockade abrogates a dysfunctional innate-adaptive immune axis in critical β -coronavirus disease

Maite Duhalde Vega^{1†‡}, Daniela Olivera^{1,2†}, Gustavo Gastão Davanzo^{3†}, Mauricio Bertullo⁴, Verónica Noya⁵, Gabriela Fabiano de Souza⁶, Stéfanie Primon Muraro⁶, Icaro Castro⁷, Ana Paula Arévalo⁸, Martina Crispo⁸, Germán Galliussi⁹, Sofía Russo^{1,2}, David Charbonnier¹, Florencia Rammauro^{2,10}, Mathías Jeldres^{1,2}, Catalina Alamón¹¹, Valentina Varela¹¹, Carlos Batthyany⁹, Mariela Bollati-Fogolin¹², Pablo Opezzo¹³, Otto Pritsch^{2,10}, José Luiz Proença-Módena⁶, Helder I. Nakaya⁷, Emiliano Trias¹¹, Luis Barbeito¹¹, Ignacio Anegón¹⁴, María Cristina Cuturi^{14§}, Pedro Moraes-Vieira^{3§}, Mercedes Segovia^{1,2*§}, Marcelo Hill^{1,2*§}

Copyright © 2022
The Authors, some
rights reserved;
exclusive licensee
American Association
for the Advancement
of Science. No claim to
original U.S. Government
Works. Distributed
under a Creative
Attribution
Commons Attribution
License 4.0 (CC BY).

Severe COVID-19 is associated with hyperinflammation and weak T cell responses against SARS-CoV-2. However, the links between those processes remain partially characterized. Moreover, whether and how therapeutically manipulating T cells may benefit patients are unknown. Our genetic and pharmacological evidence demonstrates that the ion channel TMEM176B inhibited inflammasome activation triggered by SARS-CoV-2 and SARS-CoV-2-related murine β -coronavirus. *Tmem176b*^{-/-} mice infected with murine β -coronavirus developed inflammasome-dependent T cell dysfunction and critical disease, which was controlled by modulating dysfunctional T cells with PD-1 blockers. In critical COVID-19, inflammasome activation correlated with dysfunctional T cells and low monocyte TMEM176B expression, whereas PD-L1 blockade rescued T cell functionality. Here, we mechanistically link T cell dysfunction and inflammation, supporting a cancer immunotherapy to reinforce T cell immunity in critical β -coronavirus disease.

INTRODUCTION

Coordinated innate and adaptive immunity triggered by pathogenic human and animal β -coronaviruses are thought to prevent severe disease through conserved mechanisms (1–6). Accordingly, when severe coronavirus disease 2019 (COVID-19) arises, it is associated with dysregulated innate immunity (hyperinflammation), weak T cell responses, and high viral load (3, 5, 7–10). Thus, dysfunctional innate and adaptive immune responses may lead to uncontrolled viral replication and life-threatening disease. Nevertheless, whether

hyperinflammation affects T cell immunity needs further research. Monoclonal antibodies blocking the proinflammatory interleukin-6 (IL-6) receptor may add some therapeutic benefit in COVID-19 patients, although seemingly contradictory results have been reported (11–13). However, this therapy does not necessarily control viral load (14). CD8⁺ T cell responses have the potential capacity to control viral replication by killing infected cells (15). Nevertheless, therapeutic strategies aiming to reinforce T cell responses in β -coronavirus disease have not been developed. This scenario may be explained because (i) it is still unclear whether impaired T cell immunity causes severe disease (9) and (ii) the mechanisms leading to low T cell responses remain only partially understood (16, 17). Thus, characterizing these issues may help to repurpose and/or develop rational immunotherapies targeting T cells in critical COVID-19 patients.

T cells appear to be dysfunctional in COVID-19, although contradictory data have been published in this field (8, 18–23). Exhausted T cells are a specific lineage of dysfunctional cells characterized by impaired effector mechanisms and transcriptional, epigenetic, and metabolic programs as well as the expression of inhibitory receptors such as programmed cell death 1 (PD-1) (24, 25). Therapeutically, T cell exhaustion can be modulated by blocking PD-1 and its cognate ligand PD-L1 (26). PD-1/PD-L1 blockade improves disease-free and overall survival in several human cancers (27). However, it remains unknown whether PD-1/PD-L1 blockade may benefit COVID-19 patients (28). A mechanistic understanding of T cell dysfunction in β -coronavirus disease is necessary to validate and rationalize this approach. The efficacy of PD-1/PD-L1 blockers may be determined, at least in part, by the inflammatory context (29). Thus, characterizing potential links between inflammation and T cell dysfunction may help to select COVID-19 patients who could benefit from PD-1/PD-L1 blockade. We have proposed that

¹Laboratory of Immunoregulation and Inflammation, Institut Pasteur de Montevideo, 11400 Montevideo, Uruguay. ²Immunobiology Department, Faculty of Medicine, University of the Republic, 11800 Montevideo, Uruguay. ³Laboratory of Immunometabolism, Department of Genetics, Evolution, Microbiology and Immunology, Institute of Biology, University of Campinas, SP, Brazil. ⁴Intensive Care Unit, CASMU, 11600 Montevideo, Uruguay. ⁵Laboratory of Molecular Biology, Sanatorio Americano, 11600 Montevideo, Uruguay. ⁶Laboratory of Emerging Viruses, Department of Genetics, Evolution, Microbiology and Immunology, Institute of Biology, University of Campinas, SP, Brazil. ⁷Hospital Israelita Albert Einstein, SP, Brazil. ⁸Laboratory Animals Biotechnology, Institut Pasteur de Montevideo, 11400 Montevideo, Uruguay. ⁹Laboratory of Vascular Biology and Drug Development, Institut Pasteur de Montevideo, 11400 Montevideo, Uruguay. ¹⁰Laboratory of Immunovirology, Institut Pasteur de Montevideo, 11400 Montevideo, Uruguay. ¹¹Laboratorio de Neurodegeneración, Institut Pasteur de Montevideo, 11400 Montevideo, Uruguay. ¹²Cell Biology Unit, Institut Pasteur de Montevideo, 11400 Montevideo, Uruguay. ¹³Research Laboratory on Chronic Lymphocytic Leukemia, Institut Pasteur de Montevideo, 11400 Montevideo, Uruguay. ¹⁴INSERM UMR 1064, Center for Research in Transplantation and Immunology; Université de Nantes; CHU Nantes, Institut de Transplantation Urologie Néphrologie (ITUN), 44093 Nantes, France.

*Corresponding author. Email: msegovia@pasteur.edu.uy (M.S.); mhill@pasteur.edu.uy (M.H.)

†These authors contributed equally to this work.

‡Present address: Institute of Biological Chemistry and Chemical Physics (UBA-CONICET), Faculty of Pharmacy and Biochemistry, University of Buenos Aires, Junín 956 (C1113AAD), Buenos Aires, Argentina.

§These authors contributed equally to this work as co-senior authors.



SARS-CoV-2 infects adipose tissue in a fat depot- and viral lineage-dependent manner

Received: 21 March 2022

Accepted: 8 September 2022

Published online: 29 September 2022



A list of authors and their affiliations appears at the end of the paper

Visceral adiposity is a risk factor for severe COVID-19, and a link between adipose tissue infection and disease progression has been proposed. Here we demonstrate that SARS-CoV-2 infects human adipose tissue and undergoes productive infection in fat cells. However, susceptibility to infection and the cellular response depends on the anatomical origin of the cells and the viral lineage. Visceral fat cells express more ACE2 and are more susceptible to SARS-CoV-2 infection than their subcutaneous counterparts. SARS-CoV-2 infection leads to inhibition of lipolysis in subcutaneous fat cells, while in visceral fat cells, it results in higher expression of pro-inflammatory cytokines. Viral load and cellular response are attenuated when visceral fat cells are infected with the SARS-CoV-2 gamma variant. A similar degree of cell death occurs 4-days after SARS-CoV-2 infection, regardless of the cell origin or viral lineage. Hence, SARS-CoV-2 infects human fat cells, replicating and altering cell function and viability in a depot- and viral lineage-dependent fashion.

The coronavirus disease 2019 (COVID-19) outbreak has become a significant public health emergency worldwide, yielding millions of victims. The COVID-19 etiologic agent is the novel enveloped RNA betacoronavirus named severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2)¹. Since its discovery in late 2019, SARS-CoV-2 has undergone several mutations and acquired distinct properties and capabilities, leading to the emergence of multiple variants, some of them characterized as variants of concern (VOCs) by the World Health Organization (WHO)^{2,3}.

Obesity increases the likelihood of the development of severe COVID-19, hence prolonging hospital stay and increasing death rates⁴. Besides the fact that individuals with obesity may display a compromised immune system, the higher abundance of adipose tissue in such a population has been pointed out as a major cause of severe COVID-19⁵. Since adipose tissue cells express ACE2 and SARS-CoV-2 replication and its inflammatory insult are favored by the presence of lipid droplets⁶, the hypothesis that adipose tissue may serve as a reservoir for storing and replicating the virus, as well as a site for cytokine amplification, has emerged as a potential explanation for the strong association between obesity and COVID-19 severity^{6,7}. Recent studies have shown that SARS-CoV-2 can indeed infect adipose tissue cells, including adipocytes, thus favoring a local inflammatory response and resulting in changes in the lipid profile^{8–12}. In turn, these changes are

thought to contribute to insulin resistance and hamper patients' recovery.

Such an "adipocentric" view is challenged because women usually have higher adiposity than men when paired by age¹³. However, conversely, the male population has been the most affected by the severe illness from COVID-19¹⁴. Indeed, fat distribution strikingly differs between sex as women tend to have more subcutaneous fat while men have higher visceral fat mass¹³. In line with this, the severe forms of COVID-19 are more specifically associated with high visceral fat mass than high overall adiposity or subcutaneous fat mass^{15–18}. Furthermore, visceral adiposity is a stronger risk factor for cardiometabolic diseases than subcutaneous adiposity^{19,20}. In this context, deciphering the contribution of different fat depots for SARS-CoV-2 infection and replication is imperative for understanding how adipose tissue contributes to COVID-19 pathophysiology.

Here we confirm that adipose tissue is a frequent extrapulmonary site where SARS-CoV-2 can be found in COVID-19 patients and provide evidence that visceral fat cells are more susceptible than subcutaneous fat cells to SARS-CoV-2 infection in vitro. We also show that SARS-CoV-2 triggers cellular responses that are partially overlapping between the fat depots but can also be depot-specific. Notably, SARS-CoV-2 results in higher levels of proinflammatory markers when it infects visceral fat cells when compared to subcutaneous fat cells. Finally, we observed

✉ e-mail: dmsouza@unicamp.br; mko@fmrp.usp.br; luzleiria@usp.br; morima@unicamp.br

Author contributions

Conceptualization: D.M.-d.-S., M.K.O., L.O.L., and M.A.M. Methodology: T.D.S., F.M.-N., R.G.L., V.C.C., A.B.d.A.S., A.S.C.d.P., F.P.V., N.P.B.F., M.A.M.P., H.M.-S., T.L.K., G.P.R., G.S.P., I.M.P., and T.C.M.F.-C. Software: M.A.M.P. and M.B. Validation: T.D.S., F.M.-N., R.G.L., V.C.C., A.B.A.S., A.S.P., T.T.G., D.M.-d.-S., M.K.O., L.O.L., and M.A.M. Formal analysis: T.D.S., F.M.-N., R.G.L., V.C.C., A.B.A.S., A.S.P., F.P.V., T.T.G., M.A.M.P., B.J.S., D.M.-d.-S., M.K.O., L.O.L., and M.A.M. Investigation: T.D.S., F.M.-N., R.G.L., V.C.C., A.B.A.S., A.S.P., M.C.M., P.P.B., G.F.S., M.R.A., S.P.M., J.F., R.E.M., F.P.V., E.B., T.T.G., M.A.M.P., and T.T. Resources: N.P.B.F., C.M.K.O., R.B.M.J., P.H.C.d.A., S.S.B., R.M.M.V., D.M.d.M., A.T.F., E.A., T.M.C., F.Q.C., H.M.-S., M.B., M.A.R.V., A.S.F., P.M.M.M.-V., J.M.A.B., T.T., F.D.M.C., E.C., E.A.C., J.L.P.-M., D.M.-d.-S., M.K.O., L.O.L., and M.A.M. Data curation: T.D.S., F.M.-N., R.G.L., V.C.C., A.B.A.S., A.S.P., F.P.V., M.A.M.P., M.B., D.M.-d.-S., M.K.O., L.O.L., and M.A.M. Writing—original draft: T.D.S., F.M.-N., R.G.L., V.C.C., A.B.A.S., A.S.P., M.K.O., L.O.L., and M.A.M. Writing—review and editing: F.M.-N., R.E.M., H.M.S., M.A.R.V., P.M.M.M.-V., J.L.P.-M., and D.M.-d.-S. Visualization: T.D.S., F.M.-N., R.G.L., V.C.C., A.B.A.S., A.S.P., J.L.P.-M., D.M.-d.-S., M.K.O., L.O.L., and M.A.M. Supervision: A.T.F., E.A., F.Q.C., M.B., J.M.A.B., E.A.C., J.L.P.-M., D.M.-d.-S., M.K.O., L.O.L., and M.A.M. Project administration: D.M.-d.-S., M.K.O., L.O.L., and M.A.M. Funding acquisition: J.L.P.-M., D.M.-d.-S., M.K.O., L.O.L., and M.A.M.

Competing interests

Marcelo A. Mori received funds from AstraZeneca and Natura for isolation and culture of adipose tissue mesenchymal stem cells for obesity and aging-related research. The grants did not anticipate COVID-19 research. The remaining authors declare no competing interests.

Ethics

This study was approved by local Research Ethics Committees and conducted by local researchers, and all of those who contributed significantly were included as authors. Engaging local researchers and sharing authorship among equal contributors have helped to stimulate a multidisciplinary environment, promote collaboration, and accelerate research locally in a period where the COVID-19 pandemics imposed many restrictions. Our research is particularly relevant locally since Brazil is one of the countries where obesity and severe COVID-19 have been most prevalent. Moreover, we studied the SARS-CoV-2 gamma variant of concern which has been initially identified in Brazil and led to hundreds of thousands of deaths and millions of people infected, mainly

in South America. We have also cited local research relevant to our study whenever possible. Notably, most authors are from public universities in Brazil, which have been actively engaged in including the lower social strata among students and workers, following established long-term governmental policies.

Additional information

Supplementary information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41467-022-33218-8>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to Daniel Martins-de-Souza, Mariana Kiomy Osako, Luiz Osório Leiria or Marcelo A. Mori.

Peer review information *Nature Communications* thanks the anonymous reviewers for their contribution to the peer review of this work. Peer reviewer reports are available.

Reprints and permission information is available at <http://www.nature.com/reprints>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2022

Tatiana Dandolini Saccon^{1,20}, Felipe Mousovich-Neto^{1,20}, Raissa Guimarães Ludwig^{1,20}, Victor Corasolla Carregari^{1,20}, Ana Beatriz dos Anjos Souza^{2,20}, Amanda Stephane Cruz dos Passos^{3,4,20}, Matheus Cavalheiro Martini⁵, Priscilla Paschoal Barbosa⁵, Gabriela Fabiano de Souza⁵, Stéfanie Primon Muraro⁵, Julia Forato⁵, Mariene Ribeiro Amorim⁵, Rafael Elias Marques⁶, Flavio Protasio Veras^{3,4,7}, Ester Barreto^{3,4}, Tiago Tomazini Gonçalves^{4,8}, Isadora Marques Paiva^{3,4}, Narayana P. B. Fazolini¹, Carolina Mie Kawagosi Onodera⁹, Ronaldo Bragança Martins Junior¹⁰, Paulo Henrique Cavalcanti de Araújo², Sabrina Setembro Batah¹¹, Rosa Maria Mendes Viana¹⁰, Danilo Machado de Melo¹⁰, Alexandre Todorovic Fabro¹¹, Eurico Arruda¹⁰, Fernando Queiroz Cunha^{3,4}, Thiago Mattar Cunha^{3,4}, Marco Antônio M. Pretti¹², Bradley Joseph Smith¹, Henrique Marques-Souza¹, Thiago L. Knittel¹, Gabriel Palermo Ruiz¹, Gerson S. Profeta¹, Tereza Cristina Minto Fontes-Cal^{1,13}, Mariana Boroni^{12,14}, Marco Aurélio Ramirez Vinolo^{5,13,14}, Alessandro S. Farias^{5,13,14}, Pedro Manoel M. Moraes-Vieira^{5,13,14}, Joyce Maria Annichino Bizzacchi⁹, Tambet Teesalu¹⁵, Felipe David Mendonça Chaim¹⁶, Everton Cazzo¹⁶, Elinton Adami Chaim¹⁶, José Luiz Proença-Módena^{5,14}, Daniel Martins-de-Souza^{1,13,14,17,18} ✉, Mariana Kiomy Osako² ✉, Luiz Osório Leiria^{3,4} ✉ & Marcelo A. Mori^{1,13,14,19} ✉

¹Department of Biochemistry and Tissue Biology, Institute of Biology, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil. ²Department of Cell and Molecular Biology and Pathogenic Bioagents, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil. ³Department of Pharmacology, Ribeirão Preto

Article

Impact of Microbiota Depletion by Antibiotics on SARS-CoV-2 Infection of K18-hACE2 Mice

Patrícia Brito Rodrigues ¹, Giovanni Freitas Gomes ², Monara K. S. C. Angelim ³, Gabriela F. Souza ⁴, Stefanie Primon Muraro ⁴, Daniel A. Toledo-Teixeira ⁴, Bruna Amanda Cruz Rattis ⁵, Amanda Stephane Passos ^{2,6}, Laís Passarielo Pral ¹, Vinicius de Rezende Rodovalho ¹, Arilson Bernardo dos Santos P. Gomes ¹, Valquíria Aparecida Matheus ¹, André Saraiva Leão Marcelo Antunes ⁷, Fernanda Crunfli ⁷, Krist Helen Antunes ⁸, Ana Paula Duarte de Souza ⁸, Silvio Roberto Consonni ⁹, Luiz Osório Leiria ^{2,6}, José Carlos Alves-Filho ^{2,6}, Thiago M. Cunha ^{2,6}, Pedro M. M. Moraes-Vieira ^{3,10,11,†}, José Luiz Proença-Módena ^{4,11} and Marco Aurélio R. Vinolo ^{1,10,11,*}

¹ Laboratory of Immunoinflammation, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas 13000-000, Brazil

² Center of Research in Inflammatory Diseases, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto 14000-000, Brazil

³ Laboratory of Immunometabolism, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas 13000-000, Brazil

⁴ Laboratory of Emerging Viruses, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas 13000-000, Brazil

⁵ Department of Pathology, Faculty of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto 14000-000, Brazil

⁶ Center for Research in Inflammatory Diseases (CRID), Department of Pharmacology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto 14000-000, Brazil

⁷ Laboratory of Neuroproteomics, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas 13000-000, Brazil

⁸ Laboratory of Clinical and Experimental Immunology, Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre 90000-000, Brazil

⁹ Laboratory of Citochemistry and Immunocitochemistry, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas 13000-000, Brazil

¹⁰ Obesity and Comorbidities Research Center (OCRC), University of Campinas (UNICAMP), Campinas 13000-000, Brazil

¹¹ Experimental Medicine Research Cluster, University of Campinas (UNICAMP), Campinas 13000-000, Brazil

* Correspondence: mvinolo@unicamp.br

† The COVID-19 International Research Team (COV-IRT) is a community of scientists driving research into COVID-19.



Citation: Rodrigues, P.B.; Gomes, G.F.; Angelim, M.K.S.C.; Souza, G.F.; Muraro, S.P.; Toledo-Teixeira, D.A.; Rattis, B.A.C.; Passos, A.S.; Pral, L.P.; de Rezende Rodovalho, V.; et al. Impact of Microbiota Depletion by Antibiotics on SARS-CoV-2 Infection of K18-hACE2 Mice. *Cells* **2022**, *11*, 2572. <https://doi.org/10.3390/cells11162572>

Academic Editor: Cord Brakebusch

Received: 16 July 2022

Accepted: 13 August 2022

Published: 18 August 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Clinical and experimental data indicate that severe acute respiratory syndrome coronavirus (SARS-CoV)-2 infection is associated with significant changes in the composition and function of intestinal microbiota. However, the relevance of these effects for SARS-CoV-2 pathophysiology is unknown. In this study, we analyzed the impact of microbiota depletion after antibiotic treatment on the clinical and immunological responses of K18-hACE2 mice to SARS-CoV-2 infection. Mice were treated with a combination of antibiotics (kanamycin, gentamicin, metronidazole, vancomycin, and colistin, Abx) for 3 days, and 24 h later, they were infected with SARS-CoV-2 B lineage. Here, we show that more than 80% of mice succumbed to infection by day 11 post-infection. Treatment with Abx had no impact on mortality. However, Abx-treated mice presented better clinical symptoms, with similar weight loss between infected–treated and non-treated groups. We observed no differences in lung and colon histopathological scores or lung, colon, heart, brain and kidney viral load between groups on day 5 of infection. Despite some minor differences in the expression of antiviral and inflammatory markers in the lungs and colon, no robust change was observed in Abx-treated mice. Together, these findings indicate that microbiota depletion has no impact on SARS-CoV-2 infection in mice.

Keywords: respiratory infection; SARS-CoV-2; COVID-19; intestinal microbiota; colon; gut-to-lung axis



Morphological, cellular, and molecular basis of brain infection in COVID-19 patients

Fernanda Crunfi^{a,1}, Victor C. Carregari^{a,1}, Flavio P. Veras^{b,1}, Lucas S. Silva^a, Mateus Henrique Nogueira^a, André Saraiva Leão Marcelo Antunes^a, Pedro Henrique Vendramini^a, Aline Gazzola Fragnani Valença^a, Caroline Brandão-Teles^a, Giuliana da Silva Zuccoli^a, Guilherme Reis-de-Oliveira^a, Lúcia C. Silva-Costa^a, Verônica Monteiro Saia-Cereda^a, Bradley J. Smith^a, Ana Campos Codo^a, Gabriela F de Souza^a, Stéfanie P. Muraro^a, Pierina Lorenzini Parise^a, Daniel A. Toledo-Teixeira^a, Ícaro Maia Santos de Castro^a, Bruno Marcel Melo^b, Glaucia M. Almeida^b, Egidi Mayara Silva Firmino^b, Isadora Marques Paiva^b, Bruna Manuella Souza Silva^b, Rafaela Mano Guimarães^b, Niele D. Mendes^b, Raissa L. Ludwig^a, Gabriel P. Ruiz^a, Thiago L. Knittel^a, Gustavo G. Davanzo^a, Jaqueline Aline Gerhardt^a, Patrícia Brito Rodrigues^a, Julia Forato^a, Mariene Ribeiro Amorim^a, Natália S. Brunetti^a, Matheus Cavalheiro Martini^a, Maira Nilson Benatti^b, Sabrina S. Batah^b, Li Siyuan^b, Rafael B. João^a, Ítalo K. Aventurato^a, Mariana Rabelo de Brito^a, Maria J. Mendes^a, Beatriz A. da Costa^a, Marina K. M. Alvim^a, José Roberto da Silva Júnior^a, Lívia L. Damião^a, Iêda Maria P. de Sousa^a, Eleessandra D. da Rocha^a, Solange M. Gonçalves^a, Luiz H. Lopes da Silva^a, Vanessa Bettini^a, Bruno M. Campos^a, Guilherme Ludwig^a, Lucas Alves Tavares^b, Marjorie Cornejo Pontelli^b, Rosa Maria Mendes Viana^b, Ronaldo B. Martins^b, Andre Schwambach Vieira^a, José Carlos Alves-Filho^b, Eurico Arruda^b, Guilherme Gozzoli Podolsky-Gondim^b, Marcelo Volpon Santos^b, Luciano Neder^b, André Damasio^a, Stevens Rehen^{d,e}, Marco Aurélio Ramirez Vinolo^a, Carolina Demarchi Munhoz^a, Paulo Louzada-Junior^b, René Donizeti Oliveira^a, Fernando Q. Cunha^b, Helder I. Nakaya^a, Thais Mauad^a, Amaro Nunes Duarte-Neto^a, Luiz Fernando Ferraz da Silva^a, Marisa Dolhnikoff^a, Paulo Hilario Nascimento Saldiva^a, Alessandro S. Farias^a, Fernando Cendes^a, Pedro Manoel M. Moraes-Vieira^a, Alexandre T. Fabro^a, Adriano Sebollela^b, José L. Proença-Modena^a, Clarissa L. Yasuda^{a,2}, Marcelo A. Mori^{a,2}, Thiago M. Cunha^{b,2}, and Daniel Martins-de-Souza^{a,d,2}

Edited by Marcus Raichle, Washington University in St. Louis, St. Louis, MO; received January 26, 2022; accepted June 15, 2022

Although increasing evidence confirms neuropsychiatric manifestations associated mainly with severe COVID-19 infection, long-term neuropsychiatric dysfunction (recently characterized as part of “long COVID-19” syndrome) has been frequently observed after mild infection. We show the spectrum of cerebral impact of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infection, ranging from long-term alterations in mildly infected individuals (orbitofrontal cortical atrophy, neurocognitive impairment, excessive fatigue and anxiety symptoms) to severe acute damage confirmed in brain tissue samples extracted from the orbitofrontal region (via endonasal transthemoidal access) from individuals who died of COVID-19. In an independent cohort of 26 individuals who died of COVID-19, we used histopathological signs of brain damage as a guide for possible SARS-CoV-2 brain infection and found that among the 5 individuals who exhibited those signs, all of them had genetic material of the virus in the brain. Brain tissue samples from these five patients also exhibited foci of SARS-CoV-2 infection and replication, particularly in astrocytes. Supporting the hypothesis of astrocyte infection, neural stem cell–derived human astrocytes *in vitro* are susceptible to SARS-CoV-2 infection through a noncanonical mechanism that involves spike–NRP1 interaction. SARS-CoV-2–infected astrocytes manifested changes in energy metabolism and in key proteins and metabolites used to fuel neurons, as well as in the biogenesis of neurotransmitters. Moreover, human astrocyte infection elicits a secretory phenotype that reduces neuronal viability. Our data support the model in which SARS-CoV-2 reaches the brain, infects astrocytes, and consequently, leads to neuronal death or dysfunction. These deregulated processes could contribute to the structural and functional alterations seen in the brains of COVID-19 patients.

SARS-CoV-2 | COVID-19 | neurological symptoms | astrocytes | NRP1

COVID-19 is a disease caused by infection with severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). Although the hallmark symptoms of COVID-19 are respiratory in nature and related to pulmonary infection, extrapulmonary effects have been reported in COVID-19 patients (1, 2), including symptoms involving the central nervous system (CNS) (3). Notably, over 30% of hospitalized COVID-19 patients manifest neurological and even neuropsychiatric symptoms (4, 5), and some present varying degree of encephalitis (6). There are increasing reports of persistent and prolonged effects after acute COVID-19, a long COVID-19 syndrome characterized by persistent symptoms and/or delayed or long-term complications beyond 4 wk from the onset of symptoms. Some of these persistent symptoms are neuropsychiatric sequelae (3). One study revealed that more than half of hospitalized patients continued to exhibit neurological symptoms for as long as 3 mo after the acute stage (7). Impaired cognition has also been

Significance

Neurological symptoms are among the most prevalent of the extrapulmonary complications of COVID-19, affecting more than 30% of patients. In this study, we provide evidence that severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) is found in the human brain, where it infects astrocytes and to a lesser extent, neurons. We also show that astrocytes are susceptible to SARS-CoV-2 infection through a noncanonical mechanism that involves spike–NRP1 interaction and respond to the infection by remodeling energy metabolism, which in turn, alters the levels of metabolites used to fuel neurons and support neurotransmitter synthesis. The altered secretory phenotype of infected astrocytes then impairs neuronal viability. These features could explain the damage and structural changes observed in the brains of COVID-19 patients.

This article is a PNAS Direct Submission.

Copyright © 2022 the Author(s). Published by PNAS. This open access article is distributed under Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives License 4.0 (CC BY-NC-ND).

Published August 11, 2022.



Zika Virus Strains and Dengue Virus Induce Distinct Proteomic Changes in Neural Stem Cells and Neurospheres

Juliana Minardi Nascimento^{1,2,3} · Danielle Gouvêa-Junqueira¹ · Giuliana S. Zuccoli¹ · Carolina da Silva Gouveia Pedrosa² · Caroline Brandão-Teles¹ · Fernanda Crunfli¹ · André S. L. M. Antunes¹ · Juliana S. Cassoli^{1,4} · Karina Karmirian² · José Alexandre Salerno² · Gabriela Fabiano de Souza⁵ · Stéfanie Primon Muraro⁵ · Jose Luiz Proença-Módena⁵ · Luiza M. Higa⁶ · Amilcar Tanuri⁶ · Patricia P. Garcez^{2,7} · Stevens K. Rehen^{2,6} · Daniel Martins-de-Souza^{1,2,8,9}

Received: 13 September 2021 / Accepted: 5 June 2022 / Published online: 22 June 2022
 © The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2022

Abstract

Brain abnormalities and congenital malformations have been linked to the circulating strain of Zika virus (ZIKV) in Brazil since 2016 during the microcephaly outbreak; however, the molecular mechanisms behind several of these alterations and differential viral molecular targets have not been fully elucidated. Here we explore the proteomic alterations induced by ZIKV by comparing the Brazilian (Br ZIKV) and the African (MR766) viral strains, in addition to comparing them to the molecular responses to the Dengue virus type 2 (DENV). Neural stem cells (NSCs) derived from induced pluripotent stem (iPSCs) were cultured both as monolayers and in suspension (resulting in neurospheres), which were then infected with ZIKV (Br ZIKV or ZIKV MR766) or DENV to assess alterations within neural cells. Large-scale proteomic analyses allowed the comparison not only between viral strains but also regarding the two- and three-dimensional cellular models of neural cells derived from iPSCs, and the effects on their interaction. Altered pathways and biological processes were observed related to cell death, cell cycle dysregulation, and neurogenesis. These results reinforce already published data and provide further information regarding the biological alterations induced by ZIKV and DENV in neural cells.

Keywords Neurodevelopment · Microcephaly · Flaviviridae · Neural cells · iPSC

Juliana Minardi Nascimento and Danielle Gouvêa-Junqueira contributed equally.

✉ Stevens K. Rehen
 srehen@lance-ufrj.org

✉ Daniel Martins-de-Souza
 dmsouza@unicamp.br

¹ Laboratory of Neuroproteomics, Department of Biochemistry and Tissue Biology, Institute of Biology, University of Campinas, Rua Monteiro Lobato, Campinas, SP 255, 13083-862, Brazil

² D'Or Institute for Research and Education (IDOR), Rua Diniz Cordeiro, 30, Rio de Janeiro, RJ 22281-100, Brazil

³ Department of Biosciences, Federal University of São Paulo, Santos, Brazil

⁴ Institute of Biological Sciences, Federal University of Pará (UFPA), Belém, Brazil

⁵ Laboratory of Emerging Viruses, Department of Genetics, Evolution, Microbiology and Immunology, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), São Paulo, Brazil

⁶ Institute of Biology, Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brazil

⁷ Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brazil

⁸ Experimental Medicine Research Cluster (EMRC), University of Campinas, Campinas, Brazil

⁹ Instituto Nacional de Biomarcadores Em Neuropsiquiatria (INBION), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico E Tecnológico, São Paulo, Brazil



Detection of SARS-CoV-2 virus via dynamic light scattering using antibody-gold nanoparticle bioconjugates against viral spike protein

Patricia Bento da Silva^a, Jaqueline Rodrigues da Silva^a, Mosar Corrêa Rodrigues^a, Julia Augusto Vieira^a, Ikaro Alves de Andrade^b, Tatsuya Nagata^b, Alexandre Silva Santos^c, Sebastião William da Silva^c, Marcia Cristina Oliveira da Rocha^d, Sônia Nair Bão^d, Pedro M. Moraes-Vieira^e, José Proença-Modena^e, Monara K.C. Angelim^e, Gabriela Fabiano de Souza^e, Stefanie Primon Muraro^e, André Luis Branco de Barros^f, Glêndara Aparecida de Souza Martins^g, Fátima Ribeiro-Dias^h, Giovanna Machadoⁱ, Melissa Regina Fessel^j, Ana Marisa Chudzinski-Tavassi^j, Célia Machado Ronconi^k, Debora Gonçalves^l, Rui Curi^{j,m}, Osvaldo N. Oliveira, (Jr.)^{l,*}, Ricardo Bentes Azevedo^{a,**}

^a Laboratory of Nanobiotechnology, Department of Genetics and Morphology, Institute of Biological Sciences, University of Brasília, Brasília, Distrito Federal, 70910-900, Brazil

^b Virology and Microscopy Laboratory, Cell Biology Department, Institute of Biological Sciences, University of Brasília, Brasília, Distrito Federal, 70910-900, Brazil

^c Optical Spectroscopy Laboratory, Institute of Physics, University of Brasília, Brasília, Distrito Federal, 70910-900, Brazil

^d Electron Microscopy Laboratory, Cell Biology Department, Institute of Biological Sciences, University of Brasília, Brasília, Distrito Federal, 70910-900, Brazil

^e Department of Genetics, Evolution, Microbiology, and Immunology, University of Campinas, Campinas, São Paulo, 13083970, Brazil

^f Department of Clinical and Toxicological Analysis, Faculty of Pharmacy, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, 31270-901, Brazil

^g Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Federal University of Tocantins, 77001-090, Brazil

^h Laboratório de Imunidade Natural (LIN), Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, 74690-900, Brazil

ⁱ Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste, Av. Prof. Luiz Freire 01, Recife, Pernambuco, 50740-540, Brazil

^j Bioindustrial Center, Butantan Institute, São Paulo, São Paulo, 05503-900, Brazil

^k Departamento de Química Inorgânica, Universidade Federal Fluminense, Campus do Valonguinho, Outeiro de São João Batista, s/n, 24020-141, Niterói, RJ, Brazil

^l São Carlos Institute of Physics, University of São Paulo, São Carlos, São Paulo, 13560-970, Brazil

^m Interdisciplinary Program of Health Sciences, Cruzeiro do Sul University, São Paulo, 01311-925, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

SARS-CoV-2
Immunosensors
Bioconjugates
Spectroscopic techniques
Influenza virus

ABSTRACT

Mass testing for the diagnosis of COVID-19 has been hampered in many countries owing to the high cost of genetic material detection. This study reports on a low-cost immunoassay for detecting SARS-CoV-2 within 30 min using dynamic light scattering (DLS). The immunosensor comprises 50-nm gold nanoparticles (AuNPs) functionalized with antibodies against SARS-CoV-2 spike glycoprotein, whose bioconjugation was confirmed using transmission electron microscopy (TEM), UV-Vis spectroscopy, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), and surface-enhanced Raman scattering spectroscopy (SERS). The specific binding of the bioconjugates to the spike protein led to an increase in bioconjugate size, with a limit of detection (LOD) 5.29×10^3 TCID₅₀/mL (Tissue Culture Infectious Dose). The immunosensor was also proven to be selective upon interaction with influenza viruses once no increase in size was observed after DLS measurement. The strategy proposed here aimed to use antibodies conjugated to AuNPs as a generic platform that can be extended to other detection principles, enabling technologies for low-cost mass testing for COVID-19.

* Corresponding author.

** Corresponding author.

E-mail addresses: chu@lfsc.usp.br (O.N. Oliveira), razevedo@unb.br (R.B. Azevedo).

<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2022.123355>

Received 10 December 2021; Received in revised form 25 February 2022; Accepted 1 March 2022

Available online 4 March 2022

0039-9140/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

ORIGINAL ARTICLE

Kinetics of peripheral blood neutrophils in severe coronavirus disease 2019

Mieke Metzemaekers^{1†} , Seppe Cambier^{1†} , Marfa Blanter¹, Jennifer Vandooren² , Ana Carolina de Carvalho^{1,3,4} , Bert Malengier-Devlies², Lore Vanderbeke⁵, Cato Jacobs⁶, Sofie Coenen⁷, Erik Martens², Noémie Pörtner¹, Lotte Vanbrabant¹, Pierre Van Mol⁸, Yannick Van Herck⁹, Nathalie Van Aerde¹⁰, Greet Hermans¹⁰, Jan Gunst¹⁰, Alexandre Borin³, Bruna Toledo N Pereira⁴, Arilson Bernardo dos SP Gomes⁴ , Stéphanie Primon Muraro¹¹, Gabriela Fabiano de Souza¹¹, Alessandro S Farias¹², José Luiz Proenca-Modena^{11,12}, Marco Aurélio R Vinolo^{4,12}, the CONTAGIOUS Consortium, Pedro Elias Marques¹ , Carine Wouters^{2,13,14} , Els Wauters¹⁵ , Sofie Struyf¹ , Patrick Matthys² , Ghislain Opendakker² , Rafael Elias Marques³ , Joost Wauters⁶ , Mieke Gouwy^{1†}  & Paul Proost^{1†} 

¹Laboratory of Molecular Immunology, Department of Microbiology, Immunology and Transplantation, Rega Institute, KU Leuven, Leuven, Belgium

²Laboratory of Immunobiology, Department of Microbiology, Immunology and Transplantation, Rega Institute, KU Leuven, Leuven, Belgium

³Brazilian Center for Research in Energy and Materials - CNPEM, Brazilian Biosciences National Laboratory, Campinas, LNBio, Brazil

⁴Laboratory of Immunoinflammation, Department of Genetics, Microbiology and Immunology, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil

⁵Laboratory of Clinical Bacteriology and Mycology, Department of Microbiology, Immunology and Transplantation, KU Leuven, Leuven, Belgium

⁶Laboratory for Clinical Infectious and Inflammatory Disorders, Department of Microbiology, Immunology and Transplantation, KU Leuven, Leuven, Belgium

⁷Division of Pediatrics, University Hospitals Leuven, Leuven, Belgium

⁸Laboratory of Translational Genetics, Department of Human Genetics, VIB-KU Leuven, Leuven, Belgium

⁹Laboratory of Experimental Oncology, Department of Oncology, KU Leuven, Leuven, Belgium

¹⁰Laboratory of Intensive Care Medicine, Department of Cellular and Molecular Medicine, KU Leuven, Leuven, Belgium

¹¹Laboratory Emerging Viruses, Department of Genetics, Microbiology and Immunology, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil

¹²Experimental Medicine Research Cluster (EMRC), University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil

¹³Division of Pediatric Rheumatology, University Hospitals Leuven, Leuven, Belgium

¹⁴European Reference Network for Rare Immunodeficiency, Autoinflammatory and Autoimmune Diseases (RITA) at University Hospitals Leuven, Leuven, Belgium

¹⁵Laboratory of Respiratory Diseases and Thoracic Surgery (BREATHE), Department of Chronic Diseases and Metabolism, KU Leuven, Leuven, Belgium

Correspondence

P Proost, Laboratory of Molecular Immunology, Rega Institute, KU Leuven, Herestraat 49 Box 1042, B-3000 Leuven, Belgium.
E-mail: paul.proost@kuleuven.be

[†]Equal contribution as first or senior author.

Additional Contagious consortium members are shown in Appendix 1.

Abstract

Objectives. Emerging evidence of dysregulation of the myeloid cell compartment urges investigations on neutrophil characteristics in coronavirus disease 2019 (COVID-19). We isolated neutrophils from the blood of COVID-19 patients receiving general ward care and from patients hospitalised at intensive care units (ICUs) to explore the kinetics of circulating neutrophils and factors important for neutrophil migration and activation. **Methods.** Multicolour flow cytometry was exploited for the analysis of neutrophil differentiation and activation markers. Multiplex and ELISA technologies were used for the quantification of protease, protease inhibitor, chemokine and cytokine concentrations in

Neutralisation of SARS-CoV-2 lineage P.1 by antibodies elicited through natural SARS-CoV-2 infection or vaccination with an inactivated SARS-CoV-2 vaccine: an immunological study



William M Souza*, Mariene R Amorim*, Renata Sesti-Costa*, Laís D Coimbra, Natalia S Brunetti, Daniel A Toledo-Teixeira, Gabriela F de Souza, Stefanie P Muraro, Pierina L Parise, Priscilla P Barbosa, Karina Bispo-dos-Santos, Luciana S Mofatto, Camila L Simeoni, Ingra M Claro, Adriana S S Duarte, Thais M Coletti, Audrey B Zangirolami, Carolina Costa-Lima, Arilson B S P Gomes, Lucas I Buscaratti, Flavia C Sales, Vitor A Costa, Lucas A M Franco, Darlan S Candido, Oliver G Pybus, Jaqueline G de Jesus, Camila AM Silva, Mariana S Ramundo, Giulia M Ferreira, Mariana C Pinho, Leandro M Souza, Esmerina C Rocha, Pamela S Andrade, Myuki A E Crispim, Grazielle C Maktura, Erika R Manuli, Magnun N N Santos, Cecilia C Camilo, Rodrigo N Angerami, Maria L Moretti, Fernando R Spilki, Clarice W Arns, Marcelo Addas-Carvalho, Bruno D Benites, Marco A R Vinolo, Marcelo A S Mori, Nelson Gaburo, Christopher Dye, Henrique Marques-Souza, Rafael E Marques, Alessandro S Farias, Michael S Diamond, Nuno R Faria†, Ester C Sabinof, Fabiana Granjat, Jose Luiz Proença-Módena†

Summary

Background Mutations accrued by SARS-CoV-2 lineage P.1—first detected in Brazil in early January, 2021—include amino acid changes in the receptor-binding domain of the viral spike protein that also are reported in other variants of concern, including B.1.1.7 and B.1.351. We aimed to investigate whether isolates of wild-type P.1 lineage SARS-CoV-2 can escape from neutralising antibodies generated by a polyclonal immune response.

Methods We did an immunological study to assess the neutralising effects of antibodies on lineage P.1 and lineage B isolates of SARS-CoV-2, using plasma samples from patients previously infected with or vaccinated against SARS-CoV-2. Two specimens (P.1/28 and P.1/30) containing SARS-CoV-2 lineage P.1 (as confirmed by viral genome sequencing) were obtained from nasopharyngeal and bronchoalveolar lavage samples collected from patients in Manaus, Brazil, and compared against an isolate of SARS-CoV-2 lineage B (SARS-CoV2/SP02.2020) recovered from a patient in Brazil in February, 2020. Isolates were incubated with plasma samples from 21 blood donors who had previously had COVID-19 and from a total of 53 recipients of the chemically inactivated SARS-CoV-2 vaccine CoronaVac: 18 individuals after receipt of a single dose and an additional 20 individuals (38 in total) after receipt of two doses (collected 17–38 days after the most recent dose); and 15 individuals who received two doses during the phase 3 trial of the vaccine (collected 134–230 days after the second dose). Antibody neutralisation of P.1/28, P.1/30, and B isolates by plasma samples were compared in terms of median virus neutralisation titre (VNT₅₀), defined as the reciprocal value of the sample dilution that showed 50% protection against cytopathic effects).

Findings In terms of VNT₅₀, plasma from individuals previously infected with SARS-CoV-2 had an 8·6 times lower neutralising capacity against the P.1 isolates (median VNT₅₀ 30 [IQR <20–45] for P.1/28 and 30 [<20–40] for P.1/30) than against the lineage B isolate (260 [160–400]), with a binominal model showing significant reductions in lineage P.1 isolates compared with the lineage B isolate ($p \leq 0\cdot0001$). Efficient neutralisation of P.1 isolates was not seen with plasma samples collected from individuals vaccinated with a first dose of CoronaVac 20–23 days earlier (VNT₅₀s below the limit of detection [<20] for most plasma samples), a second dose 17–38 days earlier (median VNT₅₀ 24 [IQR <20–25] for P.1/28 and 28 [<20–25] for P.1/30), or a second dose 134–260 days earlier (all VNT₅₀s below limit of detection). Median VNT₅₀s against the lineage B isolate were 20 (IQR 20–30) after a first dose of CoronaVac 20–23 days earlier, 75 (<20–263) after a second dose 17–38 days earlier, and 20 (<20–30) after a second dose 134–260 days earlier. In plasma collected 17–38 days after a second dose of CoronaVac, neutralising capacity against both P.1 isolates was significantly decreased ($p=0\cdot0051$ for P.1/28 and $p=0\cdot0336$ for P.1/30) compared with that against the lineage B isolate. All data were corroborated by results obtained through plaque reduction neutralisation tests.

Interpretation SARS-CoV-2 lineage P.1 might escape neutralisation by antibodies generated in response to polyclonal stimulation against previously circulating variants of SARS-CoV-2. Continuous genomic surveillance of SARS-CoV-2 combined with antibody neutralisation assays could help to guide national immunisation programmes.

Funding São Paulo Research Foundation, Brazilian Ministry of Science, Technology and Innovation and Funding Authority for Studies, Medical Research Council, National Council for Scientific and Technological Development, National Institutes of Health.

Lancet Microbe 2021; 2: e527–35

Published Online
July 8, 2021
[https://doi.org/10.1016/S2666-5247\(21\)00129-4](https://doi.org/10.1016/S2666-5247(21)00129-4)

*Contributed equally

†Senior authors; contributed equally

For the Portuguese translation of the abstract see Online for appendix 1

Virology Research Centre, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil (W M Souza PhD); Laboratory of Emerging Viruses (M R Amorim MSc, D A Toledo-Teixeira MSc, G F de Souza MSc, S P Muraro MSc, P L Parise BSc, P P Barbosa MSc, K Bispo-dos-Santos BSc, L S Mofatto PhD, C L Simeoni BSc, F Granja PhD, J L Proença-Módena PhD); Autoimmune Research Laboratory (N S Brunetti BSc, A S Farias PhD); Laboratory of Immunoinflammation (A B S P Gomes BSc, M A R Vinolo PhD); and Animal Virology Laboratory (Prof CW Arns PhD), Department of Genetics, Microbiology and Immunology, Institute of Biology, University of Campinas, Campinas, Brazil; Brazilian Biosciences National Laboratory, Brazilian Centre for Research in Energy and Materials, Campinas, Brazil (R Sesti-Costa PhD, L D Coimbra MSc, R E Marques PhD); Hematology



Acid pH Increases SARS-CoV-2 Infection and the Risk of Death by COVID-19

Leandro Jimenez^{1,2}, Ana Campos Codo³, Vanderson de Souza Sampaio^{4,5,6,7}, Antonio E. R. Oliveira¹, Lucas Kaoru Kobo Ferreira¹, Gustavo Gastão Davanzo⁹, Lauer de Brito Monteiro³, João Victor Virgílio-da-Silva³, Mayla Gabriela Silva Borba⁴, Gabriela Fabiano de Souza³, Nathalia Zini⁸, Flora de Andrade Gandolfi⁸, Stéfanie Primon Muraro³, José Luiz Proença-Modena³, Fernando Almeida Val^{4,5,7}, Gisely Cardoso Melo^{4,5}, Wuelton Marcelo Monteiro^{4,5}, Mauricio Lacerda Nogueira⁸, Marcus Vinicius Guimarães Lacerda^{4,5,9}, Pedro M. Moraes-Vieira^{3,10,11} and Helder I. Nakaya^{1,2,12*}

OPEN ACCESS

Edited by:

Hu Zhang,
Sichuan University, China

Reviewed by:

Y. F. Gu,
Zhejiang University, China
Chenyu Sun,
AMITA Health St Joseph Hospital,
United States

*Correspondence:

Helder I. Nakaya
hnakaya@usp.br

Specialty section:

This article was submitted to
Gastroenterology,
a section of the journal
Frontiers in Medicine

Received: 04 December 2020

Accepted: 26 July 2021

Published: 20 August 2021

Citation:

Jimenez L, Campos Codo A, Sampaio VdS, Oliveira AER, Ferreira LKK, Davanzo GG, Brito Monteiro Ld, Victor Virgílio-da-Silva J, Borba MGS, Fabiano de Souza G, Zini N, Andrade Gandolfi Fd, Muraro SP, Luiz Proença-Modena J, Val FA, Cardoso Melo G, Monteiro WM, Nogueira ML, Lacerda MVG, Moraes-Vieira PM and Nakaya HI (2021) Acid pH Increases SARS-CoV-2 Infection and the Risk of Death by COVID-19. *Front. Med.* 8:637885. doi: 10.3389/fmed.2021.637885

¹ Department of Clinical and Toxicological Analyses, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil, ² Scientific Platform Pasteur-University of São Paulo, São Paulo, Brazil, ³ Department of Genetics, Evolution, Microbiology and Immunology, Institute of Biology, University of Campinas, São Paulo, Brazil, ⁴ Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado, Manaus, Brazil, ⁵ Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, Brazil, ⁶ Fundação de Vigilância em Saúde do Amazonas, Manaus, Brazil, ⁷ Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Brazil, ⁸ Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São Paulo, Brazil, ⁹ Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Brazil, ¹⁰ Obesity and Comorbidities Research Center, University of Campinas, São Paulo, Brazil, ¹¹ Experimental Medicine Research Cluster, University of Campinas, São Paulo, Brazil, ¹² Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, Brazil

The severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) can infect a broad range of human tissues by using the host receptor angiotensin-converting enzyme 2 (ACE2). Individuals with comorbidities associated with severe COVID-19 display higher levels of ACE2 in the lungs compared to those without comorbidities, and conditions such as cell stress, elevated glucose levels and hypoxia may also increase the expression of ACE2. Here, we showed that patients with Barrett's esophagus (BE) have a higher expression of ACE2 in BE tissues compared to normal squamous esophagus, and that the lower pH associated with BE may drive this increase in expression. Human primary monocytes cultured in reduced pH displayed increased ACE2 expression and higher viral load upon SARS-CoV-2 infection. We also showed in two independent cohorts of 1,357 COVID-19 patients that previous use of proton pump inhibitors is associated with 2- to 3-fold higher risk of death compared to those not using the drugs. Our work suggests that pH has a great influence on SARS-CoV-2 Infection and COVID-19 severity.

Keywords: COVID-19, pH, SARS-CoV-2, proton pump inhibitors, Barrett's esophagus

INTRODUCTION

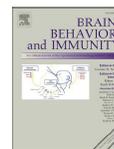
As of August 2020, the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infected over 20 million people worldwide (World Health Organization). The new coronavirus disease 2019 (COVID-19) caused by SARS-CoV-2 is characterized by a broad range of symptoms, from respiratory to neurological and digestive disorders (1, 2). Although a small fraction of patients develops highly lethal pneumonia, at least 20% of COVID-19 patients may display one or more gastrointestinal (GI) symptoms (1), such as diarrhea, vomiting, and abdominal pain (2, 3).



Contents lists available at ScienceDirect

Brain Behavior and Immunity

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ybrbi



Gas6 drives Zika virus-induced neurological complications in humans and congenital syndrome in immunocompetent mice

Joao Luiz Silva-Filho^{a,1}, Lilian G. de Oliveira^{b,1}, Leticia Monteiro^a, Pierina L. Parise^c, Nagela G. Zanluqui^b, Carolina M. Polonio^b, Carla L. de Freitas^b, Daniel A. Toledo-Teixeira^c, William M. de Souza^{d,e}, Najara Bittencourt^a, Mariene R. Amorim^c, Julia Forato^c, Stéfanie P. Muraro^c, Gabriela F. de Souza^c, Matheus C. Martini^c, Karina Bispo-dos-Santos^c, Aline Vieira^c, Carla C. Judice^a, Glaucia M. Pastore^f, Eliana Amaral^g, Renato Passini Junior^g, Helaine M.B.P. Mayer-Milanez^g, Carolina C. Ribeiro-do-Valle^g, Roseli Calil^g, João Renato Bennini Junior^g, Giuliane J. Lajos^g, Albina Altemani^h, Marcos T. Nolasco da Silvaⁱ, Ana Carolina Coan^l, Maria Francisca Colella-Santos^k, Andrea P.B. von Zuben^l, Marco Aurélio R. Vinolo^m, Clarice Weis Arns^m, Rodrigo Ramos Catharinoⁿ, Maria Laura Costa^g, Rodrigo N. Angerami^{l,o}, André R.R. Freitas^l, Mariangela R. Resende^o, Márcia T. Garcia^o, Jean Luiz Moreira^o, Laurent Renia^{p,q}, Lisa F.P. Ng^{p,q}, Carla V. Rothlin^r, Fabio T.M. Costa^{a,*}, Jean Pierre Schatzmann Peron^{b,s,t,*}, José Luiz Proença-Modena^{c,u,*}

^a Laboratory of Tropical Diseases Prof. Luiz Jacintho Silva, Department of Genetics, Evolution, Microbiology and Immunology, Institute of Biology, University of Campinas, Campinas, Brazil

^b Neuroimmune Interactions Laboratory, Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, São Paulo, Brazil

^c Laboratory of Emerging Viruses (LEVE), Department of Genetics, Evolution, Microbiology and Immunology, Institute of Biology, University of Campinas, Campinas, Brazil

^d Virology Research Center, Ribeirão Preto Medical School, University of Sao Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

^e Department of Microbiology and Immunology, University of Texas Medical Branch, Galveston, TX, USA

^f Faculty of Food Engineering, UNICAMP, Brazil

^g Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medical Sciences, University of Campinas, Campinas, Brazil

^h Department of Clinical Pathology, School of Medical Sciences, University of Campinas, Campinas, Brazil

ⁱ Pediatric Immunology, Center for Investigation in Pediatrics, Faculty of Medical Sciences, UNICAMP, Brazil

^j Department of Neurology, School of Medical Sciences, UNICAMP, Brazil

^k Department of Human Development and Rehabilitation, School of Medical Sciences, UNICAMP, Brazil

^l Campinas Department of Public Health Surveillance, Campinas, Brazil

^m Department of Genetics, Microbiology and Immunology, Institute of Biology, UNICAMP, Brazil

ⁿ School of Pharmaceutical Sciences, UNICAMP, Campinas, Brazil

^o Department of Internal Medicine, School of Medical Sciences, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil

^p A*STAR Infectious Diseases Labs (A*ID Labs), Agency for Science, Technology and Research, Biopolis, Singapore

^q Singapore Immunology Network, Agency for Science, Technology and Research, Biopolis, Singapore

^r Department of Immunobiology, Yale University, School of Medicine, New Haven, CT, United States

^s Immunopathology and Allergy Post Graduate Program, School of Medicine, University of Sao Paulo, São Paulo, Brazil

^t Scientific Platform Pasteur-USP, University of Sao Paulo (USP), São Paulo, SP, Brazil

^u Experimental Medicine Research Cluster (EMRC), University of Campinas, Campinas, SP 13063-062, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Zika virus

ABSTRACT

Zika virus (ZIKV) has the ability to cross placental and brain barriers, causing congenital malformations in neonates and neurological disorders in adults. However, the pathogenic mechanisms of ZIKV-induced neurological

* Corresponding authors at: Department of Genetics, Evolution, Microbiology and Immunology, Institute of Biology, University of Campinas, Brazil (F.T.M. Costa, J.L. Proença-Modena), Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Brazil (J.P. Schatzmann Peron).

E-mail addresses: costaftm@unicamp.br (F.T.M. Costa), jeanpierre@usp.br (J.P.S. Peron), jlmodena@unicamp.br (J.L. Proença-Modena).

¹ These authors equally contributed to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2021.08.008>

Received 17 June 2021; Received in revised form 2 August 2021; Accepted 5 August 2021

Available online 11 August 2021

0889-1591/© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved.

Short Article

Elevated Glucose Levels Favor SARS-CoV-2 Infection and Monocyte Response through a HIF-1 α /Glycolysis-Dependent Axis

Ana Campos Codo,^{1,16} Gustavo Gastão Davanzo,^{1,16} Lauro de Brito Monteiro,^{1,16} Gabriela Fabiano de Souza,² Stéfanie Primon Muraro,² João Victor Virgílio-da-Silva,¹ Juliana Silveira Prodonoff,¹ Victor Corasolla Carregari,³ Carlos Alberto Oliveira de Biagi Junior,⁴ Fernanda Crunfli,³ Jefferson Leandro Jimenez Restrepo,⁵ Pedro Henrique Vendramini,³ Guilherme Reis-de-Oliveira,³ Karina Bispo dos Santos,² Daniel A. Toledo-Teixeira,² Pierina Lorencini Parise,² Matheus Cavalheiro Martini,² Rafael Elias Marques,⁶ Helison R. Carmo,⁹ Alexandre Borin,⁶ Lais Durço Coimbra,⁶ Vinicius O. Boldrini,² Natalia S. Brunetti,² Andre S. Vieira,⁷ Eli Mansour,⁸ Raissa G. Ulaf,⁸ Ana F. Bernardes,⁸ Thyago A. Nunes,⁸ Luciana C. Ribeiro,⁸ Andre C. Palma,⁸

(Author list continued on next page)

¹Laboratory of Immunometabolism, Department of Genetics, Evolution, Microbiology and Immunology, Institute of Biology, University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil

²Department of Genetics, Evolution, Microbiology and Immunology, Institute of Biology, University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil

³Department of Biochemistry and Tissue Biology, Institute of Biology, University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil

⁴Department of Genetics at Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

⁵Department of Clinical and Toxicological analyses, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

⁶Brazilian Biosciences National Laboratory (LNBio), Campinas, São Paulo, Brazil

⁷Department of Animal Biology, Institute of Biology, University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil

⁸Department of Internal Medicine, School of Medical Sciences, University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil

⁹Department of Clinical Medicine, School of Medical Sciences, University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil

(Affiliations continued on next page)

SUMMARY

COVID-19 can result in severe lung injury. It remained to be determined why diabetic individuals with uncontrolled glucose levels are more prone to develop the severe form of COVID-19. The molecular mechanism underlying SARS-CoV-2 infection and what determines the onset of the cytokine storm found in severe COVID-19 patients are unknown. Monocytes and macrophages are the most enriched immune cell types in the lungs of COVID-19 patients and appear to have a central role in the pathogenicity of the disease. These cells adapt their metabolism upon infection and become highly glycolytic, which facilitates SARS-CoV-2 replication. The infection triggers mitochondrial ROS production, which induces stabilization of hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) and consequently promotes glycolysis. HIF-1 α -induced changes in monocyte metabolism by SARS-CoV-2 infection directly inhibit T cell response and reduce epithelial cell survival. Targeting HIF-1 α may have great therapeutic potential for the development of novel drugs to treat COVID-19.

INTRODUCTION

COVID-19 is a highly infectious disease caused by the acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2). As of July 3, 2020, the pandemic of COVID-19 had already affected over 10 million people and taken over 500,000 lives according to the Co-

ronavirus Resource Center of John Hopkins University. There is an urgent need for treatments and vaccines; however, little is known about the cellular mechanisms that underlie SARS-CoV-2 (CoV-2) infection. The reasons why certain individuals are more prone to develop the severe form of COVID-19 are also elusive, although it is clear that age, cardiovascular

Context and Significance

COVID-19 is a highly infectious disease. There is an urgent need for novel therapeutic approaches to treat COVID-19 disease. Why certain individuals are more prone to develop the severe form of COVID-19 remains elusive. Obese and diabetic people with uncontrolled blood glucose levels have a greater risk to develop the severe form of COVID-19. The cytokine storm observed in severe COVID-19 patients is thought to be associated with dysfunctional adaptive immune response and epithelial cell death. Here we show that elevated glucose and sustained aerobic glycolysis in monocytes directly promote viral replication, cytokine production, and the subsequent T cell dysfunction and lung epithelial cell death. Thus, targeting metabolic pathways may provide new therapeutic strategies to treat COVID-19 disease.





Contents lists available at ScienceDirect

Placenta

journal homepage: <http://www.elsevier.com/locate/placenta>



Technical note

TAM and TIM receptors mRNA expression in Zika virus infected placentas



Guilherme M. Nobrega^{a,b,1}, Ana Paula Samogim^{a,1}, Pierina L. Parise^a,
Emanuella M. Venceslau^b, José Paulo S. Guida^b, Rodolfo R. Japicanga^b, Mariene R. Amorim^a,
Daniel A. Toledo-Teixeira^a, Julia Forato^a, Sílvia R. Consonni^c, Maria Laura Costa^{b,*,2},
José Luiz Proenca-Modena^{a,d,*,2}, The Zika-Unicamp Network³

^a Department of Genetics, Evolution, Microbiology and Immunology, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil

^b Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medical Sciences, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil

^c Department of Biochemistry and Tissue Biology, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil

^d Experimental Medicine Research Cluster (EMRC), University of Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

mRNA expression
Placenta
TAM receptors
TIM receptors
Interferons
Zika virus.

ABSTRACT

To investigate the role of TYRO3, AXL and TIM1 receptors in the Zika virus (ZIKV) cycle, we determined their mRNA expression in different placental sites of ZIKV infected tissue during pregnancy. Unexpectedly, the ZIKV infection was not related with mRNA upregulation of these receptors or changes in expression of type I and III interferons in different placental sites. Instead, a decrease of TYRO3 mRNA expression was observed in positive sites of ZIKV positive placentas in comparison to negative sites. The basis of this downregulation can help to understand how ZIKV persists in placental tissue during pregnancy.

1. Introduction

Zika virus (ZIKV – family *Flaviviridae*, genus *Flavivirus*) is an emerging arbovirus of high global relevance [1–3]. The most striking characteristics associated with the infection of this pathogen are the consequences during pregnancy, with significant adverse gestational and fetal outcomes, known as Congenital Zika Syndrome [4,5]. Due to its capacity for vertical transmission, increasing our understanding of the placenta as the maternal-fetal interface is essential [6].

TAM (TYRO3, AXL and MER) and TIM (T-cell immunoglobulin and mucin domain) receptor families are considered key in the ZIKV infection [7]. These receptors recognize phosphatidylserine (PS) present in apoptotic cell membranes, promoting senescent cell phagocytosis and are essential regulators of immune homeostasis [8,9]. Similar to other Flaviviruses, ZIKV contains PS on its envelope, facilitating viral adsorption and internalization by TAM and TIM directed phagocytosis, and downregulation of the immune response with repercussions on cell transcription [10–17].

The results of previous studies have shown conflicting evidence regarding the relation of ZIKV infection and TAM receptors expression in mouse placental cells [18] while some authors have determined that TIM and TAM are the main putative receptors in human placenta [19]. Therefore, to address the investigation of TYRO3, AXL and TIM1 receptors in natural human placental infection is of key relevance. We hypothesized that ZIKV could induce an increase in the expression of TAM and TIM receptors in placental cells, facilitating its persistence in that organ. Here we report the mRNA expression of these three receptors and the type I (α and β) and III (λ) interferons (IFNs) as immune response indicators in different human placental sites of ZIKV infected placentas during pregnancy.

2. Methods

2.1. Placental samples

The present study investigated placentas from 14 pregnant women

* Corresponding author. Department of Obstetrics and Gynecology, University of Campinas, Brazil.

** Corresponding author. Department of Genetics, Evolution, Microbiology and Immunology, University of Campinas, Brazil.

E-mail addresses: mlaura@unicamp.br (M.L. Costa), jlmodena@unicamp.br (J.L. Proenca-Modena).

¹ Equally contributed as first authors.

² Equally contributed as last authors.

³ A comprehensive list of consortium members appears at the end of the paper.

<https://doi.org/10.1016/j.placenta.2020.09.062>

Received 20 July 2020; Received in revised form 20 September 2020; Accepted 21 September 2020

Available online 28 September 2020

0143-4004/© 2020 Elsevier Ltd. This article is made available under the Elsevier license (<http://www.elsevier.com/open-access/userlicense/1.0/>).



Article

Oropouche Virus Infects, Persists and Induces IFN Response in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells as Identified by RNA PrimeFlow™ and qRT-PCR Assays

Mariene Ribeiro Amorim ^{1,†}, Marjorie Cornejo Pontelli ^{2,†}, Gabriela Fabiano de Souza ¹, Stéfanie Primon Muraro ¹, Daniel A. Toledo-Teixeira ¹, Julia Forato ¹, Karina Bispo-dos-Santos ¹, Natália S. Barbosa ², Matheus Cavalheiro Martini ¹, Pierina Lorenzini Parise ¹, Aline Vieira ¹, Guilherme Paier Milanez ¹, Luis Lamberti Pinto daSilva ², Pritesh Jaychand Lalwani ³, Alessandro Santos Farias ¹, Marco Aurélio Ramirez Vinolo ¹, Renata Sesti-Costa ⁴, Eurico Arruda ^{2,*} and Jose Luiz Proenca-Modena ^{1,*}

- ¹ Department of Genetics, Evolution, Microbiology and Immunology, Institute of Biology, University of Campinas, Campinas 13083-862, Brazil; mariene.ramorim@gmail.com (M.R.A.); gabriela.sfabiano@gmail.com (G.F.d.S.); stefaniemuraro@gmail.com (S.P.M.); teixiradatt@gmail.com (D.A.T.-T.); foratojulia@gmail.com (J.F.); karina.bsantos@hotmail.com (K.B.-d.-S.); crmv2007@hotmail.com (M.C.M.); pierinalp@gmail.com (P.L.P.); allica.vieira@gmail.com (A.V.); guilhermemilanez@gmail.com (G.P.M.); farias.as@gmail.com (A.S.F.); mvinolo@unicamp.br (M.A.R.V.)
- ² Department of Cell Biology and Virology Research Center, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto 14049-900, Brazil; marpontelli@gmail.com (M.C.P.); sbarbosanatalia@gmail.com (N.S.B.); lldasilva@fmrp.usp.br (L.L.P.d.)
- ³ Leônidas and Maria Deane Institute (ILMD), Fiocruz Amazônia, Manaus 69057-070, Brazil; lalwanipritesh@yahoo.com
- ⁴ Hematology and Hemotherapy Center, Medical School of the University of Campinas, Campinas 13083-887, Brazil; renata.sesti@gmail.com
- * Correspondence: eaneto@fmrp.usp.br (E.A.); jlmodena@unicamp.br (J.L.P.-M.); Tel.: +55-16-3315-3337 (E.A.); +55-19-3521-6259 (J.L.P.-M.)
- † These authors contributed equally to this work.

Received: 20 May 2020; Accepted: 5 June 2020; Published: 21 July 2020



Abstract: *Oropouche orthobunyavirus* (OROV) is an emerging arbovirus with a high potential of dissemination in America. Little is known about the role of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) response during OROV infection in humans. Thus, to evaluate human leukocytes susceptibility, permissiveness and immune response during OROV infection, we applied RNA hybridization, qRT-PCR and cell-based assays to quantify viral antigens, genome, antigenome and gene expression in different cells. First, we observed OROV replication in human leukocytes lineages as THP-1 monocytes, Jeko-1 B cells and Jurkat T cells. Interestingly, cell viability and viral particle detection are maintained in these cells, even after successive passages. PBMCs from healthy donors were susceptible but the infection was not productive, since neither antigenome nor infectious particle was found in the supernatant of infected PBMCs. In fact, only viral antigens and small quantities of OROV genome were detected at 24 hpi in lymphocytes, monocytes and CD11c⁺ cells. Finally, activation of the Interferon (IFN) response was essential to restrict OROV replication in human PBMCs. Increased expression of type I/III IFNs, ISGs and inflammatory cytokines was detected in the first 24 hpi and viral replication was re-established after blocking IFNAR or treating cells with glucocorticoid. Thus, in short, our results show OROV is able to infect and remain in low titers in human T cells, monocytes, DCs and B cells as a consequence of an effective IFN response after infection, indicating the possibility of leukocytes serving as a trojan horse in specific microenvironments during immunosuppression.

OPEN **Inflammation markers in the saliva of infants born from Zika-infected mothers: exploring potential mechanisms of microcephaly during fetal development**

Received: 7 March 2018
Accepted: 24 August 2019
Published online: 20 September 2019

Diogo N. de Oliveira¹, Estela O. Lima¹, Carlos F. O. R. Melo¹, Jeany Delafiori¹, Tatiane M. Guerreiro¹, Rafael G. M. Rodrigues¹, Karen N. Morishita¹, Cynthia Silveira², Stéfanie Primon Muraro³, Gabriela Fabiano de Souza³, Aline Vieira³, Antônio Silva⁴, Rosângela F. Batista⁴, Maria J. R. Doriçui⁴, Patrícia S. Sousa⁴, Guilherme P. Milanez³, José L. Proença-Módena³, Denise P. Cavalcanti² & Rodrigo R. Catharino¹

Zika virus (ZIKV) has emerged as one of the most medically relevant viral infections of the past decades; the devastating effects of this virus over the developing brain are a major matter of concern during pregnancy. Although the connection with congenital malformations are well documented, the mechanisms by which ZIKV reach the central nervous system (CNS) and the causes of impaired cortical growth in affected fetuses need to be better addressed. We performed a non-invasive, metabolomics-based screening of saliva from infants with congenital Zika syndrome (CZS), born from mothers that were infected with ZIKV during pregnancy. We were able to identify three biomarkers that suggest that this population suffered from an important inflammatory process; with the detection of mediators associated with glial activation, we propose that microcephaly is a product of immune response to the virus, as well as excitotoxicity mechanisms, which remain ongoing even after birth.

With the recent outbreak of ZIKV infection in Brazil in 2015 and 2016, followed by the intimate association between this infection and the increase in microcephaly, well-documented by case reports, public health authorities throughout the country assumed a state of alert that impacted the worldwide health community^{1,2}. The neurotropism of ZIKV in adults and children has been studied in the last years, and viral pathogenesis is known to lead to autoimmune aggravations such as the Guillain-Barré syndrome^{3,4}. Effects on infected pregnant women are even more devastating, as ZIKV is able to cross the placental and blood-brain barriers, causing disruptions in the developing brain of the fetus, impairing the growth of neural progenitor cells (NPCs), which ultimately lead to brain damage^{5–7}. Furthermore, the role of ZIKV as a teratogen is strongly implicated from an epidemiological point of view, and the phenotypic spectrum of CZS has been accurately described and outlined by neuroimaging techniques^{8,9}.

Studies detailing the pathophysiological effects and the cell machinery involved in ZIKV infection and proliferation are providing clearer information on the viral replication cycle, as research advances towards effective screening methods for viral detection in human fluids¹⁰. The mechanisms leading to neural underdevelopment in human NPCs, nonetheless, remain little known¹¹. Recent literature reports rely on the hypothesis that ZIKV promotes impaired NPCs growth, with associated apoptotic events, exerting similar effects over the systems of both newborns and adults¹². The idea of interfering in the replication of cells with high metabolic rate has even

¹Innovare Biomarkers Laboratory, School of Pharmaceutical Sciences, University of Campinas, Campinas, Brazil. ²Medical Genetics Department, School of Medical Sciences, University of Campinas, Campinas, Brazil. ³Emerging Viruses Study Laboratory, Department of Genetics, Evolution, Microbiology and Immunology, Biology Institute, University of Campinas, Campinas, Brazil. ⁴Public Health Department, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, Brazil. Correspondence and requests for materials should be addressed to R.R.C. (email: rrc@g.unicamp.br)

ANEXO III- ARTIGOS SUBMETIDOS OU EM FASE DE PUBLICAÇÃO

-Estudo sobre o controle viral de MAVS e IFN do tipo I na placenta durante a infecção por ZIKV.

Autores: Yael Alippe, Reyan Coskun, Stefanie Muraro, Fang R. Zhao, Michelle Elam-Noll, Michael J. White, Diana Vota, Vanesa Hauk, Leran Wang, Scott Handley e Michael S. Diamond.

Universidades envolvidas: Washington University School of Medicine, Universidade de Campinas e Universidad de Buenos Aires.

-Estudo sobre o papel da diacerein na replicação do vírus SARS-CoV-2.

Autores: Helison R. P. Carmo, Alejandro Rossel Castillo, Isabella Bonilha, Erica I. L. Gomes, Joaquim Barreto, Filipe A. Moura, Gustavo Gastão Davanzo, Ana Campos Codo, Lauar de Brito Monteiro, Stéfanie Primon Muraro, Gabriela Fabiano de Souza, Joseane Morari, Flávia Elisa Galdino, Natália Brunetti Silva, Guilherme Reis-de-Oliveira, Victor Corasolla Carregari, Wilson Nadruz, Daniel Martins-de-Souza, Alessandro S. Farias, Licio A. Velloso, José Luiz Proença-Modena, Marcelo A. Mori, Watson Loh, Deepak L. Bhatt, Derek Yellon, Sean M Davidson¹, Pedro Gonçalves de Oliveira, Pedro M. Moraes-Vieira, Andrei C. Sposito.

Universidades e institutos envolvidos: Universidade de Campinas, Harvard Medical School, Brazilian Center for Research in Energy and Materials, D'Or Institute for Research and Education, Icahn School of Medicine at Mount Sinai, University College London, Universidade de São Paulo e Santa Casa de São Paulo School of Medical Sciences.

-Estudo sobre o papel dos neutrófilos na infecção por ZIKV.

Autores: Nágela Ghabdan Zanluqui; Lilian Gomes de Oliveira; Carolina Manganeli Polonio; Tábata Takahashi França; Patrick da Silva; Gabriela Fabiano de Souza; Stefanie Primon Muraro; Mariene Ribeiro Amorim; Victor Corasolla; Caroline Brandão-Teles; Marília Garcia de Oliveira; Malika Aid-Boudries; Sandra Márcia Muxel; Rafael Freitas de Oliveira França; Marielton Passos da Cunha; Maurício Lacerda Nogueira; Anderson Sá-Nunes; Dan Barouch; Daniel Martins de-Souza; Antonio Condino-Neto; José Luís Proença-Módena; Jean Pierre Schatzmann Peron.

Universidades e institutos envolvidos: Universidade de Campinas, Universidade de São Paulo e Scientific Platform Pasteur-USP.

-Estudo sobre o papel de Myd88 na resposta humoral ao vírus Oropouche.

Autores: Daniel A. Toledo-Teixeira, Matheus C. Martini, Pierina L. Parise, Mariene R. Amorim, Bruno S. Brito, Camila L. Simeoni, Karina Bispo-dos-Santos, Aline Vieira, Julia Forato, Natália S. Brunetti, Gabriela F. de Souza, Stéfanie P. Muraro, Priscilla P. Barbosa, Valquíria A. Matheus, Fabiana Granja, Pritesh Lalwani, Marco Aurélio R. Vinolo, Guilherme P. Milanez, Ceri A. Fielding, William Marciel de Souza, Alessandro S. Farias, David A. Price, Michael S. Diamond, Eduardo L. V. Silveira, José Luiz Proença-Modena.

Universidades e institutos envolvidos: Universidade de Campinas, Universidade de Roraima, Instituto Leônidas e Maria Deane, Fiocruz, Cardiff University School of Medicine, University of Kentucky, University of Texas Medical Branch, Washington University School of Medicine, Universidade de São Paulo.

ANEXO IV –CEUA UNICAMP



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **O papel das vias de reconhecimento inato e dos interferons do tipo I e III na quebra da barreira placentária após infecção por OROV**, registrada com o nº **5302-1/2019**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. José Luiz Proença Mòdena e Stéfanie Primon Muraro, Gabriela Fabiano de Souza, Matheus Cavalheiro Martini, Daniel Augusto de Toledo Teixeira**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais** da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP, em reunião de **11/07/2019**.

| | |
|--|---|
| Finalidade: | <input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica |
| Vigência do projeto: | 01/09/2019 a 01/02/2023 |
| Vigência da autorização para manipulação animal: | 11/07/2019 a 01/02/2023 |
| Espécie / linhagem/ raça: | Camundongo isogênico / C57BL/6J |
| No. de animais: | 12 |
| Idade/Peso: | 0.00 Dias / 2.00 Gramas |
| Sexo: | 6 Machos 6 Fêmeas |
| Espécie / linhagem/ raça: | Camundongo isogênico / C57BL/6J |
| No. de animais: | 12 |
| Idade/Peso: | 0.00 Dias / 2.00 Gramas |
| Sexo: | 6 Machos 6 Fêmeas |
| Espécie / linhagem/ raça: | Camundongo isogênico / C57BL/6J |
| No. de animais: | 12 |
| Idade/Peso: | 0.00 Dias / 2.00 Gramas |
| Sexo: | 6 Machos 6 Fêmeas |
| Espécie / linhagem/ raça: | Camundongo isogênico / C57BL/6J |
| No. de animais: | 12 |
| Idade/Peso: | 0.00 Dias / 2.00 Gramas |
| Sexo: | 6 Machos 6 Fêmeas |
| Espécie / linhagem/ raça: | Camundongo isogênico / C57BL/6J |
| No. de animais: | 12 |
| Idade/Peso: | 0.00 Dias / 2.00 Gramas |
| Sexo: | 6 Machos 6 Fêmeas |
| Espécie / linhagem/ raça: | Camundongo isogênico / C57BL/6J |
| No. de animais: | 12 |
| Idade/Peso: | 4.00 Semanas / 20.00 Gramas |
| Sexo: | 6 Machos 6 Fêmeas |
| Espécie / linhagem/ raça: | Camundongo isogênico / C57BL/6J |
| No. de animais: | 12 |
| Idade/Peso: | 4.00 Semanas / 20.00 Gramas |
| Sexo: | 6 Machos 6 Fêmeas |
| Espécie / linhagem/ raça: | Camundongo Knockout / B6 (Cg)- Ifnar1 tm1.2Ees/J |
| No. de animais: | 12 |
| Idade/Peso: | 0.00 Dias / 2.00 Gramas |
| Sexo: | 6 Machos 6 Fêmeas |

| | |
|----------------------------------|---|
| Espécie / linhagem/ raça: | Camundongo Knockout / B6 (Cg)- Ifnar1tm1.2Ees/J |
| No. de animais: | 12 |
| Idade/Peso: | 0.00 Dias / 2.00 Gramas |
| Sexo: | 6 Machos 6 Fêmeas |
| Espécie / linhagem/ raça: | Camundongo Knockout / B6 (Cg)- Ifnar1tm1.2Ees/J |
| No. de animais: | 12 |
| Idade/Peso: | 0.00 Dias / 2.00 Gramas |
| Sexo: | 6 Machos 6 Fêmeas |
| Espécie / linhagem/ raça: | Camundongo Knockout / B6 (Cg)- Ifnar1tm1.2Ees/J |
| No. de animais: | 12 |
| Idade/Peso: | 0.00 Dias / 2.00 Gramas |
| Sexo: | 6 Machos 6 Fêmeas |
| Espécie / linhagem/ raça: | Camundongo Knockout / B6 (Cg)- Ifnar1tm1.2Ees/J |
| No. de animais: | 12 |
| Idade/Peso: | 0.00 Dias / 2.00 Gramas |
| Sexo: | 6 Machos 6 Fêmeas |
| Espécie / linhagem/ raça: | Camundongo Knockout / B6 (Cg)- Ifnar1tm1.2Ees/J |
| No. de animais: | 12 |
| Idade/Peso: | 0.00 Dias / 2.00 Gramas |
| Sexo: | 6 Machos 6 Fêmeas |
| Espécie / linhagem/ raça: | Camundongo Knockout / B6 (Cg)- Ifnar1tm1.2Ees/J |
| No. de animais: | 12 |
| Idade/Peso: | 4.00 Semanas / 20.00 Gramas |
| Sexo: | 6 Machos 6 Fêmeas |
| Espécie / linhagem/ raça: | Camundongo Knockout / B6 (Cg)- Ifnar1tm1.2Ees/J |
| No. de animais: | 12 |
| Idade/Peso: | 4.00 Semanas / 20.00 Gramas |
| Sexo: | 6 Machos 6 Fêmeas |
| Espécie / linhagem/ raça: | Camundongo Knockout / B6;129-Mavstm1Zjc/J |
| No. de animais: | 12 |
| Idade/Peso: | 0.00 Dias / 2.00 Gramas |
| Sexo: | 6 Machos 6 Fêmeas |
| Espécie / linhagem/ raça: | Camundongo Knockout / B6;129-Mavstm1Zjc/J |
| No. de animais: | 12 |
| Idade/Peso: | 0.00 Dias / 2.00 Gramas |
| Sexo: | 6 Machos 6 Fêmeas |
| Espécie / linhagem/ raça: | Camundongo Knockout / B6;129-Mavstm1Zjc/J |
| No. de animais: | 12 |
| Idade/Peso: | 0.00 Dias / 2.00 Gramas |
| Sexo: | 6 Machos 6 Fêmeas |
| Espécie / linhagem/ raça: | Camundongo Knockout / B6;129-Mavstm1Zjc/J |
| No. de animais: | 12 |
| Idade/Peso: | 0.00 Dias / 2.00 Gramas |
| Sexo: | 6 Machos 6 Fêmeas |
| Espécie / linhagem/ raça: | Camundongo Knockout / B6;129-Mavstm1Zjc/J |
| No. de animais: | 12 |
| Idade/Peso: | 4.00 Semanas / 20.00 Gramas |
| Sexo: | 6 Machos 6 Fêmeas |
| Espécie / linhagem/ raça: | Camundongo Knockout / B6;129-Mavstm1Zjc/J |
| No. de animais: | 12 |
| Idade/Peso: | 4.00 Semanas / 20.00 Gramas |
| Sexo: | 6 Machos 6 Fêmeas |

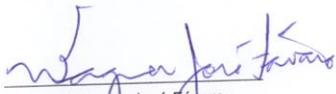
| | |
|----------------------------------|---|
| Espécie / linhagem/ raça: | Camundongo heterogênico / B6 (Cg)- Ifnar1tm1.1Ees/J x Ifnar+/- |
| No. de animais: | 12 |
| Idade/Peso: | 0.00 Dias / 2.00 Gramas |
| Sexo: | 6 Machos 6 Fêmeas |
| Espécie / linhagem/ raça: | Camundongo heterogênico / B6 (Cg)- Ifnar1tm1.1Ees/J x Ifnar+/- |
| No. de animais: | 12 |
| Idade/Peso: | 0.00 Dias / 2.00 Gramas |
| Sexo: | 6 Machos 6 Fêmeas |
| Espécie / linhagem/ raça: | Camundongo heterogênico / B6 (Cg)- Ifnar1tm1.1Ees/J x Ifnar+/- |
| No. de animais: | 12 |
| Idade/Peso: | 0.00 Dias / 2.00 Gramas |
| Sexo: | 6 Machos 6 Fêmeas |
| Espécie / linhagem/ raça: | Camundongo heterogênico / B6 (Cg)- Ifnar1tm1.1Ees/J x Ifnar+/- |
| No. de animais: | 12 |
| Idade/Peso: | 0.00 Dias / 2.00 Gramas |
| Sexo: | 6 Machos 6 Fêmeas |
| Espécie / linhagem/ raça: | Camundongo heterogênico / B6 (Cg)- Ifnar1tm1.1Ees/J x Ifnar+/- |
| No. de animais: | 12 |
| Idade/Peso: | 0.00 Dias / 2.00 Gramas |
| Sexo: | 6 Machos 6 Fêmeas |
| Espécie / linhagem/ raça: | Camundongo heterogênico / B6 (Cg)- Ifnar1tm1.1Ees/J x Ifnar+/- |
| No. de animais: | 12 |
| Idade/Peso: | 4.00 Semanas / 20.00 Gramas |
| Sexo: | 6 Machos 6 Fêmeas |
| Espécie / linhagem/ raça: | Camundongo heterogênico / B6;129P2-Lyz2tm1(cre)Ifo/J Ifnar(flox/flox) |
| No. de animais: | 12 |
| Idade/Peso: | 0.00 Dias / 2.00 Gramas |
| Sexo: | 6 Machos 6 Fêmeas |
| Espécie / linhagem/ raça: | Camundongo heterogênico / B6;129P2-Lyz2tm1(cre)Ifo/J Ifnar(flox/flox) |
| No. de animais: | 12 |
| Idade/Peso: | 0.00 Dias / 2.00 Gramas |
| Sexo: | 6 Machos 6 Fêmeas |
| Espécie / linhagem/ raça: | Camundongo heterogênico / B6;129P2-Lyz2tm1(cre)Ifo/J Ifnar(flox/flox) |
| No. de animais: | 12 |
| Idade/Peso: | 0.00 Dias / 2.00 Gramas |
| Sexo: | 6 Machos 6 Fêmeas |
| Espécie / linhagem/ raça: | Camundongo heterogênico / B6;129P2-Lyz2tm1(cre)Ifo/J Ifnar(flox/flox) |
| No. de animais: | 12 |
| Idade/Peso: | 0.00 Dias / 2.00 Gramas |
| Sexo: | 6 Machos 6 Fêmeas |
| Espécie / linhagem/ raça: | Camundongo heterogênico / B6;129P2-Lyz2tm1(cre)Ifo/J Ifnar(flox/flox) |



| | |
|--|---|
| No. de animais: | 12 |
| Idade/Peso: | 0.00 Dias / 2.00 Gramas |
| Sexo: | 6 Machos 6 Fêmeas |
| Espécie / linhagem/ raça: | Camundongo heterogênico / B6.129P2-Lyz2tm1(cre)Ifo/J Ifnar(flox/flox) |
| No. de animais: | 12 |
| Idade/Peso: | 0.00 Dias / 2.00 Gramas |
| Sexo: | 6 Machos 6 Fêmeas |
| Espécie / linhagem/ raça: | Camundongo heterogênico / B6.129P2-Lyz2tm1(cre)Ifo/J Ifnar(flox/flox) |
| No. de animais: | 12 |
| Idade/Peso: | 4.00 Semanas / 20.00 Gramas |
| Sexo: | 6 Machos 6 Fêmeas |
| Espécie / linhagem/ raça: | Camundongo heterogênico / B6.129P2-Lyz2tm1(cre)Ifo/J Ifnar(flox/flox) |
| No. de animais: | 12 |
| Idade/Peso: | 4.00 Semanas / 20.00 Gramas |
| Sexo: | 6 Machos 6 Fêmeas |
| Espécie / linhagem/ raça: | Camundongo Knockout / B6.129P2(SJL)Myd88tm1.1Defr/ J |
| No. de animais: | 12 |
| Idade/Peso: | 0.00 Dias / 2.00 Gramas |
| Sexo: | 6 Machos 6 Fêmeas |
| Espécie / linhagem/ raça: | Camundongo Knockout / B6.129P2(SJL)Myd88tm1.1Defr/ J |
| No. de animais: | 12 |
| Idade/Peso: | 0.00 Dias / 2.00 Gramas |
| Sexo: | 6 Machos 6 Fêmeas |
| Espécie / linhagem/ raça: | Camundongo Knockout / B6.129P2(SJL)Myd88tm1.1Defr/ J |
| No. de animais: | 12 |
| Idade/Peso: | 0.00 Dias / 2.00 Gramas |
| Sexo: | 6 Machos 6 Fêmeas |
| Espécie / linhagem/ raça: | Camundongo Knockout / B6.129P2(SJL)Myd88tm1.1Defr/ J |
| No. de animais: | 12 |
| Idade/Peso: | 0.00 Dias / 2.00 Gramas |
| Sexo: | 6 Machos 6 Fêmeas |
| Espécie / linhagem/ raça: | Camundongo Knockout / B6.129P2(SJL)Myd88tm1.1Defr/ J |
| No. de animais: | 12 |
| Idade/Peso: | 0.00 Dias / 2.00 Gramas |
| Sexo: | 6 Machos 6 Fêmeas |
| Espécie / linhagem/ raça: | Camundongo Knockout / B6.129P2(SJL)Myd88tm1.1Defr/ J |
| No. de animais: | 12 |
| Idade/Peso: | 0.00 Dias / 2.00 Gramas |
| Sexo: | 6 Machos 6 Fêmeas |
| Espécie / linhagem/ raça: | Camundongo Knockout / B6.129P2(SJL)Myd88tm1.1Defr/ J |
| No. de animais: | 12 |
| Idade/Peso: | 4.00 Semanas / 20.00 Gramas |
| Sexo: | 6 Machos 6 Fêmeas |
| Espécie / linhagem/ raça: | Camundongo Knockout / B6.129P2(SJL)Myd88tm1.1Defr/ J |
| No. de animais: | 12 |
| Idade/Peso: | 4.00 Semanas / 20.00 Gramas |
| Sexo: | 6 Machos 6 Fêmeas |
| Origem: | Biotério de animais SPF, área de imunologia, DGEB/UNICAMP |
| Biotério onde serão mantidos os animais: | Biotério de Animais SPF, Área de Imunologia, DGEB/IB /UNICAMP |

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização a junto ao **IBAMA**, **SISBIO** ou **CIBio** e é **restrita** a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 24 de setembro de 2019.


Prof. Dr. Wagner José Fávares
Presidente


Rosângela dos Santos
Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

ANEXO V – CEUA USP-SP



Universidade de São Paulo
**Comissão de Ética no
 Uso de Animais**

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "O papel das vias de reconhecimento inato e dos interferons do tipo I e III na quebra da barreira placentária após infecção por OROV", protocolada sob o CEUA nº 6025140319, sob a responsabilidade de **Jean Pierre Schatzmann Peron e equipe; Carolina Manganeli Polonio** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo) (CEUA-ICB/USP) na reunião de 30/08/2019.

We certify that the proposal "The role of innate recognition and type I and III interferon pathway in the rupture of the placental barrier after OROV infection. ", utilizing 120 Isogenics mice (40 males and 80 females), protocol number CEUA 6025140319, under the responsibility of **Jean Pierre Schatzmann Peron and team; Carolina Manganeli Polonio** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Biomedical Sciences Institute (University of São Paulo) (CEUA-ICB/USP) in the meeting of 08/30/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: **48 meses**

Depto/Setor: **Imunologia**

Origem: **Biotério de Experimentação do Departamento de Imunologia**

Espécie: **Camundongos isogênicos**

sexo: **Fêmeas**

Idade ou peso: **8 a 12 semanas**

Linhagem: **SJL**

N amostral: 80

Origem: **Biotério de Experimentação do Departamento de Imunologia**

Espécie: **Camundongos isogênicos**

sexo: **Machos**

Idade ou peso: **8 a 12 semanas**

Linhagem: **SJL**

N amostral: 40

São Paulo, 02 de setembro de 2019

Prof. Dra. Luciane Valéria Sita

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
 Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

Dr. Alexandre Ceroni

Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
 Instituto de Ciências Biomédicas (Universidade de São Paulo)

ANEXO VI – CEP CAISM

Comissão de Pesquisa
CAISM/UNICAMP**PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROJETO DE PESQUISA ANALISADO PELA
COMISSÃO DE PESQUISA/CAISM/UNICAMP**

| IDENTIFICAÇÃO | | |
|---|-----------|--|
| Título do Projeto: "Título do Projeto: O papel das vias de reconhecimento inato e dos interferons do tipo I e III na quebra de barreira placentária após infecções por OROV" | | |
| 1. Pesquisador Responsável: Stefanie Primon Muraro | | |
| 3. Instituição do Pesquisador: Pós graduanda do Instituto de Biologia - UNICAMP | | |
| 4. Local onde será realizada a Pesquisa: Divisão de Obstetria do Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti - Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher- CAISM – da Universidade Estadual de Campinas, | | |
| 5. Nº de inscrição no CEP/FCM: /201 . | 6. Grupo: | 7. Data de apresentação ao CEP: / /201 . |

APRESENTAÇÃO DO PROJETO:

8. Introdução: O vírus Oropouche (OROV) é um arbovírus com potencial de causar 98 epidemias nas regiões mais populosas do Brasil. Os indivíduos infectados com OROV 99 desenvolvem uma doença febril, que pode evoluir para complicações neurológicas e 100 hemorrágicas. Ainda, foi relatado um aumento da incidência de aborto durante as 101 grandes epidemias de OROV. Contudo, os mecanismos patogênicos associados 102 com a quebra da barreira hematoplacentária ainda não estão elucidados. 103 Objetivos: Caracterizar o papel das vias de reconhecimento do sistema imunológico 104 inato e da produção de interferon (I e III) na quebra da barreira hematoplacentária pelo 105 OROV em humanos. Metodologia e Análise dos Dados: Será avaliada a capacidade 106 replicativa, a produção de citocinas e alterações por metabólica induzida por OROV 107 em placentas de humanos em um modelo ex-vivo, utilizando explantes de placentas 108 obtidas de gestantes saudáveis, e não infectadas com arbovírus, e de gestantes com 109 diagnóstico positivo para OROV. A coleta das placentas de gestantes atendidas na 110 maternidade do Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti será realizada em 111 colaboração com a Profa. Dra. Laura Costa do CAISM-Unicamp. Serão coletadas 112 amostras de cerca de 20 placentas (de gestações de termo, sem comorbidades) e 113 utilizadas amostras já armazenadas em Biobanco. Para caracterizar a infecção, 114 analisaremos a cinética de replicação viral em células da placenta, a estrutura tecidual 115 e a presença de apoptose e vírus por ensaios de TUNEL e imunohistoquímica, 116 respectivamente. Para caracterizar o perfil metabólico, serão utilizados explantes em 117 cultura infectados com OROV. Faremos uma análise metabólica em larga escala 118 por espectrometria de massas. Os resultados serão avaliados por ANOVA com o teste 119 de Tukey para múltiplas comparações.

AValiação DOS RISCOS E BENEFÍCIOS:

9. Não são previstos riscos adicionais as pacientes além daqueles envolvidos nos procedimentos a que serão regularmente submetidas.

COMENTÁRIOS E CONSIDERAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

10. Amostras de placenta já são regularmente incluídas no Biobanco e assim, serão utilizadas amostras provenientes do Biobanco de pacientes com suspeita de arbovirose. Caso sejam detectadas amostras positivas para o Oropouche, será solicitada ao Biobanco uma amostra da placenta, já coletada e armazenada e será revisto o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), e do TCLE de Armazenamento em Biobanco para verificar se há concordância na utilização do material biológico do paciente. Os sujeitos incluídos na pesquisa terão TCLE para armazenamento de amostra em Biobanco e TCLE específico para uso do material para experimentos com material "a fresco".

CONSIDERAÇÕES SOBRE OS TERMOS DE APRESENTAÇÃO OBRIGATÓRIA:

11.

| |
|-----------------------|
| RECOMENDAÇÕES: |
| 12. |

| |
|--|
| CONCLUSÕES OU PENDÊNCIAS E LISTA DE INADEQUAÇÕES: |
| 13. |

| | | | |
|--|--|---------------------------------------|---------------------------------------|
| 14. SITUAÇÃO DO PARECER: | | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> Aprovado | <input type="checkbox"/> Não Recomenda a Aprovação | <input type="checkbox"/> Em Pendência | <input type="checkbox"/> Com Destaque |

| | |
|-----------------------------------|--|
| Campinas, 18 de novembro de 2019. | Nome e assinatura do(s) membro(s) relator(es): |
| |  Prof. Dr. Daniela A. Yela Gomes Presidente da Comissão de Pesquisa DTG/CAISM/Unicamp. |

ANEXO VII- CEP UNICAMP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: O Papel das vias de reconhecimento inato e dos interferons do tipo I e III na quebra da barreira placentária após infecção por OROV

Pesquisador: Stefanie Primon Muraro

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 29662120.0.0000.5404

Instituição Proponente: Instituto de Biologia - Unicamp

Patrocinador Principal: Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP
FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.988.378

Apresentação do Projeto:

As informações contidas nos campos "Apresentação do Projeto", "Objetivo da Pesquisa" e "Avaliação dos Riscos e Benefícios" foram obtidas dos documentos apresentados para apreciação ética e das informações inseridas pelo Pesquisador Responsável do estudo na Plataforma Brasil.

Alterações climáticas e ambientais induzidas pela atividade humana têm provocado uma redistribuição de artrópodes em todo o globo, o que impacta diretamente na probabilidade de surgimento de doenças emergentes transmitidas por esses vetores. De fato, muitas das doenças emergentes que surgiram nos últimos 30 anos foram associadas com a disseminação de artrópodes vetores, principalmente aquelas doenças causadas por arbovírus (Arthropodborne virus), como o vírus Dengue (DENV), Oeste do Nilo (WNV), febre amarela (YFV), Zika (ZIKV), Encefalite Japonesa (JEV), Chikungunya (CHIKV), Mayaro (MAYV) e Oropouche (OROV). Uma parte desses vírus se mantém na natureza em vetores artrópodes e reservatórios vertebrados, podendo ser transmitidos diretamente do vetor para um hospedeiro humano, como observado para CHIKV, DENV, ZIKV e OROV. Já outros arbovírus precisam ser amplificados em hospedeiros intermediários para serem transmitidos por vetores para humanos. As doenças associadas aos arbovírus podem variar desde manifestações febris não específicas, até doenças hemorrágicas ou que envolvam inflamação articular crônica ou acometimento neurológico. Além disso, alguns arbovírus podem induzir malformações fetais quando mulheres são infectadas durante a gestação, como foi

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.988.378

observado em 2015 no Brasil durante a epidemia de ZIKA. A infecção por arbovírus na placenta pode resultar em efeitos teratogênicos no feto, altos níveis de vírus no neonato, baixo peso ao nascer e prematuridade. No Brasil, muitos arbovírus poderiam, em tese, causar grandes epidemias nas regiões mais densamente povoadas do no país, como o Nordeste, Sul e Sudeste. Dentre esses arbovírus, destacam-se os vírus MAYV e OROV. Entretanto, apesar do potencial emergente desses agentes, pouco se sabe sobre os mecanismos patogênicos associados ao desenvolvimento de doença por esse vírus. Além disso, pouco se sabe sobre o potencial teratogênico desses agentes. Baseado em indícios epidemiológicos, pretendemos avaliar o potencial teratogênico de OROV e os mecanismos associados ao dano placentário após infecção por esse vírus em modelo murino. -Vírus Oropouche (OROV) Oropouche (OROV) é um arbovírus silvestre da família Peribunyaviridae, gênero Orthobunyavirus, sorogrupo Simbu que infecta preguiças, primatas não humanos, algumas espécies de aves e seres humanos na Região Amazônica. Esse vírus foi documentado pela primeira vez em Vega do Oropouche em Trinidad e Tobago no ano de 1955 e cinco anos depois foi detectado pela primeira vez no Brasil. Desde a sua detecção, mais de trinta surtos e epidemias de OROV foram documentadas nas regiões Norte e Nordeste do Brasil. Dados epidemiológicos recentes demonstraram casos do OROV na Argentina, Bolívia, Colômbia, Equador e Venezuela. OROV é um vírus envelopado, que possui um genoma composto por três segmentos de RNA de fita simples de polaridade negativa (denominados S, M e L). O sequenciamento desses segmentos permitiu a identificação de quatro genótipos virais, três (I, II e III) descritos até os anos 2000 e um (IV) identificado depois de 2010 no Brasil. OROV é transmitido em ambiente silvestre pela picada de mosquitos *Aedes Serratus* e *Coquillettidia venezuelensis*. Em ambientes urbanos, sua transmissão é principalmente sustentada pela picada de *Culicoides paraenses*, uma mosca hematófaga. Existem mais de mil espécies de *Culicoides*, e muitos deles atuam como vetores na transmissão de diversos arbovírus de importância clínica e veterinária. OROV leva ao desenvolvimento de uma doença febril exantemática conhecida como febre do OROV que se caracteriza pela presença de sintomas como febre alta, cefaleia, mialgia, erupções cutâneas, fotofobia, dor retro orbital e poliúria. Aproximadamente 60% dos pacientes podem apresentar recorrência dos sintomas agudos após uma semana do desaparecimento dos sintomas e uma pequena parte dos indivíduos infectados podem desenvolver complicações clínicas. De fato, OROV já foi detectado no líquido cefalorraquidiano de pacientes com meningite asséptica e meningoencefalite. A grande similaridade clínica observada entre a infecção por OROV e aquela causada por outros arbovírus, como Dengue, Zika e Chikungunya, gera dificuldades diagnósticas e faz com que os casos de OROV sejam subnotificados, principalmente em regiões endêmicas.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.988.378

Levando isso em consideração estima-se que mais de meio milhão de pessoas já foram infectadas pelo OROV nas Américas. Pouco se conhece sobre a patogênese do vírus Oropouche. Estudos experimentais utilizando modelos animais e pacientes positivos para OROV tem contribuído para uma melhor compreensão da resposta imunológica e patogênese do vírus. Santos e colaboradores demonstraram em um modelo de infecção em célula HeLa que a entrada desse vírus é mediada por endocitose dependente de clatrina, visto que o tratamento com clorpromazina foi capaz de inibir a replicação do OROV. Além disso, foi demonstrado que OROV é capaz de induzir apoptose in vitro, num mecanismo dependente da liberação de citocromo C mitocondrial e ativação das caspases 3 e 9. Camundongos imunocompetentes adultos não são susceptíveis a infecção por OROV. Desse modo, os primeiros modelos animais descritos para OROV foram desenvolvidos após infecção intracerebral em camundongos lactentes ou hamsters adultos. Em camundongos recém-nascidos, a inoculação via intracerebral leva ao desenvolvimento de encefalite focal. A inoculação subcutânea de OROV em golden hamster leva ao desenvolvimento de uma doença grave, caracterizada pela presença de viremia e detecção viral no fígado e cérebro com confirmação histopatológica de meningoencefalite e hepatite. Similarmente, camundongos recém-nascidos infectados com OROV pela via subcutânea desenvolvem encefalite, hiperplasia do baço e meningite branda. Por fim, foi demonstrado em camundongos neonatos que OROV foi capaz de chegar ao sistema nervoso central (SNC). Assim, podemos concluir que OROV é um vírus hepatotrópico e neurotrópico em modelos animais, o que possivelmente reflete alguns aspectos da infecção em humanos, visto que aproximadamente 5% dos pacientes infectados podem desenvolver sintomas clínicos condizentes com acometimento do SNC. A rápida produção de IFN do tipo I e III e a ativação das vias de sinalização desencadeadas por essas citocinas são eventos chaves para a proteção contra infecções por arbovírus. O reconhecimento viral se dá pela identificação de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), por receptores de reconhecimento padrão (PRRs). A ligação dos PAMPs aos PRRs ativa a produção de diversas citocinas e quimiocinas, que controla a replicação viral no início da infecção e modula a resposta imune adaptativa. Após o reconhecimento pelos PRRs, são ativadas vias de sinalização que convergem para a transcrição de IFN do tipo I. Assim, no início da infecção, as células reconhecem os patógenos através dos PRRs e passam a produzir e liberar IFN- β . Uma vez secretado, o IFN- β liga-se ao seu receptor (IFNAR) em células vizinhas levando a uma diminuição da síntese proteica e o estabelecimento de um estado antiviral, que é crítico para o controle da infecção pela maioria dos vírus conhecidos. O estabelecimento desse estado antiviral pela produção de IFN do tipo I leva a ativação de elementos responsivos estimulados por IFN (ISRE) e, conseqüentemente, a transcrição de genes estimulados por interferon

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.988.378

(ISGs), que são componentes chaves da resposta imune inata e adaptativa. Além do IFN do tipo I, existem mais dois tipos de IFN em mamíferos: o IFN do tipo II (IFN- γ) e o IFN do tipo III (IFN- ω). O IFN do tipo III é produzido por um grande número de células e consegue induzir um forte estado antiviral. A indução de IFN do tipo III também ocorre após o reconhecimento do patógeno pelos PRRs, e como o IFN do tipo I, depende da ativação de fatores de transcrição tais como NF-B, IRF-3 e IRF-7. Em camundongos, a ação do IFN do tipo III está restrita às células presentes nos tecidos epiteliais de mucosas. Em humanos, além das mucosas, as células presentes no fígado também são capazes de responder ao IFN do tipo III. A resposta dependente de IFN do tipo III em detrimento parcial da resposta por IFN do tipo I em ambientes persistentemente infectados, como observado na associação entre a mucosa intestinal e a microbiota, é indispensável para manutenção da homeostase desses tecidos, afinal IFN do tipo III não é tão tóxico ou tão pró-inflamatório como o IFN do tipo I. Além disso, estudos demonstraram que IFN do tipo III é essencial para a manutenção da barreira hematoencefálica e hematoplacentária após infecção com alguns arbovírus, como WNV e ZIKV. Estudos recentes demonstraram que a resposta imunológica dependente do reconhecimento desse vírus por RLR (RIG-I-like receptors), da sinalização via Mavs (proteína de sinalização antiviral mitocondrial) e da ativação de dos fatores de transcrição IRF-3 e IRF-7 (fator regulador de interferon) é essencial para o controle da replicação viral inicial em modelo murino. De fato, a resposta ao IFN do tipo I é um fator central na resposta contra OROV, pois camundongos nocautes para IFNAR (receptor de interferon do tipo I) são extremamente susceptíveis a infecção e morrem em decorrência de uma replicação viral exacerbada do fígado, que culmina num quadro de falência hepática e na produção de uma grande quantidade de citocinas inflamatórias. Por fim, foi demonstrado que IRF-5, regulador de interferon que é expresso constitutivamente em diversas células hematopoiéticas, essencial no controle da neuroinvasão por OROV. Camundongos nocautes para IRF-5 desenvolvem encefalite num fenômeno associado à persistência viral em DCs e linfócitos B e replicação viral intensa em neurônios. Não existem dados na literatura sobre o papel do IFN do tipo III na infecção por OROV. Dados epidemiológicos levantados durante as grandes epidemias desse vírus na região Amazônica apontam para a possibilidade de OROV causar problemas gestacionais, afinal houve um aumento da incidência de abortos durante as epidemias de OROV. Além disso, dados não publicados desenvolvidos por um aluno do Prof. Dr. Eurico Arruda da FMRP-USP mostram que OROV é teratogênico após infecção em ovo embrionado de galinhas e em camundongos C57BL/6. Além disso, o mesmo grupo relata que OROV pode infectar células dissociadas de placentas.

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.988.378

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

O objetivo desse estudo é verificar o papel das vias de reconhecimento imunológico e da produção de interferons do tipo I e III para a quebra da barreira placentária pelo vírus Oropouche. Pretendemos, ainda, caracterizar quais vias de sinalização são ativadas durante a infecção por esse vírus.

Objetivo Secundário:

- Caracterizar a capacidade replicativa do OROV em explantes de placentas de humanos.
- Caracterizar a produção de citocinas induzida por OROV em placentas de humanos em um modelo ex-vivo.
- Identificar possíveis alterações metabólicas resultantes da infecção com OROV, através da metabolômica, nos explantes de placentas de humanas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Não há riscos e desconfortos previsíveis, a participante apenas doará uma amostra de tecido de placenta, a qual será coletada após o parto e expulsão da placenta. Benefícios:

Não existem benefícios diretos para o participante. Mesmo que não haja benefício direto com os resultados da pesquisa, os resultados poderão contribuir para o esclarecimento de processos fisiológicos e também complicações durante a gravidez, sendo uma fonte importante para obtenção de informações acerca da interação materno-fetal.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é de responsabilidade de Stefanie Primon Muraro, com a participação de Maria Laura Costa do Nascimento e de Jose Luiz Proença Modena. Finalidade: Tese de Doutorado. O protocolo está bem escrito, detalhado e claro. A metodologia é adequada e factível. Este estudo será desenvolvido no laboratório de Estudos de Vírus Emergentes no Instituto de Biologia da UNICAMP com amostras de placentas obtidas no Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti, Campinas, São Paulo. Serão também utilizadas amostras armazenadas no Biobanco de placenta do CAISM (Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher). Este estudo é de caráter experimental. Para caracterizar a infecção, serão dissociadas as células da placenta utilizando o protocolo descrito abaixo e será analisada a cinética de replicação de OROV nos tempos 0, 6, 12, 24, 48 e 60h após infecção, serão dosadas as citocinas, caracterizadas a expressão gênica de genes da resposta imune inata e a estrutura tecidual e a presença de apoptose e vírus após 60 horas de infecção por ensaios de TUNEL e imunohistoquímica, respectivamente. Para caracterizar o perfil metabólico, serão

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.988.378

utilizados explantes dissociados, em cultura, e infectados com OROV. Será realizada uma análise metabólica em larga escala por espectrometria de massas. As amostras obtidas do biobanco serão utilizadas para a imunohistoquímica, citometria, dosagem de citocinas e expressão gênica.

Critério de Inclusão: As amostras de placentas utilizadas nesse estudo serão obtidas após o parto de gestantes saudáveis, que não tiveram complicações gestacionais, não apresentaram sintomas clínicos de infecção por arbovirus na gestação, tiveram diagnóstico negativo para arboviroses e que não faziam uso de antimicrobianos nos dois meses que antecederam o parto, preferencialmente gestações de termo, com cesárea eletiva, sem trabalho de parto ou rotura de membrana. A coleta será realizada em colaboração com a Profa. Dra. Maria Laura Costa do CAISM-Unicamp após aprovação pelo comitê de ética em pesquisa humana da Unicamp e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), seguindo o protocolo para coleta sistemática de tecido placentário. Amostras de placenta já são regularmente incluídas no Biobanco e por isso, serão utilizadas amostras provenientes do Biobanco de pacientes com suspeita de arbovirose. O laboratório realiza a detecção de arbovirus, incluindo Oropouche, em amostras (sangue e/ou urina) em gestantes com suspeita de arbovirose (Projeto "Detecção e caracterização de arbovirus em Campinas CEP 56793516 0 0000 5404). Caso sejam detectadas amostras positivas para o Oropouche, será solicitada ao Biobanco uma amostra da placenta, já coletada e armazenada e será revisto o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), e do TCLE de Armazenamento em Biobanco para verificar se há concordância na utilização do material biológico do paciente. Ainda, serão respeitadas as normas de gerenciamento e responsabilidade institucional, com solicitação de autorização.

Critério de Exclusão: Idade inferior a 18 anos; gestação múltipla; uso crônico de corticosteroide nas 3 semanas que antecederam o parto; diagnóstico prévio de lúpus eritematoso sistêmico, doença renal, trombofilia, diabetes, hipertensão crônica em uso de medicação anti-hipertensiva na gestação.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Além do relatório de pesquisa, foi encaminhada a folha de rosto da CONEP assinada pela pesquisadora e complementada por autorização do Diretor do Instituto de Biologia da UNICAMP. Foi encaminhado, também, o parecer favorável da Comissão de Pesquisa do CAISM/UNICAMP. No TCLE a linguagem é clara. Consta o título completo da pesquisa e o nome dos pesquisadores responsáveis. A justificativa da necessidade da pesquisa está clara. Há a descrição dos procedimentos envolvidos. São descritos possíveis riscos e benefícios da participação na pesquisa. Está explicado como será feito o acompanhamento. Está claro o direito de recusa, e que a recusa

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.988.378

não acarretará em consequências para o participante da pesquisa. Está claro que haverá confidencialidade dos dados. Está claro que o TCLE será elaborado em duas vias, e que o participante irá receber uma delas. Há dados do CEP, e formas de contato com o pesquisador. Há campo para a rubrica do participante e do pesquisador nas páginas do TCLE, e estas estão numeradas. Há dados sobre ressarcimentos e indenização por possíveis danos decorrentes da pesquisa. Consta o Termo de Responsabilidade do Pesquisador, no qual o mesmo assegura ter cumprido as exigências da resolução 466/2012 CNS/MS e complementares na elaboração do protocolo e na obtenção do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Recomendações:

- 1-No item "Justificativa e objetivos" corrigir o erro ortográfico na frase da linha 28: "(...) fundamentais para o desenvolvimento do bebê durante a gravidez e proteger o o bebê (...)";
- 2-Adequar a frase do item "Ressarcimento e indenização" para: "A coleta de material não depende de nenhuma consulta adicional, pois ela será realizada durante a sua hospitalização, por isso não haverá ressarcimento. Você terá a garantia ao direito à indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa.".

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Lista de pendências e inadequações emitidas no parecer CEP nº: 3.957.149:

- 1- Quanto ao documento anexado "TCLE.pdf 24/10/2019 20:29:47":
- 1.1-Inserir o item "Procedimentos no TCLE", pois as informações sobre os procedimentos ficaram juntas com as informações do item "Justificativa e objetivos".
- Resposta:O item "Procedimentos", na linha 49, ficou escondido pela figura da rubrica devido a uma desconfiguração no momento em que o arquivo foi convertido para .pdf. O mesmo já foi ajustado.
- Análise: PENDÊNCIA ATENDIDA.
- 1.2-Item "Desconforto e riscos": Cabe ressaltar que, para fins de estabelecimento de banco de amostras biológicas para uso em pesquisas, os termos "doar" e seus derivados não são admitidos, uma vez que uma doação denota que a pessoa que originou a amostra não possui mais poder sobre a destinação da sua amostra (o mesmo vale para "ceder"), diferentemente de uma concessão de uso da amostra para o biobanco e/ou biorrepositório. Solicitamos adequações no TCLE e no documento "Informações Básicas do Projeto" gerado pela Plataforma Brasil.
- Resposta:Foram feitas as seguintes alterações: -Página 2, linha 66-67: Mudança de "a senhora

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.988.378

apenas doará uma amostra de tecido de placenta" para " a senhora apenas concederá uma amostra de tecido de placenta". Na Plataforma Brasil, o mesmo termo foi adequado, na aba de riscos.

Análise:PENDÊNCIA ATENDIDA.

1.3-Item "Ressarcimento e Indenização": O fato da participante da pesquisa ser voluntária não eximi o direito ao ressarcimento de quaisquer despesas que ela tenha para participar da pesquisa. Portanto, a correlação de ser voluntária e não receber o ressarcimento, não está correta. Informar que a participante não terá gastos para participar da pesquisa, pois a coleta de dados será realizado durante o período em que a participante estiver hospitalizada. Além disso, as informações sobre o direito a indenização deverá ser adequada para: "Você terá a garantia ao direito à indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa."

Resposta:-Página 2, linha 85-86: Mudança de "Você é voluntária. A coleta de material não depende de nenhuma consulta adicional, por isso não haverá ressarcimento" para " Você é voluntária e a coleta de material não depende de nenhuma consulta adicional." -Página 2, linha 86-87: Mudança de "Você tem o direito à indenização caso não sejam respeitados o estabelecido por este TCLE" para " Você terá a garantia ao direito à indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa".

Análise:PENDÊNCIA ATENDIDA COM "RECOMENDAÇÕES".Adequar a frase do item "Ressarcimento e indenização" para: "A coleta de material não depende de nenhuma consulta adicional, pois ela será realizada durante a sua hospitalização, por isso não haverá ressarcimento. Você terá a garantia ao direito à indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa.".

1.4-Incluir o item "Acompanhamento e assistência " com as seguintes informações: "Você tem o direito à assistência integral e gratuita devido a danos diretos e indiretos, imediatos e tardios, pelo tempo que for necessário."

Resposta:-Página 2, linha 89-91: Foi adicionado "Acompanhamento e assistência: Você tem o direito à assistência integral e gratuita devido a danos diretos e indiretos, imediatos e tardios, pelo tempo que for necessário".

Análise:PENDÊNCIA ATENDIDA.

1.5- Como as amostras também serão coletadas para o Biobanco, o item "Armazenamento de material" deverá ser excluído e informado no item "Procedimentos" que ao final da pesquisa o material biológico será descartado.Não é possível armazenar material biológico no CAISM para

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.988.378

pesquisa futuras, pois para isso existe o Biobanco.

Resposta:-Página 2, linha 56: Foi adicionado ao final do parágrafo "Ao final da pesquisa o material biológico será descartado". - Página 2: O item e sua descrição "Armazenamento de material: As amostras serão armazenadas para a realização dos testes, quando serão usadas em quase sua totalidade, ou no biobanco, quando autorizado e assinado o termo de armazenamento no biobanco. Aquelas que não forem armazenadas ou utilizadas serão descartadas após inativação com hipoclorito de sódio e esterilização em autoclave (resolução 441/2011 CNS/MS). Desse modo, é necessário consentir que o doador concorda em participar do presente estudo, porém AUTORIZA OU NÃO AUTORIZA o armazenamento do meu material biológico. () AUTORIZO armazenar o meu material biológico. () NÃO AUTORIZO armazenar o meu material biológico, devendo o mesmo ser descartado" foi removido como solicitado.

Análise:PENDÊNCIA ATENDIDA.

1.6- Incluir o item "Procedimentos" a autorização da participante da pesquisa para o pesquisador acessar os dados do prontuário da participante.

Resposta:-Página 2, linha 57-61: Foi adicionado "É necessário consentir que o participante da pesquisa AUTORIZA OU NÃO AUTORIZA o pesquisador a acessar os dados do prontuário do paciente. () AUTORIZO o acesso aos dados do prontuário. () NÃO AUTORIZO o acesso aos dados do prontuário."

Análise:PENDÊNCIA ATENDIDA.

Protocolo de pesquisa aprovado (Vide item acima "Recomendações").

Considerações Finais a critério do CEP:

- O participante da pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (quando aplicável).

- O participante da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (quando aplicável).

- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.988.378

aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.

- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas e aguardando a aprovação do CEP para continuidade da pesquisa. Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.

- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo.

- Lembramos que segundo a Resolução 466/2012, item XI.2 letra e, "cabe ao pesquisador apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento".

- O pesquisador deve manter os dados da pesquisa em arquivo, físico ou digital, sob sua guarda e responsabilidade, por um período de 5 anos após o término da pesquisa.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|--------------------------------|--|------------------------|------------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1312885.pdf | 15/04/2020 13:18:14 | | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura | ProjetoOPVPlacentaStefaniePlataformaBrasil2020.pdf | 15/04/2020 13:17:56 | Stefanie Primon Muraro | Aceito |

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



Continuação do Parecer: 3.988.378

| | | | | |
|---|--|------------------------|------------------------|--------|
| Investigador | ProjetoOPV/PlacentaStefaniePlataforma Brasil2020.pdf | 15/04/2020 13:17:56 | Stefanie Primon Muraro | Aceito |
| Outros | CartaRespostaprojetoOPV/PlacentaStefanie2020.pdf | 15/04/2020 13:09:58 | Stefanie Primon Muraro | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLEverSao2.pdf | 15/04/2020 13:08:12 | Stefanie Primon Muraro | Aceito |
| Folha de Rosto | Folhaderosto.pdf | 02/03/2020 15:00:54 | Stefanie Primon Muraro | Aceito |
| Outros | Parecer.pdf | 10/02/2020 13:49:46 | Stefanie Primon Muraro | Aceito |
| Declaração de Pesquisadores | Pesquisadores.pdf | 24/10/2019 20:37:55 | Stefanie Primon Muraro | Aceito |
| Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco | Biobanco.pdf | 24/10/2019 20:33:07 | Stefanie Primon Muraro | Aceito |
| Orçamento | Orcamento.pdf | 24/10/2019 20:31:12 | Stefanie Primon Muraro | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | Projeto_OPV_Placenta_Plataforma_Brasil.pdf | 24/10/2019 20:30:44 | Stefanie Primon Muraro | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLE.pdf | 24/10/2019 20:29:47 | Stefanie Primon Muraro | Aceito |
| Cronograma | Cronograma.pdf | 24/10/2019 20:28:36 | Stefanie Primon Muraro | Aceito |

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINAS, 24 de Abril de 2020

Assinado por:
Renata Maria dos Santos Celeghini
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126
Bairro: Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887
UF: SP **Município:** CAMPINAS
Telefone: (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

ANEXO VIII- CEP WASHINGTON UNIVERSITY



IACUC Protocol Approval
Animal Welfare Assurance #D16-00245
February 13, 2023

PI: Dr Michael Diamond
CO-PI: Brett Case
From: John Cirrito, Chair
Title: Pathogenesis of Flavivirus Infections
Protocol No. 21-0246
Species: Mouse (*Mus musculus*), Rat

Funding

Agency/Title: National Institute of Allergy and Infectious Diseases/NIH/DHHS/NIAID
Structural and functional basis of ultra-potent CHKV neutralization by human mAb

Agency/Title: National Institute of Allergy and Infectious Diseases/NIH/DHHS/NIAID
Antibody Based Protection against Flavivirus

Agency/Title: National Institute of Allergy and Infectious Diseases/NIH/DHHS/NIAID
Flavivirus NS3-Mediated Immune Escape

Agency/Title: National Institute of Allergy and Infectious Diseases/NIH/DHHS/NIAID
Human neutralizing antibodies for Zika virus

Agency/Title: National Institute of Allergy and Infectious Diseases/NIH/DHHS/NIAID
B Cell Epitope Discovery and Mechanisms of Antibody Protection

Agency/Title: National Institute of Child Health and Human Development/NIH/DHHS/NICHD
Mechanisms of Zika Virus Maternal-Fetal Transmission

Agency/Title: National Institute of Allergy and Infectious Diseases/NIH/DHHS/NIAID
IFN Independent Control of Acute and Chronic Chikungunya Virus Induced Disease

Agency/Title: National Institute of Allergy and Infectious Diseases/NIH/DHHS/NIAID
The DKE-121 strain as a possible new Dengue virus serotype

Agency/Title: National Institute of Allergy and Infectious Diseases/NIH/DHHS/NIAID
Consortium for Immunotherapeutics against Emerging Viral Treats

Agency/Title: National Institute of Allergy and Infectious Diseases/NIH/DHHS/NIAID
Innate Immune Regulation of Zika Virus Infection

Agency/Title: National Institute of Allergy and Infectious Diseases/NIH/DHHS/NIAID

ANEXO IX- DECLARAÇÃO DE DIREITOS AUTORAIS

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **O PAPEL DAS VIAS DE RECONHECIMENTO INATO E DOS INTERFERONS DO TIPO I E III NA QUEBRA DA BARREIRA PLACENTÁRIA APÓS INFECÇÃO POR OROV**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 29 de julho de 2024

Assinatura : Stefanie P. Muraro
Nome do(a) autor(a): **Stefanie Primon Muraro**
RG n.º 1092947678

 Documento assinado digitalmente
JOSE LUIZ PROENÇA MODENA
Data: 29/07/2024 18:26:30-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Assinatura : _____
Nome do(a) orientador(a): **José Luiz Proença Modena**
RG n.º 327440983