



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

Pierina Lorencini Parise

O papel de IRF-5 em células endoteliais e da infecção do sistema nervoso central na patogênese e neurovirulência do vírus Oropouche.

CAMPINAS

2024

Pierina Lorencini Parise

O papel de IRF-5 em células endoteliais e da infecção do sistema nervoso central na patogênese e neurovirulência do vírus Oropouche.

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 Microbiologia.

Orientador: José Luíz Proença Módena

Co-Orientadora: Carla Cristina Judice Maria

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELA
ALUNA PIERINA LORENCINI PARISE E
ORIENTADA PELO JOSÉ LUIZ PROENÇA
MÓDENA.

CAMPINAS

2024

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

P218p Parise, Pierina Lorencini, 1995-
O papel de IRF-5 em células endoteliais e da infecção do sistema nervoso central na patogênese e neurovirulência do vírus Oropouche / Pierina Lorencini Parise. – Campinas, SP : [s.n.], 2024.

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

1. Oropouche orthobunyavirus. 2. Sistema nervoso central. 3. Barreira hematoencefálica. 4. Células endoteliais. I. Módena, José Luiz Proença, 1979-. II. Judice, Carla Cristina, 1976-. III. Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: IRF-5 role in endothelial cells and the central nervous system infection in the pathogenesis and neurovirulence of Oropouche virus

Palavras-chave em inglês:

Oropouche orthobunyavirus
Central nervous system
Blood-brain barrier
Endothelial cells

Área de concentração: Microbiologia

Titulação: Doutora em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

José Luiz Proença Módena [Orientador]
Iranaia Assunção Miranda
Luciana Barros de Arruda
Luciana Pereira Ruas
Marelton dos Passos Cunha

Data de defesa: 27-06-2024

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

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

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0003-2818-1301>

- Currículo Lattes do autor: <https://lattes.cnpq.br/0369817321783792>

Campinas, 27 de junho de 2024.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. José Luiz Proença Módena

Profa. Dra. Iranaia Assunção Miranda

Profa. Dra. Luciana Barros de Arruda

Profa. Dra. Luciana Pereira Ruas

Prof. Dr. Marielton dos Passos Cunha

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 (inserir o nome do programa de pós) da Unidade (inserir o nome da faculdade/instituto).

"A verdadeira viagem de descobrimento não consiste em procurar novas paisagens, e sim em ter novos olhos."

Marcel Proust

*Dedico esse trabalho aos meus amados avós
Maria Amélia Lorencini e Paulo Lorencini Netto
(in memoriam)*

AGRADECIMENTOS

Dedico este espaço para expressar minha gratidão àqueles que me incentivaram e estiveram ao meu lado durante esta jornada acadêmica.

Agradeço a Deus, fonte de sabedoria e inspiração, e a Nossa Senhora Aparecida, por interceder por mim em todos os momentos, iluminando meu caminho e me concedendo serenidade e esperança em meio às dificuldades.

Agradeço aos meus pais Eliete Ap Lorencini Parise e José Carlos Parise que sempre incentivaram meu amor pela leitura, valorizaram a educação e dedicaram esforços incansáveis para me proporcionar a melhor formação possível. Seu exemplo e apoio foram fundamentais em cada passo deste caminho.

Aos meus queridos avós por serem fonte de amor incondicional e sabedoria. À nonna Elza Bizoni Parise e ao nonno Mário Parise pelas orações constantes e à vó Maria Amélia Lorencini (*in memoriam*) e ao vô Paulo Lorencini Netto (*in memoriam*) que continuam a iluminar meu caminho com sua presença amorosa e inspiradora, mesmo na ausência física.

Agradeço ao meu namorado Rafael Makio Yamaguti pelo seu apoio, por celebrar comigo as conquistas e ser minha força e conforto nos momentos difíceis.

Ao meu querido primo Dr. Márcio Lorencini (*in memoriam*) que foi um dos maiores incentivadores desta jornada acadêmica desde o início da minha formação e por ser um exemplo de pessoa generosa e cientista brilhante.

Aos meus leais companheiros de estudo, Luna, Belka, Barack e Marie por estarem sempre ao meu lado durante os longos dias e noites dedicados à leitura e pesquisa.

Aos meus padrinhos, Marcia Nardi, Renata Martinez Rosa, José Rosa e Anderson Fassina agradeço pelas orações e incentivo. E aos meus tios e primos pela torcida nesta caminhada.

À minha querida amiga Fernanda, que tem estado ao meu lado desde o início da graduação, agradeço imensamente pelo apoio em todos os momentos. À Karina e à Ana Lúcia, obrigada por estarem sempre presentes. Ao Sr. João agradeço pelas palavras de conforto e sabedoria.

Agradeço ao professor Dr. José Luiz Proença Módena por ter despertado meu interesse pela virologia e pela sua orientação ao longo de tantos anos. Também agradeço à co-

orientadora, Dra. Carla Judice Maria, pelo valioso auxílio nos experimentos e orientação. Aos queridos colegas de laboratório, Camila, Daniel, Mariene, Aline, Gabriela, Stefanie, Julia, Priscila, Paula, Gabriel e Bruno, agradeço pela amizade, colaboração e troca de conhecimentos que deixaram essa jornada mais leve.

Agradeço à professora Dra. Patricia Aguilar, por ter me recebido em seu laboratório e compartilhado seu conhecimento, proporcionando uma experiência enriquecedora durante minha estadia na UTMB. E aos amigos que fiz durante o BEPE, Deyse, Luciana, Marília, Maxsueli, Giovana, Manuel, Ryan, Rahul, Tilu, Zonia, Rosie, Alice, Natalia, Vidyleison, Rafael e Karen por terem compartilhando as alegrias e desafios, obrigada por terem feito eu me sentir perto de casa.

Às professoras, Dra. Silvia Gatti e Dra. Fabiana Granja, e ao professor Dr. William Maciel de Souza sou grata pelos valiosos ensinamentos e por dedicarem seu tempo para me inspirar e me guiar no meu crescimento como pesquisadora.

À UNICAMP pela oportunidade de receber uma educação de qualidade, e a todos os professores que desde a educação infantil ajudaram a despertar o meu amor pela ciência ao compartilharem seu conhecimento e experiência, moldando meu percurso acadêmico. Agradeço em especial à minha primeira professora “tia” Valquiria.

Agradeço aos membros da banca pela disponibilidade e contribuições para a avaliação deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo número 2017/26908-0, pela concessão da bolsa de doutorado direto no país e financiamento de Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE), processo 2022/04420-3. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Meu profundo respeito e gratidão aos animais de laboratório utilizados nesta pesquisa.

RESUMO

O vírus Oropouche (OROV) é um arbovírus emergente responsável por milhares de casos de doença febril exantemática na região Amazônica. Como outros arbovírus, OROV pode causar complicações neurológicas em uma parte dos pacientes infectados. Embora tenha sido demonstrado que OROV pode atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) e causar infecção no sistema nervoso central (SNC) de camundongos neonatos e hamsters, pouco se sabe sobre os mecanismos patogênicos associados à quebra dessa barreira. Já foi demonstrado que IRF-5, um fator de transcrição ativado após reconhecimento de PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos), é essencial no controle da neuroinvasão de OROV e outros arbovírus como WNV e LACV. Dessa forma, o objetivo deste projeto foi caracterizar o papel da expressão de IRF-5 em células endoteliais para o controle da neuroinvasão por OROV e explorar os fatores associados à infecção viral no SNC. Para tanto, analisamos a mortalidade, o tropismo viral e o infiltrado leucocitário no SNC de animais que não expressam IRF-5 em endotélio, utilizando o sistema Cre/LoxP de recombinação. Também caracterizamos a infecção por OROV e a expressão de genes da resposta imune inata e fatores de adesão endotelial em linhagens estabelecidas de células endoteliais. Além disso, examinamos o efeito de IRF-5 na integridade e passagem de vírus pela barreira endotelial e por modelos complexos que mimetizam a BHE. Por fim, utilizamos técnicas de bio-plex e RNA-seq para explorar a resposta de células humanas do SNC na infecção por OROV. Os resultados mostraram que 35% dos animais nocautes condicionais são vulneráveis à infecção, apresentando sinais de acometimento neurológico, como perda de equilíbrio e paralisia dos membros inferiores, alta carga viral no SNC (entre 10^4 e 10^8 eqFFU/g) e aumento do número e adesão de células imunes a microvasculatura cerebral, mesmo quando a infecção ocorre por meio da transferência de células imunes circulantes infectadas. Dessa forma, concluímos que a expressão e ativação de IRF-5 em células endoteliais é essencial para restringir o acesso ao SNC e a consequente quebra da BHE durante a infecção por OROV *in vivo*. Além disso, OROV infecta de forma produtiva as linhagens estabelecidas de células endoteliais de humanos (HBEC-5i) e murinos (BEND3). Enquanto as células HBEC-5i são altamente suscetíveis e permissivas à infecção por OROV, alcançando títulos entre 10^5 e 10^6 FFU/mL, as células BEND3 são parcialmente resistentes à infecção, com menor quantidade extracelular do vírus atingindo um máximo de 10^4 FFU/mL e sem efeito citopático aparente. Também foi possível observar uma forte resposta antiviral nas células endoteliais infectadas, com aumento da expressão de vias de sinalização, genes estimulados por interferon (ISGs) e fatores de adesão endotelial (ICAM, VCAM, e-selectina e

p-selectina). Ainda assim, não houve modulação na expressão de junções oclusivas ou ruptura da barreira endotelial *in vitro*, apesar de ser possível recuperar vírus na câmara inferior em modelos de *transwell*, indicando que o vírus é capaz de cruzar a barreira endotelial sem causar danos celulares. Por fim, células gliais e neuronais humanas apresentam intensa resposta à infecção viral, com a liberação de citocinas, quimiocinas e modulação de vias celulares.

ABSTRACT

Oropouche virus (OROV) is an emerging arbovirus responsible for thousands of cases of exanthematous febrile illness in the Amazon region. As other arboviruses, OROV can cause neurological complications in a portion of infected patients. Although it has been demonstrated that OROV can cross the blood-brain barrier (BBB) and cause infection in the central nervous system (CNS) of neonate mice and hamsters, little is known about the pathogenetic mechanisms associated with the breakdown of this barrier. It has already been demonstrated that IRF-5 (Interferon regulatory factor 5), a transcription factor activated after recognition of PAMPs (pathogen-associated molecular patterns), is essential in controlling the neuroinvasion of OROV and other arboviruses such as WNV and LACV. Therefore, the objective of this project was to characterize the role of IRF-5 expression in endothelial cells in controlling neuroinvasion by OROV and explore the factors associated with viral infection in the CNS. For this, we analyzed mortality, viral tropism and leukocyte infiltration in the CNS of animals that do not express IRF-5 in the endothelium, using the Cre/LoxP recombination system. We also characterized OROV infection and the expression of innate immune response genes and endothelial adhesion factors in established endothelial cell lines. Furthermore, we examined the effect of IRF-5 on the integrity and passage of viruses across the endothelial barrier and through complex models that mimic the BBB. Finally, we used bio-plex and RNA-seq techniques to explore the response of human CNS cells to OROV infection. The results showed that 35% of the conditional knockout animals are vulnerable to infection, showing signs of neurological impairment as loss of balance and limb paralysis, high viral load in the CNS (between 10^4 and 10^8 eqFFU/g) and increased number and adhesion of immune cells to the brain microvasculature, even when infection occurs through the transference of circulating infected immune cells. Therefore, we conclude that the expression and activation of IRF-5 in endothelial cells is essential to restrict access to the CNS and the consequent breakdown of the BBB during OROV infection in vivo. Furthermore, OROV productively infects established human (HBEC-5i) and murine (BEND3) endothelial cell lines. While HBEC-5i cells are highly susceptible and permissive to OROV infection, reaching titers as high as 10^5 and 10^6 FFU/mL, BEND3 cells are partially resistant to infection reaching a maximum of 10^4 FFU/mL, with lower extracellular amounts of virus and no apparent cytopathic effect. It was also possible to observe a strong antiviral response in infected endothelial cells, with increased expression of signaling pathways, interferon-stimulated genes (ISGs) and endothelial adhesion factors (ICAM, VCAM, e-selectin and p-selectin). Still, there was no modulation in the expression of tight junctions or disruption

of the endothelial barrier in vitro, despite it being possible to recover virus in the lower chamber in transwell models, indicating that the virus is capable of crossing the endothelial barrier without causing cellular damage. Finally, human glial and neuronal cells present an intense response to viral infection, with the release of cytokines, chemokines and modulation of cellular pathways.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Detecção de OROV nas Américas.....	25
Figura 2 - Ativação da resposta de IFN-I/III pela detecção viral através de PRRs.....	32
Figura 3 - Vias de entrada de arbovírus no SNC.....	37
Figura 4 - Sobrevivência, perda de peso e carga viral nos tecidos de animais IRF5f/f e Cdh5cre+IRF5f/f infectados com OROV.....	53
Figura 5 - Análise histológica de tecido cerebral de animais Cdh5cre+IRF5 f/f infectados.....	55
Figura 6 - Microscopia intravital no cérebro de animais infectados Cdh5 cre+ IRF5 f/f não infectados e infectados que apresentavam ou não sinais de acometimento neurológico no momento da coleta.....	57
Figura 7 - Sobrevivência, perda de peso e carga viral nos tecidos de animais CDH5cre+IRF5f/f transfectados com células do baço infectadas com OROV.....	59
Figura 8 - Cinética de replicação e viabilidade em células endoteliais durante infecção por OROV com MOI 1 e 0,1.....	61
Figura 9 - Expressão de genes das vias de reconhecimento e sinalização da resposta imune inata em células endoteliais após infecção com OROV.....	63
Figura 10 - Expressão de Interferon (IFN) e genes estimulados por Interferon (ISGs) em células endoteliais após infecção com OROV.....	64
Figura 11 - Expressão de fatores de adesão endoteliais e junções oclusivas em células endoteliais após infecção com OROV.....	66
Figura 12 - OROV cruza a monocamada de células endoteliais sem causar aumento de permeabilidade.....	69
Figura 13 - Silenciamento de IRF5 em células HBEC-5i infectadas com OROV.....	71
Figura 14 - Diferenciação e infecção de células ReNcells.....	73
Figura 15 - Gráficos de Vulcão da análise de expressão gênica por RNA-seq.....	76

Figura 16 - Análise Bioplex de várias citocinas e quimiocinas nos sobrenadantes de cultura de células ReN.....	78
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Primers utilizados para genotipagem.....	41
Tabela 2 - Primers e sonda utilizados para detecção viral.....	45
Tabela suplementar 1 - Primers utilizados para análises de expressão gênica.....	107

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACTB	Beta Actina
ARC	Proteína Associada ao Citoesqueleto Regulada por Atividade
BEND3	Célula Endotelial de Cérebro de Camundongo
BHE	Barreira Hematoencefálica
Blimp-1	Proteína 1 de Maturação Induzida por Linfócitos B
BMEC	Célula Endotelial da Microvasculatura Cerebral Humana
BMP6	Proteína Morfogenética Óssea 6
BSA	Albumina Sérica Bovina
C57BL/6	Linhagem de Camundongo C57BL/6
CCL2	Quimiocina Ligante de Monócitos 2
CCN1	Fator 1 da Rede de Comunicação Celular
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico Complementar
cGAS	Sintase GMP-AMP Cíclica
CHIKV	Vírus Chikungunya
CTN	Citnectina
CXCL10	Quimiocina 10 do Ligante de C-X-C
CXCL8	Quimiocina 8 do Ligante de C-X-C
CXCR4	Receptor 4 de Quimiocina C-X-C
DAPI	4',6-Diamidino-2-Fenilindol
DENV	Vírus da Dengue
DMEM	Meio de Eagle Modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dpi	Dias Pós-Infecção
e-selectina	Selectina Endotelial
ECIS	Detecção Elétrica de Impedância de Substrato de Célula

eqFFU/g	Equivalente de Unidades Formadoras de Foco por Grama
FGF	Fator de Crescimento Fibroblástico
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
GADD45B	Proteína de Reparo de Danos no DNA 45B
GAPDH	Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase
GFAP	Proteína Ácida Fibrilar Glial
GM-CSF	Fator Estimulante de Colônias de Macrófagos e Granulócitos
GMPR	Guanosina Monofosfato Redutase
HBEC-5i	Célula Endotelial da Microvasculatura Cerebral Isolada do Córtex Humano
HCC	Carcinoma Hepatocelular
HCV	Vírus da Hepatite C
hES	Células-Tronco Embrionárias Humanas
hiPSCs	Células-Tronco Pluripotentes Induzidas Humanas
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
hpi	Horas Pós-Infecção
Huh-7	Célula de Carcinoma Hepatocelular Humano
IAV	Vírus Influenza A
ICAM	Molécula de Adesão Intercelular
IFIT1	Proteína 1 Induzida por Interferon com Repetições Tetratricopeptídicas
IFIT2	Proteína 2 Induzida por Interferon com Repetições Tetratricopeptídicas
IFITM2	Proteína Transmembranar 2 Induzida por Interferon
IFN	Interferon
IFNAR1	Receptor de Interferon Alfa 1
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
IQTV	Vírus Iquitos

IRAK1	Quinase 1 Associada a Receptores de Interleucina
IRF	Fator Regulador de Interferon
ISG	Gene Induzido por Interferon
Jeko-1	Linhagem Celular de Linfoma de Células B
JEV	Vírus da Encefalite Japonesa
Jurkat	Linhagem Celular de Leucemia de Células T Humanas
LACV	Vírus La Crosse
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
MAVS	Proteína Mitocondrial de Sinalização Antiviral
MAYV	Vírus Mayaro
MCP-1	Linhagem Celular de Leucemia de Células T Humanas Jurkat
MDA-5	Proteína 5 Associada à Diferenciação do Melanoma
MDDV	Vírus Madre de Deus
MKI67	Marker of Proliferation Kiel 67
MMP	Matriz Metaloproteinase
MOI	Multiplicidade de Infecção
MTT	3-(4,5-Dimetiltiazol-2yl)-2,5-Difenil Brometo de Tetrazolina
MyD88	Fator de Diferenciação Mielóide 88
NFATC2	Fator de Transcrição Ativado por Ciclosporina 2
NGS	Sequenciamento de Nova Geração
NR4A1	Receptor Nuclear 4A1
OROV	Vírus Oropouche
p-selectina	Selectina Plaquetaria
PABPC1L	Proteína de Ligação Poli(A) Citoplasmática 1
PAMP	Padrão Molecular Associado a Patógenos
PBMC	Células Mononucleares do Sangue Periférico
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato

PDGF-BB	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
PEDV	Vírus Perdões
PFKFB3	Enzima 6-Fosfofruto-2-Quinase/Fosfofruto-2-Bifosfatase 3
PRR	Receptor de Reconhecimento Padrão
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real
RCF	Aceleração Centrífuga Relativa
ReNcell VM	Linhagem Celular de Neurônios Humanos Derivados de Células-Tronco
RLR	Receptor Tipo RIG
RNA	Ácido Ribonucleico
RNA-seq	Sequenciamento de RNA
RPAP2	Subunidade de 2 da Polimerase de RNA Poli(A) Específica
RT-qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real Quantitativa
SDS	Dodecilsulfato de Sódio
SH-SY5Y	Linhagem Celular de Neuroblastoma Humano
siRNA	RNA Interferente Pequeno
SLC6A11	Família de Transportadores de Solutos 6 Membros 11
SNC	Sistema Nervoso Central
SPRY2	Antagonista de Sinalização RTK Brotado 2
STAC2	SH3 e Domínio Rico em Cisteína 2
STAT1	Transdutor de Sinal e Ativador da Transcrição 1
STAT2	Transdutor de Sinal e Ativador da Transcrição 2
SYP	Proteína Sinaptofisina
TEER	Resistência Elétrica Transendotelial
TLR-3/7	Receptor do Tipo Toll
TNF alfa	Fator de Necrose Tumoral Alfa
TRAF6	Fator de Necrose Tumoral do Receptor 6
TRIF	Fator de Interferon Beta Receptor 1

TUNEL	Rotulagem Terminal de Desoxinucleotidil Transferase (TdT) dUTP Nick-Final
VCAM	Molécula de Adesão de Células Vasculares
VEEV	Vírus da Encefalite Equina Venezuelana
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
Vero E6	Linhagem Celular Renal de Macaco Verde Africano
WNV	Vírus do Oeste do Nilo
YFV	Vírus da Febre Amarela
ZIKV	Vírus Zika
ZO-1	Proteína de Oclusão de Junção Zonular 1

Sumário	
INTRODUÇÃO.....	22
Aspectos Gerais	22
<i>Orthobunyavirus Oropouchense</i> (Oropouche virus)	23
Infecção no Sistema Nervoso Central.....	27
Neuropatogênese em modelos animais.....	29
A resposta imune inata na infecção por OROV.....	30
Papel do fator de interferon 5 (IRF-5) na neuropatogênese viral	32
Vias de entrada de patógenos no Sistema Nervoso Central.....	34
JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE.....	38
OBJETIVOS.....	39
Objetivo geral.....	39
Objetivos específicos	39
METODOLOGIA.....	40
Vírus.....	40
Linhagens celulares e animais	40
Experimentação animal.....	41
Microscopia intravital	42
Coloração por ensaio de Hematoxilina e Eosina	42
Isolamento e transferência de células do baço.....	43
Cinética de replicação viral.....	43
Extração de RNA	44
Quantificação gênica por qPCR e RT-qPCR.....	44
Ensaio de viabilidade celular por MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina)	45
Imunofluorescência.....	45
Western Blot	46
Ensaio de Transwell	48
Sensor Elétrico de Impedância de Substrato Celular (ECIS).....	48
RNA interferente pequeno (siRNA)	48
Sistema de Imunoensaio Multiplex Bio-Plex	49
Sequenciamento de RNA e análises de vias gênicas	49

Análise dos resultados.....	50
RESULTADOS	51
A expressão de IRF-5 em células endoteliais é essencial para o controle da quebra da barreira hematoencefálica <i>in vivo</i>	51
Análises histológicas do cérebro de animais com acometimento neurológico.....	54
Aumento da quantidade e adesão de leucócitos no microendotélio cerebral por análise de microscopia intravital.....	56
Entrada de OROV no SNC de animais após transferência de leucócitos infectados.....	58
OROV replica em linhagens de células de microvasculatura endotelial cerebral humanas e murinas.....	60
OROV regula expressão de genes associados à resposta imune inata.....	62
Regulação da expressão de fatores de adesão endoteliais, mas não de junções oclusivas após infecção por OROV	65
Passagem de OROV em sistema de Transwell sem alterações na integridade da barreira...	67
Avaliação da ausência de IRF5 na replicação de OROV nas células endoteliais.....	70
Células neuronais e células da glia diferenciadas de precursoras neurais humanas são permissivas à infecção por OROV	72
A infecção por OROV leva à modulação de genes celulares conforme determinado pelo ensaio de RNA-seq.	75
Liberação de citocinas e quimiocinas no sobrenadante de neurônios e astrócitos diferenciados infectados com OROV.	77
DISCUSSÃO	79
CONCLUSÃO.....	86
REFERÊNCIAS	88
APÊNDICES	98
Publicação como coautora	98
Lista completa de artigos publicados durante o doutoramento.....	101
Tabela suplementar 1 - Primers utilizados para análises de expressão gênica.	107
ANEXOS	109
Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA).....	109
Declaração de que a tese não infringe os dispositivos da lei nº 9610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.....	113
Declaração de direitos autorais da editora.	114

INTRODUÇÃO

Aspectos Gerais

Os arbovírus (*arthropod-borne vírus*) são vírus de RNA pertencentes a diferentes famílias virais que são transmitidos por vetores artrópodes hematófagos para pessoas e animais selvagens e domésticos. Aproximadamente 6,3 bilhões de pessoas vivem em áreas de risco para doenças causadas por vetores artrópodes, concentradas principalmente em regiões tropicais e subtropicais do planeta (Messina et al., 2019). Em 2023 foram registrados mais de 1,5 milhão de casos do vírus da Dengue (DENV) apenas no Brasil (“Boletim Epidemiológico - Volume 54 - nº 13 — Ministério da Saúde,” n.d.). Anualmente é estimado que este vírus cause por volta de 100 milhões de casos e 400 mil mortes, em cerca de 129 países (Messina et al., 2019). Vírus como o Chikungunya (CHIKV), Febre Amarela (YFV), Zika (ZIKV) e Oeste do Nilo (WNV) também são responsáveis por milhares de casos e mortes todos os anos. As estatísticas acerca da infecção por arbovírus foram crescendo nas últimas décadas e atingindo níveis sem precedentes. Estudos indicam que as causas principais podem estar associadas a urbanização, mudanças climáticas e a globalização (de Souza and Weaver, 2024).

Os arbovírus se mantêm na natureza em ciclo enzoótico, o que significa que os vetores artrópodes podem ser infectados ao se alimentar do sangue de animais amplificadores portadores do vírus, que pode ou não se replicar e/ou causar doença nestes animais. Para ser capaz de disseminar a infecção os vetores artrópodes precisam que o vírus se replique no seu organismo. Entre os principais vetores podemos citar os mosquitos dos gêneros *Aedes*, como *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, *Culex quinquefasciatus*, moscas hematófagas como as do gênero *Culicoides* e carrapatos. E seus hospedeiros em ambiente selvagem podem ser dos mais variados grupos de animais, como aves, roedores, primatas, entre outros (Weaver et al., 2018).

A infecção de pessoas neste ciclo se dá por eventos de “*spillover*” onde ocorre a infecção acidental pela picada do vetor artrópode que carrega o vírus replicante. Para que isso ocorra é necessário o contato próximo entre os vetores que circulam o vírus em ambiente selvagem e populações que vivem em áreas florestais. Geralmente esse contato ocorre em locais com intensa ação do homem na natureza, como áreas de degradação ambiental, mineração e pecuária (de Souza and Weaver, 2024; Weaver et al., 2018).

Mudanças ecológicas causadas pelo homem também podem agravar esse cenário, levando a redistribuição de vetores e aparecimento de novos reservatórios animais para esses vírus. Alterações climáticas podem fazer com que os vetores artrópodes tenham sua distribuição geográfica, padrões de reprodução e sobrevivência alterados, afetando assim sua capacidade de transmitir arbovírus (Ortiz et al., 2021).

A transmissão direta entre vetores e humanos também pode ocorrer quando se estabelece o ciclo urbano, ocasionando uma situação de epidemia quando ocorre de forma temporária ou endemia quando o ciclo se torna permanente. Esse tipo de transmissão pode ocorrer quando o vírus se replica com alto título virêmico nos humanos, permitindo a infecção dos vetores pela picada, e também quando existe uma alta disponibilidade de vetores no ambiente urbano (Weaver et al., 2018). Além disso, por serem vírus de RNA, possuem alta taxa de mutação inserida pela RNA polimerase RNA dependente viral durante o processo de transcrição e replicação, permitindo que ocorra uma adaptação do vírus a novos vetores e hospedeiros.

Por ser um crescente desafio a saúde pública, pesquisas que visam o desenvolvimento de vacinas, métodos de diagnóstico, vigilância ambiental, medidas de controle e entender os fatores associados com a resposta imune e patologia são essenciais para o combate a arbovírus circulantes e a preparação em caso de emergência de novos arbovírus. Alguns arbovírus emergentes da região amazônica geram preocupação a saúde pública por serem responsáveis por um grande número de surtos na região, e que tem se intensificado nos últimos anos, como é o caso dos vírus Oropouche (OROV), Mayaro (MAYV) e o vírus da Encefalite Equina Venezuelana (VEEV).

***Orthobunyavirus Oropouchense* (Oropouche vírus)**

O *Orthobunyavirus Oropouchense*, conhecido popularmente como Oropouche vírus (OROV), é pertencente à família *Peribunyaviridae*, gênero *Orthobunyavirus*, sorogrupo Simbu (Hughes et al., 2020). Sua estrutura é de um vírus envelopado, com capsídeo helicoidal e genoma segmentado de RNA polaridade negativa. O genoma de OROV é composto por três segmentos de RNA, denominados small (S), medium (M) e large (L) (Murphy et al., 1973). O segmento S codifica uma proteína estrutural de nucleocapsídeo (N) e uma proteína não estrutural, chamada NSs. Já o segmento M codifica duas glicoproteínas de superfície, denominadas Gc e Gn, e uma proteína não estrutural chamada NSm. Por fim, o segmento L codifica a RNA polimerase RNA dependente (Acrani et al., 2015; Tilston-Lunel et al., 2015).

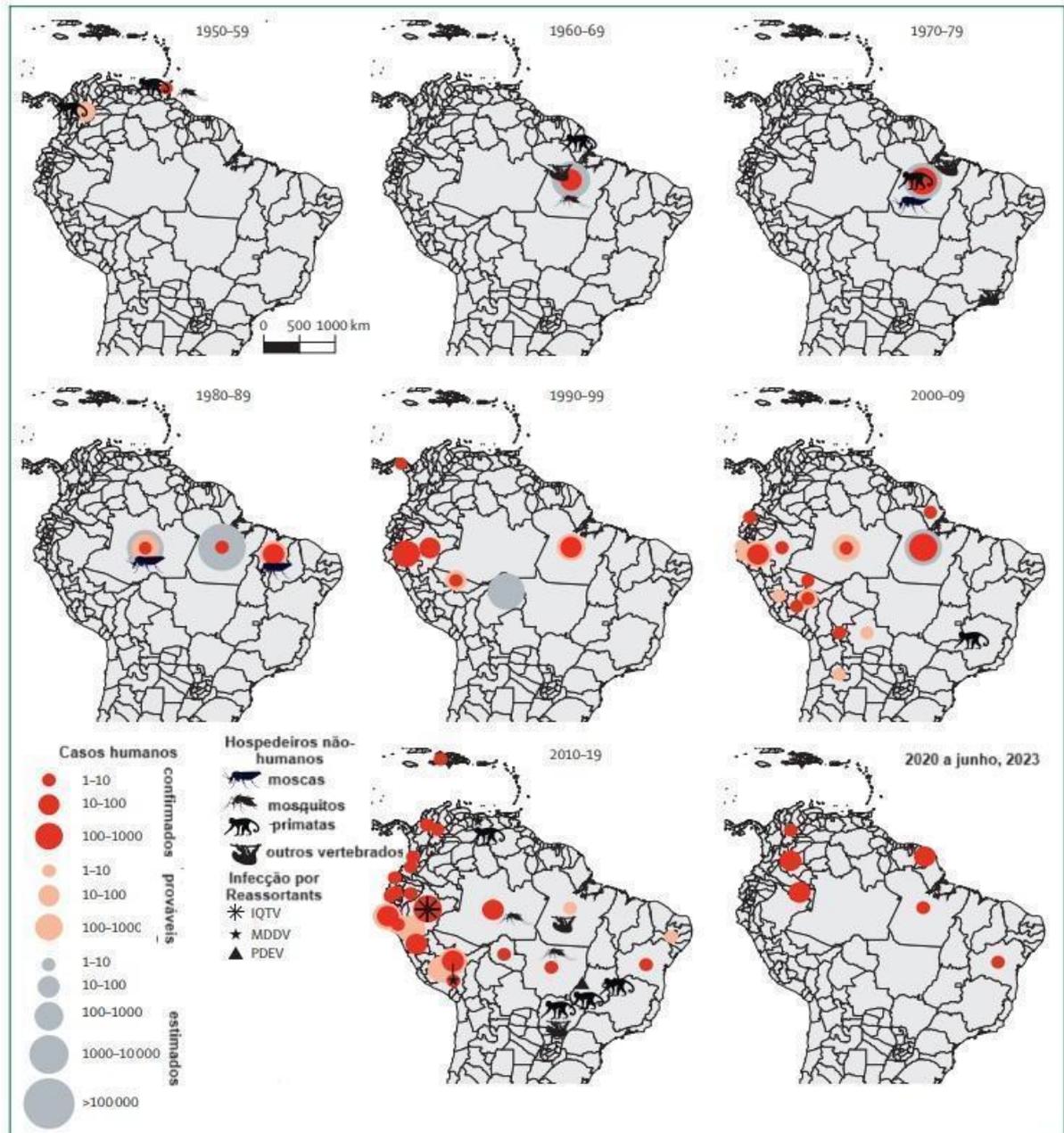
Como outros membros dessa família, OROV entra na célula hospedeira pela via endocítica, funde seu envelope à membrana do endossomo após acidificação dessa organela e realiza sua transcrição e tradução no citoplasma celular, em um mecanismo dependente da RNA polimerase RNA dependente e dos ribossomos livres no citoplasma e presentes na membrana do retículo endoplasmático (Acrani et al., 2010; Santos et al., 2008). A proteína 1 relacionada ao receptor de lipoproteína de baixa densidade (Lrp1) também conhecida como receptor de alpha-2-macroglobulina ou CD91 é o primeiro receptor conhecido para a entrada do OROV na célula hospedeira (Schwarz et al., 2022).

Anticorpos para OROV já foram encontrados na natureza em animais como preguiças (*Bradypus tridactylus*) (Pinheiro et al., 1962), primatas não humanos como macacos-pregos (*Sarajus spp.*), bugios (*Alouatta caraya*), saguis (*Callithrix penicillata*), roedores (*Proechimys spp.*) e aves (*Fringillidae*, *Thaurapidae*, *Columbidae*) que podem atuar como espécies hospedeiras do vírus. Em ambiente selvagem a transmissão ocorre pela picada dos mosquitos *Aedes Serratus* e *Coquillettidia venezuelensis* (Nunes et al., 2005; Pinheiro et al., 1981b; Tilston-Lunel et al., 2015). Em ambiente urbano a transmissão se dá entre pessoas pela picada da mosca hematófoga *Culicoides paraensis*, conhecida popularmente como mosquito pólvora (Pinheiro et al., 1982b, 1981a). Além disso, é possível infectar *Aedes aegypti* com OROV em laboratório, indicando o potencial de transmissão desse vírus por outros vetores (de Mendonça et al., 2021; Smith and Francy, 1991).

O primeiro caso de doença associada com OROV, conhecida como Febre de Oropouche, foi documentado em uma pessoa que trabalhava em área florestal em Trinidad e Tobago em 1952, e que residia em uma vila chamada Vega de Oropouche (Anderson et al., 1961). O OROV foi isolado pela primeira vez no Brasil no sangue de uma preguiça (*Bradypus tridactylus*) e em um pool de mosquitos (*Ochlerotatus serratus*) capturados em uma área de floresta próxima à construção da rodovia Belém-Pará em 1960 (Pinheiro et al., 1962). O primeiro relato de surto da doença em área urbana ocorreu na cidade de Belém no estado do Pará (PA) no Brasil em 1962 com aproximadamente 11.000 casos (Pinheiro et al., 1976). Desde então, mais de trinta surtos e mais de quinhentos mil casos dessa doença foram documentados na região da Bacia Amazônica, no Brasil, (Azevedo et al., 2007; da Costa et al., 2017; Lorenz and Chiaravalloti-Neto, 2024; Martins-Filho et al., 2024; Mourão et al., 2009; Sciancalepore et al., 2022; Silva et al., 2024), Peru (Baisley et al., 1998; Martins-Luna et al., 2020; Romero-Alvarez and Escobar, 2017; Silva-Caso et al., 2019; Watts et al., 1997b, 1997a), Panamá (Tesh, 1994), Equador (Wise et al., 2020, 2018), Colômbia (Ciuoderis et al., 2022; Gómez-Camargo et al.,

2021; Parra Barrera et al., 2023; Silva-Ramos et al., 2023), Bolívia (Forshey et al., 2010), Guiana Francesa (Gaillet et al., 2021) e Venezuela (Navarro et al., 2016).

Figura 1 - Detecção de OROV nas Américas. Representação dos casos confirmados no decorrer dos anos por alguma técnica diagnóstica emparelhada com teste sorológico (círculos vermelhos), casos prováveis em que a detecção foi realizada por apenas uma técnica (círculos vermelhos claros) e casos estimados obtidos da literatura (círculos cinzas). Casos de hospedeiros e vetores detectados com qualquer método foram incluídos.



IQTV - Vírus Iquitos; MDDV - Vírus Madre de Dios; PDEV - Vírus Perdões.

Fonte: Adaptado de Wesselmann, K.M. et al., 2024

Segundo o vigésimo informe semanal, do Centro de Operações de Emergências do Ministério da Saúde, entre 1 de janeiro de 2024 até a data de 25 de junho de 2024 haviam sido confirmadas por critério laboratorial 6973 casos da doença no Brasil. Além disso, entre 2022 e 2024 foi registrado um aumento de casos de OROV nos estados brasileiros da região Norte, Acre (AC), Amazonas (AM), Amapá (AP), Pará (PA), Rondônia (RO) e Roraima (RR) (Lorenz and Chiaravalloti-Neto, 2024; Brasil, Ministério da Saúde. Informe Semanal das Arboviroses Nº 21. 03 de julho de 2024). A região amazônica, que é considerada endêmica para a circulação do OROV, concentrou 78,4% dos casos registrados no país em 2024. Casos autoctones também foram registrados em outras regiões do país, nos estados da Bahia (BA), Espírito Santo (ES), Maranhão (MA), Minas Gerais (MG), Pernambuco (PE), Mato Grosso (MT), Rio de Janeiro (RJ), Santa Catarina (SC) e Piauí (PI). Estudos indicam que este surto mais recente que levou ao aumento do número de casos possa ter sido causado por um rearranjo entre as sequências do OROV e os vírus Perdões (PEDV) e Iquitos (IQTV), que são da mesma família (“Emergence of a novel reassortant Oropouche virus drives persistent outbreaks in the Brazilian Amazon region from 2022 to 2024,” 2024, preprint).

Por ser um vírus com genoma segmentado, OROV pode sofrer rearranjos de seus segmentos de RNA durante episódios de co-infecção com outros Orthobunyavirus, originando vírus totalmente novos, com potencial de causar pandemias em humanos. Estudos recentes já documentaram o surgimento na região Amazônica de vírus resultantes do rearranjo entre OROV e outros Orthobunyavirus entre os quais conhecemos o vírus Madre de Deus (MDDV) (Navarro et al., 2016) e o vírus Iquitos (IQTV) (Aguilar et al., 2011), ambos identificados como causadores de doenças em humanos, e o vírus Perdões (PEDV), identificado apenas em saguis (*Callithrix*) (Tilston-Lunel et al., 2015). Essa capacidade de gerar rearranjos é de interesse para a saúde pública, pois pode potencialmente alterar a gravidade da doença e a competência de diferentes vetores, afetando assim sua disseminação.

As informações acerca dos sinais clínicos na doença causada pelo OROV são obtidas de relatos de casos e pequenos surtos da doença, porém informações sobre sequelas e morte são escassas e podem ser subestimadas. A doença tem um período de incubação de três a dez dias e se caracteriza por ser leve e autolimitada com a presença de febre, exantema, mialgia, cefaléia, artralgia, náusea, fotofobia e mal-estar, que duram de cinco a sete dias (Pinheiro et al., 1981b; Romero-Alvarez and Escobar, 2018). Uma parcela dos pacientes relata também sintomas menos comuns como dor retro-orbital, anorexia e o desenvolvimento de quadros hemorrágicos (Silva-Caso et al., 2019) e de acometimento neurológico como meningite asséptica e

meningoencefalite, caracterizados pela presença de sintomas como congestão conjuntival, sangramento gengival, diplopia, nistagmo e perda de equilíbrio (Bastos et al., 2012; Pinheiro et al., 1982a; Vernal et al., 2019). Aproximadamente 60% dos pacientes desenvolvem quadros de recidiva após sete a dez dias da remissão dos sintomas iniciais (Gaillet et al., 2021). A maioria dos pacientes se recupera sem sequelas, porém já foi relatado que a mialgia pode persistir por até 1 mês em alguns pacientes. Em janeiro de 2024 foi relatado um caso de morte de um paciente de 15 anos na cidade de Manaus-AM que apresentava co-infecção por OROV e SARS-COV-2. Além disso, é relatado aumento na incidência de abortos durante os surtos de febre do OROV na região amazônica (Pinheiro et al., 1981b), porém os efeitos da infecção por esse vírus no desenvolvimento fetal ainda não foram caracterizados.

Apesar da sua grande importância clínica na região amazônica brasileira, devido a falta de testes de rotina e semelhança com a doença causada pela infecção por outros arbovírus que circulam na mesma região, como DENV e CHIKV, acredita-se que os números oficiais de OROV sejam subestimados e pouco se sabe sobre os fatores patogênicos associados ao desenvolvimento de doença em humanos.

Infecção no Sistema Nervoso Central

OROV é um vírus neurotrópico e pode alcançar o sistema nervoso central (SNC) em modelos animais e humanos. Além dos sintomas de acometimento neurológico presentes em uma pequena parte dos pacientes infectados, o genoma viral e imunoglobulinas do tipo IgG e IgM específicas para OROV já foram detectados no fluido cérebro-espinhal de pacientes diagnosticados com meningoencefalite (Bastos et al., 2012; Pinheiro et al., 1982a; Vernal et al., 2019). A presença dessas imunoglobulinas no SNC pode ser um indício de quebra da barreira hematoencefálica (BHE).

Os primeiros casos de manifestações neurológicas ligadas à infecção pelo vírus Oropouche foram relatados durante um surto no estado do Pará, Brasil, em 1980. O diagnóstico laboratorial revelou que 22 pacientes apresentavam quadro de meningite, e o vírus foi isolado de uma amostra de líquido cefalorraquidiano (LCR) após inoculação em camundongos. Altos títulos de anticorpos inibidores de hemaglutinação também foram encontrados em 10 amostras de LCR, indicando infecção recente pelo vírus. Além disso, a soroconversão para o agente foi observada em 3 amostras de LCR. Os pacientes apresentaram aumento de células linfocíticas no LCR com predominância de neutrófilos e aumento de proteína nas amostras (Pinheiro et al., 1982a).

O genoma do vírus também foi detectado no líquido cefalorraquidiano de 3 pacientes com meningoencefalite no Hospital da Fundação de Medicina Tropical do Amazonas (FMTAM), em Manaus, Amazonas, Brasil. Esses pacientes apresentaram sinais de comprometimento neurológico, e o vírus foi confirmado por RT-PCR e sequenciamento como pertencente ao genótipo 1. As amostras de LCR ainda foram positivas para anticorpos IgG e IgM contra o Oropouche, o que pode ser indicativo de danos à BHE. Dois dos pacientes eram imunocomprometidos e tinham infecções subjacentes, enquanto o terceiro paciente não tinha doenças preexistentes. A hipótese é que esses pacientes tiveram uma coinfeção com o vírus Oropouche, que, associado à natureza imunocomprometida das doenças preexistentes, levou ao envolvimento neurológico que gerou a meningite (Bastos et al., 2012).

Também foi realizado um estudo de caso de um paciente que viajou para uma região endêmica no norte do Brasil, descrevendo a associação do Oropouche com o desenvolvimento de meningoencefalite. O paciente apresentou febre com fortes dores de cabeça, fotofobia, vômitos, rigidez no pescoço e confusão mental. A amostra de LCR obtida do paciente foi positiva para PCR para OROV, e a análise de anticorpos por imunofluorescência indireta confirmou a infecção (Vernal et al., 2019).

A infecção de culturas de lâminas de cérebro humano adulto mostrou uma replicação produtiva com liberação de partículas virais. As lâminas foram obtidas de pacientes submetidos a lobectomia temporal para o tratamento de epilepsia, e esse modelo é capaz de manter a estrutura e composição do córtex. Sinais de perda de viabilidade celular e aumento da produção de TNF alfa foram observados nas lâminas infectadas, indicando que o vírus desencadeia uma resposta inflamatória. Neste modelo, as células gliais foram preferencialmente infectadas, com aproximadamente 35% das células positivas para OROV, enquanto o vírus foi encontrado em proporções menores nos neurônios. Apesar disso, estudos com células neuronais diferenciadas (SH-SY5Y) mostraram que os neurônios são produtivamente infectados por OROV, embora no contexto da lâmina com um conjunto de células não tenha sido o principal local de infecção viral (Almeida et al., 2021). Ainda se discute se a microglia pode ser o reservatório de Oropouche no cérebro, como ocorre em outras infecções virais como o vírus da imunodeficiência humana (HIV), e se o vírus tem uma aparente predileção por infectar esse tipo de célula. Ainda não está claro se o dano tecidual é devido à infecção direta pelo vírus, que tem um efeito citopático nas linhagens neuronais, ou se é um efeito indireto como consequência da liberação de moléculas inflamatórias em resposta à infecção.

Também foi constatado que pacientes com febre por OROV apresentaram níveis mais elevados da quimiocina CXCL8 e interferon alpha (IFN- α), e níveis mais baixos de fator de necrose tumoral (TNF) e da interleucina-10 (IL-10) em comparação com doadores saudáveis. Pacientes que tiveram a soroconversão precoces e tardias apresentaram perfis de citocinas diferentes, com os precoces apresentando níveis crescentes da quimiocina CCL2 ao longo do tempo, e os que soroconverteram de forma tardia apresentando níveis decrescentes das quimiocinas CCL2 e CXCL10, e da interleucina-6 (IL-6). O estudo sugere que o IFN- α , CXCL10 e a interleucina-17 (IL-17) podem ser biomarcadores importantes para a febre por OROV, e que sua produção precede a soroconversão (de Oliveira et al., 2019).

Neuropatogênese em modelos animais

Em modelos animais, alguns estudos relataram a capacidade de OROV em alcançar e replicar no SNC. Trabalhos da década de 70, que visavam amplificar e produzir estoques de OROV, demonstraram que esse vírus pode se replicar e alcançar altos títulos no cérebro de camundongos neonatos e adultos quando inoculados pela via intracerebral (Watts et al., 1997a). Além disso, estudos recentes mostraram que OROV é capaz de alcançar o SNC após inoculação subcutânea em alguns modelos animais, como hamsters (*Mesocricetus auratus*) e camundongos BALB/c neonatos com até três dias de vida (Rodrigues et al., 2011; Santos et al., 2014, 2012).

Em hamster, a inoculação experimental com OROV pela via subcutânea leva ao desenvolvimento de uma doença grave, caracterizada pela presença de letargia, tremores, eriçamento de pelos, paralisia e morte em aproximadamente metade dos animais. A análise histológica de corte seriados do cérebro desses animais revelou presença de meningoencefalite, com ativação de células de Kupffer e micróglia, e acúmulo de linfócitos perivasculares. Além disso, o estudo mostra um acúmulo progressivo do vírus no cérebro que ocorre após o pico da viremia, que pode ser indício de que a entrada do vírus se dá através da BHE, por mecanismo de transmigração ou cavalo de tróia (Rodrigues et al., 2011).

Em camundongos neonatos, a inoculação de OROV pela via subcutânea resulta em uma doença caracterizada por sinais clínicos que normalmente se associam com danos neurológicos, como letargia, paralisia de membros inferiores e morte de praticamente todos os animais entre o sétimo e o décimo segundo dia após infecção. Nesse modelo foi demonstrado presença de meningite leve, com ativação astrocitária, reação glial e apoptose neuronal. Ensaios de hibridização *in situ* e imunohistoquímica demonstraram que OROV se replica preferencialmente em neurônios neste modelo (Santos et al., 2012).

Ainda neste mesmo modelo, um outro estudo que analisou marcações de antígeno por imunohistoquímica identificou que a infecção por OROV no SNC ocorre em duas etapas. A primeira etapa se dá quando o vírus alcança a medula espinhal e ascende ao cérebro através do tronco encefálico, essa etapa inicial ocorre com pouca marcação de inflamação e o vírus é encontrado no cérebro 3 dias após infecção via subcutânea. O vírus se replica em neurônios com relativamente pouco comprometimento funcional. A fase tardia ocorre em paralelo e está associada com a passagem do vírus pela BHE, por ocorrer após um pico de viremia e apresentar maior marcação de antígeno em regiões próximas às meninges. A distribuição do antígeno do OROV e a maior marcação por Evans blue em animais que apresentaram manifestações clínicas também é um indício de que o vírus pode ter alcançado difusamente todas as áreas do cérebro por uma rota não neural, possivelmente devido à quebra da BHE. O antígeno do OROV também foi detectado nas medulas espinhais de todos os animais infectados, predominantemente em neurônios motores, mas não em nervos periféricos (Santos et al., 2014).

A resposta imune inata na infecção por OROV

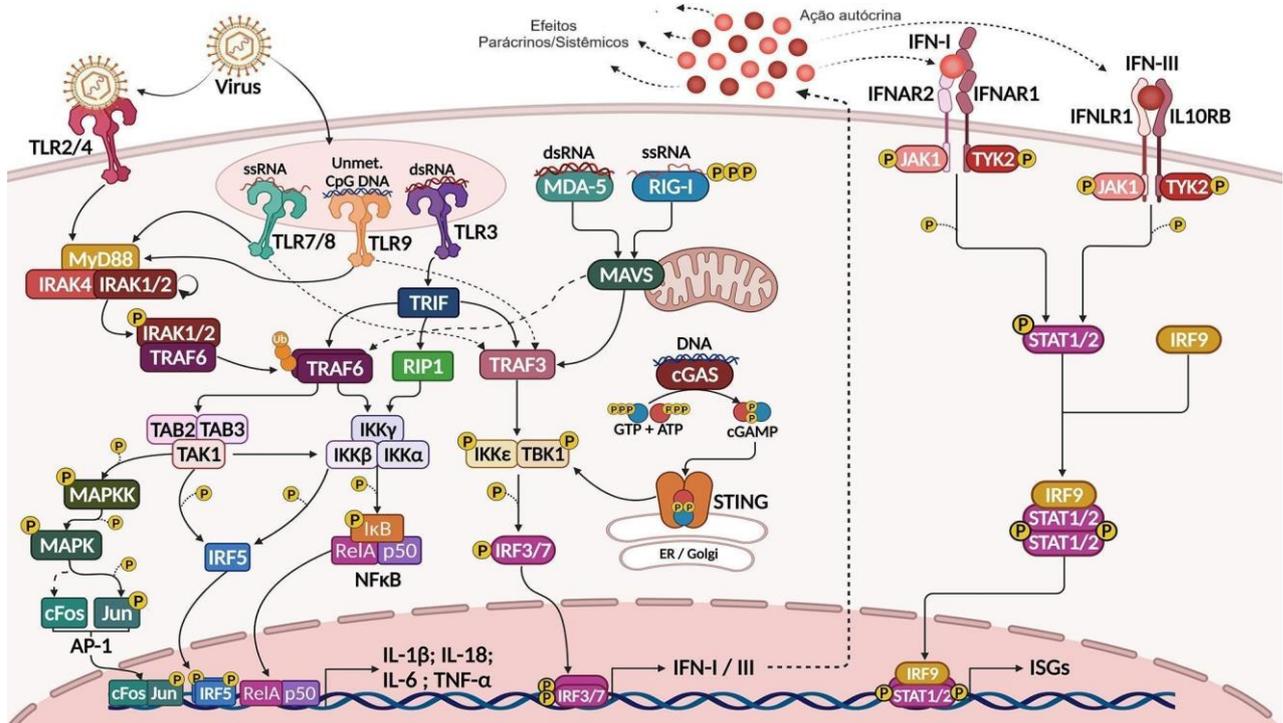
A produção de interferon do tipo I (IFN-I) após infecções por arbovírus é geralmente dirigida pelo reconhecimento do RNA viral ou de outros padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) por receptores de reconhecimento padrão (PRRs) no citoplasma ou na vesícula endocítica da célula infectada. O reconhecimento dessas estruturas leva a iniciação de uma cascata de sinalização que resulta na fosforilação e translocação nuclear de fatores de transcrição, como os fatores reguladores de interferon (IRF-1, IRF-3, IRF-5 e IRF-7) que, por sua vez, induzem a transcrição dos interferons do tipo I. O IFN-I secretado pelas células infectadas ligam-se aos receptores de IFN-1 (IFNAR) nas próprias células infectadas e nas células vizinhas, levando a expressão de algumas centenas de genes estimulados por interferon (ISGs) que possuem atividade antiviral (Lazear et al., 2013).

Os receptores citoplasmáticos melhor caracterizados e que demonstraram ser importantes na resposta contra diversos vírus de RNA são denominados de RLR (RIG Like Receptors), incluindo o RIG-1 (gene 1 induzido por ácido retinóico) e MDA-5 (proteína 5 associada a diferenciação de melanoma). Eles induzem a translocação de IRF-3 e IRF-7 para o núcleo da célula hospedeira e a expressão de IFN-I por uma via dependente de MAVS (proteína sinalizadora antiviral mitocondrial). Além deles, diversos receptores de membranas, de localização endossomal, estão envolvidos no reconhecimento de PAMPs virais. Os mais relevantes para o reconhecimento dos vírus de RNA foram denominados de Receptor do tipo

Toll 3 (TLR-3 ou “*Toll-like receptor-3*”) e o Receptor do tipo Toll 7 (TLR-7 ou “*Toll-like receptor-7*”). O TLR-3 reconhece RNA de fita dupla e age via a molécula adaptadora conhecida como TRIF (*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β*), enquanto TLR-7 reconhece RNAs virais de fita simples e atua via a proteína adaptadora MyD88 (gene de resposta primária durante a diferenciação mielóide) (Fig 2.). Embora todos esses receptores e moléculas sinalizadoras sejam importantes no reconhecimento de patógenos, eles são diferencialmente expressos nos diversos tecidos e células do hospedeiro e possuem papéis distintos no controle da infecção e na patogênese dos diversos vírus de RNA (Wilkins and Gale, 2010).

De fato, componentes chaves da via de produção de IFN-I após reconhecimento do RNA viral por RLR mostraram-se essenciais para o controle da infecção por OROV. Enquanto camundongos C57BL/6 adultos são resistentes à infecção por OROV, camundongos C57BL/6 nocautes para IFNAR, MAVS e duplos nocautes para IRF3 x IRF7 sucumbem à infecção por OROV, em grande parte como consequência da replicação viral descontrolada em hepatócitos. Já foi evidenciado o papel protetor da sinalização por IFN do tipo I em células não mielóides, pois a reconstituição com células da medula óssea de animais WT não foi capaz de proteger camundongos nocautes para IFNAR contra a infecção por OROV (Proenca-Modena et al., 2015).

Figura 2 - Ativação da resposta de IFN-I/III pela detecção viral através de PRRs. Reconhecimento viral por PRRs endossomais (TLR3, 7, 8 e 9), citosólicos (RLRs e cGAS) ou da membrana plasmática (TRL4) que inicia as cascatas de sinalização pela fosforilação dos fatores de transcrição (IRF-3, IRF-5 e IRF-7) levando a transcrição dos interferons do tipo I. Os IFNs atuam nos receptores transmembrana para ativar STAT1, STAT2 e IRF9 e levar a produção de genes estimulados por interferon (ISGs).



Fonte: Adaptado de Vitiello, G. A. F. et al., 2021

Papel do fator de interferon 5 (IRF-5) na neuropatogênese viral

Neste mesmo grupo de receptores também existe o fator regulatório de interferon 5 (IRF-5 ou “Toll-like receptor-5”), um fator de transcrição que induz resposta inflamatória de forma “downstream” a sinalização intracelular por TLR-MyD88 e RLR-MAVS, de forma dependente da sinalização por TRAF6 e IRAK1. O IRF5 regula a produção de citocinas pró inflamatórias, como o fator de necrose tumoral-alpha (TNF- α), interleucina-6 (IL-6), e interleucina-12 (IL-12) (Fig 2.) (Krausgruber et al., 2011; Takaoka et al., 2005). Esse fator de transcrição é expresso de forma constitutiva em várias células imunes, incluindo monócitos, células B e células dendríticas, desempenhando um papel na diferenciação dessas células e na formação de imunoglobulinas (Izaguirre et al., 2003). O IRF-5 também regula a expressão de Blimp-1, uma proteína necessária para a formação de células plasmáticas secretoras de imunoglobulinas, durante o desenvolvimento das células B (Lien et al., 2010). Estudos mostram que o IRF-5 está envolvido em processos relacionados à oncogênese (Roberts et al., 2024) e

apoptose (Fabié et al., 2018; Hu and Barnes, 2009). Além disso, foi encontrado que o polimorfismo genético nos alelos do IRF-5 está relacionado a distúrbios autoimunes como lúpus eritematoso sistêmico (Graham et al., 2006), artrite reumatoide (Duffau et al., 2015), síndrome de Sjögren (Miceli-Richard et al., 2007), esclerose múltipla (Kristjansdottir et al., 2008) e doença inflamatória intestinal (Weiss et al., 2015). Isso enfatiza seu papel na regulação da resposta imunológica.

Em resposta à infecção por patógenos, modelos de camundongos deficientes em IRF-5 mostraram um aumento nas células B e uma redução na expansão das células plasmáticas (Proenca-Modena et al., 2016). Além disso, quando há deficiência de IRF-5, as células dendríticas produzem menos citocinas pró-inflamatórias, como o que ocorre na infecção pelos vírus do Nilo Ocidental (WNV) (Chow et al., 2019) e o vírus da influenza A (IAV) (Forbester et al., 2020).

O papel do IRF-5 na patogênese também já foi demonstrado na infecção por outros vírus como o vírus da hepatite C (HCV) onde a expressão de IRF-5 inibe a tradução de proteínas do HCV e a replicação do RNA viral em culturas celulares de hepatócitos humanos infectados (Huh). A expressão do IRF-5 também desencadeou a apoptose, interrompeu a autofagia e impediu a migração celular de hepatócitos. Análises de amostras clínicas de carcinoma hepatocelular (HCC) associado ao HCV mostraram que, em comparação com os fígados de doadores saudáveis ou pacientes com HCC negativo para HCV, os pacientes com HCC positivo para HCV têm uma expressão de IRF5 menor (Cevik et al., 2017).

Em relação ao vírus chikungunya (CHIKV), estudos mostraram que os monócitos infiltrados nos gânglios linfáticos expressam óxido nítrico sintase induzível (iNOS) através de uma via dependente de IRF-5 e IFNAR1. A organização e função dos gânglios linfáticos são prejudicadas por esse influxo de células mieloides, o que afeta a resposta imune ao CHIKV ao impedir a resposta de células B específicas para o vírus (McCarthy et al., 2020).

Em estudos prévios já foi identificado que o IRF-5 tem papel essencial no controle da neuroinvasão de OROV e de outros bunyavírus, como La Crosse vírus (LACV). Uma parte dos camundongos deficientes de corpo inteiro para IRF-5 sucumbem e desenvolvem encefalite e meningite aproximadamente 12 dias após inoculação com OROV ou LACV. Além disso, o vírus viável pode ser encontrado apenas no cérebro e medula desses animais, enquanto o mesmo não ocorre em modelos de camundongos nocautes para IRF-3 e IRF-7, o que indica que o IRF-5 é responsável por regular a entrada do vírus no SNC. Associado aos sinais clínicos, foi

observado extensa marcação de antígeno viral e marcação de células TUNEL (terminal deoxinucleotidil transferase mediada por biotina-UTP) positivas no cérebro dos animais. A deficiência deste fator ainda faz com que OROV persista em células circulantes, como células dendríticas e linfócitos B e foi associada com uma produção ligeiramente menor de anticorpos neutralizantes específicos. Em ensaios *in vitro*, células dendríticas derivadas de medula óssea deficientes para IRF-5 apresentaram diminuição de IFN tipo I e aumento da infecção por OROV (Proenca-Modena et al., 2016). Entretanto, os mecanismos de como IRF-5 controla a neuropatogênese de OROV ainda são pouco entendidos.

Vias de entrada de patógenos no Sistema Nervoso Central

Existem diversos mecanismos utilizados pelos vírus para atingir o SNC. Essa região do corpo humano possui diversas barreiras que tem como o objetivo impedir a entrada de patógenos e toxinas. Entre elas temos a barreira hematoencefálica (BHE) que forma uma interface entre os vasos sanguíneos e o tecido cerebral. A BHE é composta pelas células endoteliais microvasculares cerebrais (BMECs) que são ligadas entre si por junções oclusivas, que tem como objetivo manter a integridade da barreira formada por essas células. Além disso, a BHE também conta com uma membrana basal sobre a qual se encontram as BMECs e outros tipos celulares como periócitos e extensões do corpo de astrócitos (Abbott et al., 2010).

Para chegar ao cérebro sem precisar passar por essa barreira, alguns vírus utilizam rotas alternativas, como através de neurônios periféricos. Devido a picada do vetor artrópode, a replicação inicial do vírus ocorre geralmente em uma área bastante innervada que é a pele, onde o vírus consegue atingir os neurônios por uma via de transporte retrógrado axonal mediado pelos microtúbulos (Fig 3, B) (Ceccaldi et al., 1989). Da mesma forma, isso pode ocorrer com vírus que atingem os neurônios sensoriais olfativos. Esses neurônios possuem projeções axonais que fazem a sua ligação ao bulbo olfatório que se localiza no SNC, fazendo com que os vírus alcancem o SNC pela via axonal anterógrada (Fig 3, A) (Reiss et al., 1998).

Outra forma que já foi demonstrada para alguns arbovírus é através dos vasos fenestrados na região do plexo coróide situado nos ventrículos, onde é produzido o líquido cefalorraquidiano. As partículas virais podem fazer o caminho inverso saindo da corrente sanguínea e atingindo esses espaços intersticiais do SNC (Schwerk et al., 2015).

Porém a principal rota de entrada no SNC ocorre pela corrente sanguínea após a viremia. Alguns vírus contam com mecanismos para atravessar a BHE, sendo por uma infecção direta

das BMECS, difusão passiva, migração paracelular através das junções oclusivas após sua disrupção ou por transporte transcelular.

A difusão passiva pode ocorrer pela passagem do vírus no interior de vesículas endocíticas em BMECs, que permite com que as partículas virais sejam transportadas entre o lado apical, que é onde se localiza o lúmen do vaso sanguíneo, para o lado basolateral, onde se encontra o SNC, sem que ocorra replicação nas células e conseqüentemente sem danos a integridade da BHE (Preston et al., 2014; Salimi et al., 2020).

Por outro lado, a passagem paracelular do vírus depende que ocorra interrupção da integridade da barreira, seja por disrupção das junções oclusivas, seja por morte celular. A disrupção da BHE por essa via pode ocorrer tanto pela infecção direta das BMECs quanto por um mecanismo secundário na infecção, incluindo dano celular induzido pela inflamação excessiva (Wong et al., 2002). A entrada inicial por outras vias pode ser responsável por contribuir com a replicação viral no SNC, que pela liberação de citocinas e quimiocinas leva a quebra dessa barreira por onde se inicia a entrada do vírus pela via paracelular (Chang et al., 2015).

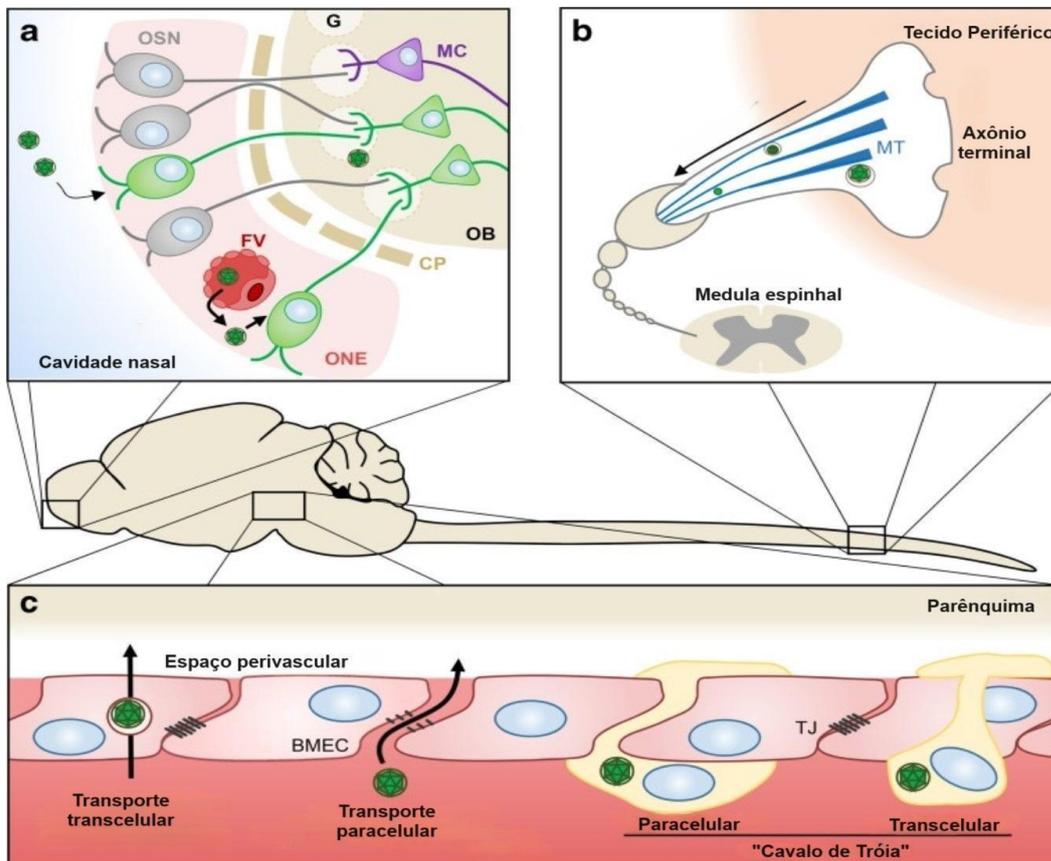
Por fim, os vírus também podem ser transportados para o SNC de forma transcelular ou paracelular em um mecanismo conhecido como “cavalo de Tróia”. Neste mecanismo, células imunes infectadas atravessam a BHE levando o vírus para o SNC. Em situações normais, a BHE limita a entrada de leucócitos. Portanto, a invasão viral por meio dessa via geralmente requer uma disrupção na estrutura da BHE com a quebra das junções oclusivas que permitam a migração paracelular de leucócitos entre células endoteliais (Bai et al., 2010; Tiong et al., 2018). Além disso, é necessário a ativação das BMECs, levando ao aumento da expressão fatores de adesão endoteliais como ICAM, VCAM e selectinas, e na secreção de quimiocinas, para atrair os leucócitos infectados para o cérebro.

É importante ressaltar que durante a infecção viral podem ser utilizadas diversas vias de entrada no SNC, não se restringindo apenas a uma via. Esse mecanismo complexo é dependente de diversos fatores virais e do hospedeiro, podendo ocorrer de forma complementar para o desenvolvimento da patogênese viral (Miner and Diamond, 2016).

Análises do sangue de pacientes infectados com OROV demonstraram que havia uma abundância de leucócitos polimorfonucleares infectados pelo vírus no momento agudo da doença. Também foi possível identificar os três segmentos do vírus por RT-qPCR no sangue,

confirmando o estado virêmico. Isso pode indicar que o vírus pode entrar no SNC pela via hematófaga por diferentes mecanismos citados (de Souza Luna et al., 2017). Uma hipótese é de que a entrada para o sistema nervoso central ocorre pelo mecanismo de "cavalo de Tróia" em microambientes específicos durante a imunossupressão. Isso pode ocorrer devido ao OROV se replicar em monócitos THP-1, células B Jeko-1 e células T Jurkat, e persistir em baixos títulos em células T humanas, monócitos, células dendríticas e células B. Embora a infecção não tenha sido produtiva em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), antígenos virais e pequenas quantidades do genoma do OROV foram detectados 24 horas após a infecção. A ativação da resposta de interferon também é essencial para restringir a replicação do OROV em PBMCs humanos (Ribeiro Amorim et al., 2020).

Figura 3 - Vias de entrada de arbovírus no SNC. (A) Infecção dos neurônios sensoriais olfatórios no epitélio neuro-olfatório após entrada do vírus por vasos fenestrados. (B) Transporte retrógrado do vírus para o SNC por microtúbulos axonais de neurônios periféricos. (C) Entrada do vírus através da barreira hematoencefálica por transporte transcelular nas células endoteliais microvasculares cerebrais, migração paracelular através da interrupção das junções oclusivas e passagem de leucócitos infectados no SNC por “Cavalo de Troia” via paracelular ou transcelular.



OSN - neurônios sensoriais olfatórios; FV - vasos fenestrados; ONE - neuroepitélio olfatório; MC - células mitrais; OB - bulbo olfatório; CP - plexo cribiforme; MT - microtúbulos; TJ - junções oclusivas; BMEC - células endoteliais da microvasculatura cerebral.

Fonte: Adaptado de Salimi, H. et al., 2016

JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

OROV é um arbovírus re-emergente, que está se espalhando da região Amazônica para outras regiões das Américas e Europa. Embora, esse vírus esteja associado com manifestações febris exantemáticas, dados da epidemia atual mostram que complicações neurológicas, malformações congênitas, abortos e óbitos podem ocorrer em pacientes infectados por OROV. Em modelo animal, OROV é neurotrópico e fatores associados à resposta imunológica inata e adaptativa são essenciais para manter a integridade da barreira hemato-encefálica (BHE) e manter o vírus fora do SNC. Dentre esses fatores, um que se destacou foi o IRF-5, um fator de transcrição que é classicamente descrito como envolvido na indução da expressão de IFN-I após reconhecimento de RNA viral por TLR-7 e 9. A deleção de IRF-5 em corpo inteiro faz com que camundongos desenvolvam encefalite grave após infecção com o vírus OROV. Entretanto, pouco se sabe sobre os mecanismos pelos quais IRF-5 controla a neuroinvasão e replicação do OROV em camundongos. Nesse estudo, partimos da premissa que IRF-5 é importante para modular a integridade da BHE após infecção por OROV, pela modulação da expressão de fatores de adesão endotelial, citocinas e quimiocinas em células endoteliais infectadas, controlando assim a entrada do vírus no SNC pela via hematogênica ou mesmo por outras vias, como o transporte retrógrado por nervos periféricos. Assim, resolvemos analisar o efeito da deleção de IRF-5 em células endoteliais para a neuroinvasão de OROV in vivo e in vitro, assim como o efeito da infecção para a produção de fatores de adesão e citocinas em diferentes tipos celulares que compõe a BHE, como células endoteliais, células da glia e neurônios.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Nesta tese temos como objetivo caracterizar como a expressão de IRF-5 em células endoteliais e a infecção no sistema nervoso central (SNC) podem regular a neuroinvasão por OROV *in vivo* ou *in vitro*.

Objetivos específicos

- Caracterizar como a expressão de IRF-5 em células endoteliais influencia na neuroinvasão pelo OROV, analisando o tropismo viral, mortalidade e acometimento neurológico em um modelo de camundongos nocautes condicionais que não expressam IRF-5 nas células endoteliais (CDH5Cre IFR5flox/flox).
- Analisar o desenvolvimento da neuropatogênese, caracterizando acúmulo perivascular de células, expressão de fatores de adesão endoteliais, ativação de microglia e a adesão de células imunes circulantes nos microvasos sanguíneos cerebrais em camundongos CDH5Cre IFR5flox/flox infectados com OROV ou que receberam transferência de leucócitos infectados *in vitro*.
- Determinar a cinética de replicação viral em linhagens estabelecidas de células endoteliais humanas e murinas, e células humanas progenitoras do SNC diferenciadas em neurônios e células da glia infectados com OROV.
- Caracterizar a resposta celular na infecção pelo OROV pela expressão de citocinas, quimiocinas, fatores de adesão endotelial e regulação de vias envolvidas em diversas funções celulares nessas culturas infectadas com OROV.
- Determinar o efeito da infecção por OROV e da deleção de IRF-5 na integridade da barreira endotelial, por meio de análises de integridade das junções oclusivas e modelos de barreira endotelial *in vitro*.

METODOLOGIA

Vírus

Neste projeto foi utilizado o vírus Orthobunyavirus Oropouchense (OROV) da linhagem BeAn19991, isolada de *Bradypus tridactylus* em 1960 no município de Santa Maria, no Estado do Pará, Brasil, (Saeed et al., 2000) e 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. Eles foram titulados por ensaio foco infeccioso. Nos experimentos realizados na *University of Texas Medical Branch* a cepa de Oropouche BeAn19991 foi obtida do Centro de Referência Mundial para Vírus Emergentes e Arbovírus (WRCEVA). Para isolar o vírus foi realizada purificação por ensaio de placa e sequenciamento. O vírus foi propagado em células Vero E6 e titulado por ensaio de placa.

Linhagens celulares e animais

Esse estudo foi realizado utilizando as seguintes linhagens celulares estabelecidas: Vero E6 (ATCC® No. CRL-1586, Manassas, Virginia, Estados Unidos) (rim de macaco *Cercopithecus aethiops*), BEND3 (ATCC® CRL-2299, Manassas, Virginia, Estados Unidos) (endotélio de microvasculaturas cerebrais de camundongo) e HBEC-5i (ATCC® No. CRL-3245, Manassas, Virginia, Estados Unidos) (endotélio de microvasos cerebrais humano).

Também foi utilizada a linhagem celular de progenitores neurais humanos imortalizados ReNcell VM (Millipore Sigma No. SCC008, Burlington, Massachusetts, EUA) que foi cultivada em Meio de Manutenção de Células-Tronco Neurais ReNcell NSC (Millipore Sigma; Cat. No. SCM005, Burlington, Massachusetts, EUA) suplementado com 20 ng/mL de FGF-2 (Millipore Sigma; Cat. No. F0291, Burlington, Massachusetts, EUA) e 20 ng/mL de EGF (Millipore Sigma; Cat. No. E9644, Burlington, Massachusetts, EUA). As células foram cultivadas em frascos ou placas revestidas com 20 µg/mL de laminina (Millipore Sigma; Cat. No. L2020, Burlington, Massachusetts, EUA) e mantidas a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂. Os fatores de crescimento foram retirados do meio basal durante 14 dias para o protocolo de diferenciação.

Os neurônios e astrócitos utilizados no modelo que mimetiza a barreira hematoencefálica em inserto de transwell foram diferenciados a partir de células-tronco neurais (CTNs) derivadas de células-tronco embrionárias humanas pluripotentes (hES, linha celular

BR-1). As CTNs foram cultivadas em meio Neurobasal/DMEM/F12 com 1% de suplemento B27 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) e 1% de Glutamax (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) em placas revestidas com Matriz Geltrex (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). Para a diferenciação dos neurônios, 50% do meio foi trocado a cada 4 dias por um período de 20 dias. Já para a diferenciação dos astrócitos, o meio DMEM/F12 foi suplementado com 1% de N2, 1% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de penicilina-estreptomicina durante 21 dias. Após essa etapa as células são plaqueadas em garrafas revestidas com Geltrex e mantidas em meio DMEM/F12 com 1% de Suplemento GlutaMAX, 10% de SFB e 1% de penicilina-estreptomicina sendo trocado a cada 2 dias por um período de 28 dias.

Os animais CDH5 cre (B6.FVB-Tg(Cdh5-cre)7Mlia/J) e IRF5 flox (C57BL/6-Irf5tm1Ppr/J) utilizados neste estudo foram comprados da The Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine, Estados Unidos) e cruzados em laboratório, utilizando os primers de sequenciamento para genotipagem das linhagens resultantes dos cruzamentos (tabela 1). Os animais selvagens ou *wild type* (C57BL/6J) foram obtidos no CEMIB. Todos os experimentos foram aprovados pelo comitê de ética animal CEUA N° 5423-1/2019.

Tabela 1- Primers utilizados para genotipagem.

Primer		Sequência
CDH5 cre	Forward	5' -GCG GTC TGG CAG TAA AAA CTA TC- 3'
	Reverse	5' -GTG AAA CAG CAT TGC TGT CAC TT- 3'
IRF5 flox	Forward	5' -TTA GCT GGG CAT CTA GAC CA- 3'
	Reverse	5' -GGT TTT GAG TCA GGG TCT CAC- 3'

Fonte: Autoria própria

Experimentação animal

Os animais com 4 semanas de idade foram infectados via subcutânea com 30uL de OROV para uma concentração de 10^5 PFU/mL na pata traseira esquerda. Os animais foram então acompanhados por 21 dias ou até apresentarem sinais de doença. No dia da coleta, eles foram anestesiados com isoflurano e depois com cetamina 250 mg/Kg/animal e xilazina 60 mg/Kg/animal de forma intraperitoneal. O sangue foi puncionado do coração, e os animais

foram perfundidos com 20mL de PBS 1x para a coleta dos órgãos. Os órgãos foram coletados em tubos contendo beads de zircônia (colocar marca), pesados e macerados em 1mL de meio MEM com 4% de SFB e 2% de antibiótico em MagNA Lyser (ROCHE, Mannheim, Alemanha).

Microscopia intravital

Os animais infectados foram anestesiados com cetamina 100 mg/kg/animal e xilazina 16 mg/kg/animal e mantidos a 37°C usando uma almofada de aquecimento. Uma abertura do crânio de 3 a 4 mm de diâmetro foi feita no lobo parietal esquerdo com broca cirúrgica (Beltec, Araraquara, Brasil). A dura-máter e a aracnóide foram retiradas para expor os vasos sanguíneos da pia-máter. Os leucócitos foram marcados com Rodamina 6G (0,3 mg/kg; Millipore Sigma, Burlington, Massachusetts, EUA) por administração no plexo retro-orbital e a fluorescência captada por microscópio intravital (Axio ImagerA2; Carl Zeiss, Jena, Alemanha) com uma objetiva 310 e um filtro de emissão de 590 nm, acoplado a uma câmera (AxioCam) para gravar as imagens. Leucócitos aderidos foram considerados aqueles que permaneceram aderidos por no mínimo 30 segundos à parede dos microvasos sanguíneos. Ao final da captação das imagens, os animais foram eutanasiados utilizando cetamina 250 mg/Kg/animal e xilazina 60 mg/Kg/animal de forma intraperitoneal. As imagens foram analisadas utilizando o software ImageJ (NIH) (Bastos et al., 2018).

Coloração por ensaio de Hematoxilina e Eosina

Os tecidos cerebrais dos camundongos foram removidos após perfusão com PBS e fixados em paraformaldeído (PFA) 4% por 24 horas a 4°C, seguido por lavagens com PBS 1 X e mantidos em etanol 70% até a inclusão em parafina. Em seguida, os cortes histológicos foram realizados com espessura de 5 µm e passaram pelo processo de desparafinização por xilol e hidratação com diferentes concentrações de álcool etílico 100, 80, 70 e 50%. Após, foi realizada a coloração com hematoxilina e eosina, respectivamente. As lâminas foram, então, desidratadas por lavagens sequenciais de álcool etílico em concentrações crescentes de 50, 70, 80 e 100% e posteriormente fixadas em xilol. As imagens foram obtidas utilizando o Microscópio Eclipse Ts2 (Nikon, Minato, Tóquio, Japão).

Isolamento e transferência de células do baço

Após anestesia, primeiro com isofluorano e depois com cetamina 250 mg/Kg/animal e xilazina 60 mg/Kg/animal de forma intraperitoneal, o baço do animal foi coletado em 1mL de meio RPMI (Millipore Sigma, Burlington, Massachusetts, EUA) e macerado com o auxílio do êmbolo de uma seringa no *cell strainer* 100µM. O tecido macerado foi centrifugado por 5 minutos à 400 x g (rcf), à 20°C e o pellet ressuscitado em 1mL de buffer de lise de hemáceas por 2 min. A reação foi parada pela adição de 1mL de meio com 10% de SFB. As células foram centrifugadas novamente por 5 minutos à 400 x g (rcf), à 20°C e o pellet ressuscitado em meio RPMI. As células foram contadas na câmara de Neubauer e infectadas por 2h com OROV usando uma MOI de 3. Depois a suspensão é centrifugada por 5 minutos à 400 xg (rcf), à 20°C e o pellet ressuscitado em PBS 1X. O pellet foi ressuscitado em PBS 1X e centrifugado, de acordo com a orientação anterior por 3 vezes e depois ressuscitado em meio RPMI para uma concentração de 2×10^6 células/mL. Os animais foram infectados com 30µL da suspensão pela via do plexo retro-orbital após anestesia inalatória com Isofluorano. O aparecimento de sinais clínicos e o peso dos animais foram acompanhados diariamente por 21 dias.

Cinética de replicação viral

As células endoteliais BEND3 e HBEC-5i foram plaqueadas em placas de 12 poços, em uma concentração de 5×10^5 células/poço e posteriormente infectadas com OROV BeAn19991 em multiplicidades de infecção (MOI) de 1 e 0,1 por 1h a 37°C com 5% CO₂. Em seguida, as células foram lavadas 3 vezes com PBS 1x e o meio celular foi adicionado. As coletas de sobrenadante e monocamada celular foram realizadas 0, 1, 4, 12, 24, 48 e 72 horas pós infecção (hpi) e imediatamente congeladas por imersão em nitrogênio líquido. As amostras de sobrenadante e monocamada celular foram armazenadas em biofreezer -80 °C.

As células ReNcell foram semeadas em placas de 6 poços em uma concentração de $1,5 \times 10^6$ células/poço e diferenciadas por 14 dias conforme descrito anteriormente. As células foram infectadas com OROV BeAn19991 em um MOI de 0,1 por 1 hora a 37°C com 5% CO₂. Em seguida, as células foram lavadas 3 vezes com PBS 1x e o meio celular foi adicionado. As células foram coletadas em Trizol para extração de RNA ou em Dodecilsulfato de sódio (SDS) 1x para análise de proteínas, também foram coletados os sobrenadantes para titulação viral. As amostras foram imediatamente congeladas a -20°C. As coletas foram realizadas em 0, 4, 12, 24, 48 e 72 hpi.

Extração de RNA

A extração de RNA viral do sobrenadante coletado das células endoteliais foi realizada por kit comercial PureLink Viral RNA/DNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). A extração de RNA da monocamada celular foi realizada utilizando o kit comercial TRIzol Plus RNA Purification (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) seguindo orientações do fabricante. A extração de RNA da monocamada celular das células ReNcell foi realizada utilizando o kit comercial Direct-zol RNA Miniprep (Zymo, Irvine, Califórnia, Estados Unidos). As amostras foram analisadas quantitativa e qualitativamente por espectrofotômetro Nanodrop One (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos).

Quantificação gênica por qPCR e RT-qPCR

Quantificação viral: A detecção molecular de OROV foi realizada por RT-qPCR TaqMan Fast Vírus 1-Step Master Mix (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, EUA) utilizando primers e sonda específicos. Em resumo, as reações foram feitas com 2 μL do RNA extraído (aproximadamente 100 ng), em um volume final de 12 μL em Master Mix (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, EUA) e utilizando os seguintes primers e sonda (IdT Prime Time) [14] (Tabela 1). A reação de transcrição reversa foi realizada à 48 °C por 15 minutos mais 95 °C por 10 minutos e a amplificação do produto alvo ocorreu em 45 ciclos de desnaturação à 95 °C por 15 segundos e anelamento-extensão à 60 °C por 1 minuto.

Expressão gênica: A quantificação dos genes das vias da resposta imune, citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão, ISGs e marcadores de diferenciação foi realizada por qPCR pela metodologia de Syber Green (BioRadTaq™ Universal SYBR® Green Supermix). Foram utilizados 3 μL do cDNA (diluído 1:20, aproximadamente 500 ng/uL), 3 μL de primers e sondas específicos (600 nM) (Anexo 1), e 6 μL de fluorófilo fg 2x por reação, utilizando as 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, utilizamos a amplificação do gene GAPDH ou Beta-actina (ACTB) (Anexo 1). A quantificação foi determinada de forma relativa em comparação com células não infectadas, após normalização com o controle endógeno escolhido.

Tabela 2- Primers e sonda utilizados para detecção viral.

Primer		Sequência
OROV	Forward	5' -TACCCAGATGCGATCACCAA- 3'
	Reverse	5' -TTGCGTCACCATCATTCCAA- 3'
	Probe	5' -TGCCTTTGGCTGAGGTAAAGGGCTG- 3'

Fonte: Autoria própria

Ensaio de viabilidade celular por MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina)

As células HBEC-5i e BEND3 foram plaqueadas em placas de 96 poços utilizando concentração de 2×10^5 células/poço e incubadas durante a noite em estufa a 37 °C com 5% CO₂. A infecção foi realizada utilizando os MOIs 1 e 0,1 de OROV e adicionada 72, 48, 24, 12 e 4 horas antes da interrupção da infecção pela adição do sal MTT nas placas. O tempo 0 h foi utilizado como controle celular do experimento, sendo que as células não foram infectadas. O resultado é apresentado pela média dos valores (n = 6). Foi adicionado o sal MTT (5mg/mL) que ficou em contato com as células durante 3 h e então adicionamos o DMSO a fim de garantir a solubilização do azul de formazan. A leitura da absorbância foi realizada em um comprimento de onda de 570 nm, sendo os resultados dos tratamentos subtraídos dos poços controle onde não foram cultivadas as células (apenas com a adição do DMSO).

Imunofluorescência

As células ReNcell foram cultivadas em lâminulas de vidro tratadas com laminina em placas de 48 poços a uma densidade de 1×10^5 células/poço e diferenciadas por 14 dias conforme descrito anteriormente. A infecção com OROV foi realizada utilizando um MOI de 1, e as lâminas de vidro foram fixadas 24 horas após a infecção com 4% de paraformaldeído por 40 minutos à temperatura ambiente. Após a fixação, elas foram lavadas e armazenadas em PBS. Subsequentemente, foram realizadas lavagens usando um tampão de bloqueio contendo 1% de BSA, 0,1% de Triton-X 100 e 50 mM de glicina diluída em PBS 0,1M. Após isso, as lâminas de vidro foram lavadas com tampão de trabalho (tampão de bloqueio diluído 1:5 em PBS). Anticorpos primários contra OROV (1:20, fluido ascítico hipermune de camundongo fornecido pelo WRCEVA), anti-GFAP (1:50, AB7260) e B-tubulina (1:50, AB18207) foram

diluídos em tampão de trabalho e incubados por 2 horas em uma câmara úmida. Após outra lavagem com tampão de trabalho, as lâminas de vidro foram incubadas por 1 hora com anticorpos secundários IgG de cabra anti-rato (CY5 A10523) e IgG de cabra anti-camundongo (AF488 A1101) diluídos 1:1000 e protegidos da luz. As lâminas de vidro foram montadas em lâminas de microscópio após a aplicação de Montante Antidesvanecedor com Corante de DNA DAPI (Fisher Scientific Cat. No. P36941) e armazenadas durante a noite a 4 °C. As imagens foram obtidas utilizando um microscópio de fluorescência, e a análise foi realizada utilizando o FIJI (versão 1.52 k do FIJI).

Os tecidos cerebrais dos camundongos foram fixados com PFA 4% por 1h em temperatura ambiente. Após essa etapa o tecido foi submetido a três lavagens com PBS 1X e incubados em sacarose 15% por 24 horas a 4°C. A solução foi substituída por sacarose 30% e o tecido mantido a 4°C. Os cortes de 5 µm de espessura foram feitos no Criostato Leica Biosystems (CM1860 UV) com o tecido imerso em composto de corte ótimo (OCT) resfriado com nitrogênio líquido e mantido a -70°C. As secções passaram por uma etapa de incubação com a solução de bloqueio (PBS1X, 5% de BSA e 0,1% de Tween-20) por 1 hora à temperatura ambiente, e depois seguimos com a marcação de OROV (ATCC VR-1228AF, 1:500, Manassas, Virginia, Estados Unidos), diluído em PBS 1X com 3% de BSA, durante a noite a 4°C. As secções foram então incubadas com anticorpo IgG conjugado a AF488 de cabra anti-camundongo (Sigma-Aldrich, 1:1000, Burlington, Massachusetts, EUA), diluído em PBS 1X com 1% de BSA, por 2 horas à temperatura ambiente. Os passos foram repetidos em seguida para as marcações de p-selectina (CD62P) (Thermo Fisher Scientific, 1:500, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) e anticorpo IgG conjugado a AF488 de cabra anti-camundongo (Sigma-Aldrich, 1:1000). As lâminas foram preparadas usando o Montante Antidesvanecimento ProLong Gold com DAPI (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). As imagens foram obtidas no Microscópio Confocal Upright LSM780-NLO (Zeiss) no Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Fotônica Aplicada à Biologia Celular (INFABIC, Unicamp)

Western Blot

Realizamos o cultivo das células HBEC-5i em placas de 6 poços a uma concentração de 9×10^5 células por poço. Destes, 5 poços tiveram suas proteínas totais extraídas com tampão de lise preparado no laboratório com Tris HCl pH 7,5 (50mM), NaCl (150mM), EDTA pH 8,0 (1mM), DTT (1mM), NP-40 (1%) e acrescido de Inibidor de protease completo (Roche). A

quantificação foi realizada seguindo protocolo do Kit Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). As amostras extraídas e quantificadas foram armazenadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, após adicionado o tampão de amostra com β -mercaptoetanol e fervidas por 10 min a $95\text{ }^{\circ}\text{C}$. 30 μg de proteínas foram separadas em um gel 6% SDS-PAGE e transferidas para membrana Hyboard em transferência semi-seca no cassette Trans-Blot Turbo Transfer System. Após bloqueio com 5% de leite diluído em PBS-Tween-20 0,1%, a membrana foi incubada durante a noite a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ com anticorpo primário anti-ZO1 Tight Junction Protein antibody (Abcam, 1:1000; Ab96587, Cambridge, Reino Unido) e Anti-alpha Tubulin antibody (Abcam, 1:1000; EP1332Y, Cambridge, Reino Unido). Depois, a membrana foi lavada e incubada com anticorpo secundário Goat Anti-Mouse IgG H&L (HRP) (Abcam, 1:5000; ab6789, Cambridge, Reino Unido) por 1 h a temperatura ambiente. Os géis foram revelados em equipamento Gel Doc XR+ System (Bio Rad).

As células ReNcell coletadas das placas foram ressuspensas em SDS 1x e aquecidas a 95°C por 5 minutos. A quantificação de proteínas foi realizada usando o Kit de Ensaio de Proteínas BCA (Produtos de Biologia de Proteínas Promethues; Cat. No. 18-441). Uma quantidade padronizada de 12,6 μg foi carregada em um Gel Mini-PROTEAN TGX (Bio-Rad; Cat. No. 4561096, Hercules, Califórnia, Estados Unidos) e corrida por 1h a 150V. A transferência de proteínas para a membrana de PVDF (polivinilideno difluoreto) foi feita por 1h a 12V. As lavagens foram realizadas com solução salina tamponada com Tris com 0,1% de detergente Tween 20 (TBST) e bloqueio em leite 5% diluído em TBST por 1h. Os seguintes anticorpos primários foram diluídos em leite 5% em TBST: B-tubulina (Abcam; Cat. No. B18207, Cambridge, Reino Unido), Nestina (Abcam; Cat. No. MAB5326, Cambridge, Reino Unido), GFAP (Abcam; Cat. No. AB5804, Cambridge, Reino Unido), SOX2 (Abcam; Cat. No. AB5603, Cambridge, Reino Unido). Os anticorpos primários foram incubados durante a noite a 4°C . Os anticorpos secundários diluídos em leite 5% em TBST, Anti-rabbit IgG, HRP-linked Antibody (Cell Signaling; Cat. No. 7074, Danvers, Massachusetts, Estados Unidos) ou Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody (Cell Signaling; Cat. No. 7076, Danvers, Massachusetts, Estados Unidos), foram incubados por 1h à temperatura ambiente. O Anticorpo Policlonal GAPDH, HRP linked (Thermo Scientific; Cat. No. PA1-987-HRP, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) foi diluído em leite 5% em TBST e incubado por 1h à temperatura ambiente. A WB foi desenvolvida usando o substrato quimioluminescente SuperSignal West Pico PLUS (Thermo Scientific; Cat. No. 34577, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos). A análise de área foi realizada usando o software FIJI (versão 1.52 k).

Ensaio de Transwell

As células HBEC-5i foram cultivadas no lado apical de insertos de transwell (Corning Costar, ME, Estados Unidos; 0.4µm membrana) até atingir a confluência. As células foram infectadas com OROV em um MOI 1 e a resistência elétrica transendotelial (TEER) medida nos tempos 0, 12, 24, 48 e 72 horas pós infecção utilizando Voltímetro (Millicell ERS-2, Burlington, Massachusetts, EUA). O TEER foi calculado subtraindo o valor da resistência em cada poço pelo valor do poço branco (sem células) e considerando o valor da resistência inversamente proporcional a área da membrana do inserto. Em alguns experimentos as células foram transfectadas com siRNA IRF5 ou siRNA Scramble por 48 horas antes do vírus ser adicionado. Nesses experimentos as células foram infectadas com MOI de 0,1.

Também foi analisada a passagem de vírus através da monocamada de células HBEC-5i para a câmara inferior onde cultivamos células VERO a uma concentração de $1,5 \times 10^5$ células/poço. Os sobrenadantes dos lados apical e inferior dos insertos foram coletados e quantificados por RT-qPCR. As células foram incubadas com o conjugado de FITC-BSA durante 30 min em diferentes tempos pós infecção e a passagem do conjugado para a câmara inferior foi quantificada pela intensidade da fluorescência utilizando o leitor de placa CLARIOstar Plus - BMG Labtech.

Sensor Elétrico de Impedância de Substrato Celular (ECIS)

Foram plaqueadas 2×10^5 céls/poço de HBEC-5i em 400uL de meio DMEM HG (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) 10%SFB + P/S em cada poço do eletrodo. O experimento é iniciado no equipamento e a estabilização da monocamada celular é aguardada por um período de 24 horas. O meio é retirado e adicionado 400uL do novo meio DMEM HG sem adição de soro e antibiótico durante 1-2 horas até a nova estabilização. Por fim, retiramos 200uL de cada poço e colocamos 200uL de meio contendo o vírus em uma concentração com o dobro da MOI de 1, vírus inativado, o tratamento com trombina (500.000 U/mL) que funciona como controle positivo de quebra de barreira ou meio. Nos ensaios de silenciamento gênico por siRNA os compostos são adicionados no momento em que as células são plaqueadas no primeiro dia do experimento.

RNA interferente pequeno (siRNA)

A transfecção do siRNA foi realizada de acordo com o fabricante. Para isso, foi utilizado uma concentração de 50 µM de siGENOME siRNA IRF5 (GE Healthcare Dharmacon,

SMARTpool;M-011706, Lafayette, Colorado, EUA) ou siRNA SCRAMBLE (controle negativo) (GE Healthcare Dharmacon, SMARTpool; D-001206, Lafayette, Colorado, EUA) nas células HBEC-5i cultivadas a uma concentração de 3×10^5 céls/poço em placas de 12 poços, 5×10^4 céls/poço em insertos de transwell ou 2×10^4 céls/poço nos poços do eletrodo de ECIS. Para a transfecção, foi adicionado em um tubo o siRNA de acordo com a quantidade definida e meio DMEM alta glicose (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Estados Unidos) sem soro, e no segundo tubo, reagente de transfecção DharmaFECT também em meio DMEM alta glicose sem soro. O conteúdo de cada tubo foi homogeneizado com auxílio da pipeta e incubado por 5 minutos. Depois, o conteúdo dos tubos foi misturado e incubado por 20 min a temperatura ambiente. Por fim, foi adicionado meio DMEM alta glicose com soro fetal bovino 4% ao tubo e adicionado o volume ajustado a cada poço. As células foram incubadas em estufa a 37 °C com 5% CO₂ durante 48 horas.

Sistema de Imunoensaio Multiplex Bio-Plex

Os sobrenadantes descongelados coletados do experimento de cinética em células ReNcell diferenciadas foram submetidos aos Ensaio de Citocinas Humanas Bio-Plex Pro (Bio-Rad Laboratories Cat. No. 12007283, Hercules, Califórnia, Estados Unidos) de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, beads magnéticas revestidas com anticorpos específicos para citocinas foram adicionadas a cada poço de uma placa de 96 poços. Em seguida, amostras e padrões foram adicionados à placa e incubados em um agitador de placa. Após etapas de incubação e lavagem, anticorpos de detecção biotinizados foram adicionados a cada poço, seguidos pela adição de estreptavidina-ficoeritrina (SA-PE). As amostras foram então analisadas usando um sistema Bio-Plex 200 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Califórnia, Estados Unidos). Controles de qualidade fornecidas nos kits de Ensaio de Citocinas Humanas Bio-Plex Pro foram incluídos em cada execução. Os dados foram expressos em picogramas por mililitro (pg/mL).

Sequenciamento de RNA e análises de vias gênicas

O RNA total extraído das amostras de células ReNcell coletadas em Trizol foi isolado usando o kit RNA Direct-zol Miniprep (Zymo, Irvine, Califórnia, Estados Unidos) de acordo com as instruções do fabricante. Amostras contendo 1-2 µg de RNA, com uma razão de pureza (A₂₆₀/A₂₈₀) entre 1,8-2,2, foram então submetidas ao Sequenciamento de Próxima Geração

(NGS) na GENEWIZ (Azenta, South Plainfield, New Jersey, Estados Unidos). A preparação da biblioteca foi realizada utilizando o kit NEBNext Ultra II RNA Library Prep para Illumina (NEB, E7770S, Ipswich, Massachusetts, Estados Unidos). A análise de RNA-seq foi realizada usando dados limpos mapeados para o genoma humano obtido do Ensemble. A análise de Bonferroni foi conduzida para identificar diferenças estatisticamente significativas. Posteriormente, gráficos de vulcão foram gerados usando R, com os valores de p ajustados utilizados para visualizar os padrões de expressão gênica diferencial.

Análise dos resultados

Os dados gerados foram analisados utilizando o software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, Califórnia, Estados Unidos). Análises de ANOVA de um e dois parâmetros foram utilizados. Valores de p menores que 0,05 foram aceitos para determinar que dois valores são significativamente diferentes.

RESULTADOS

A expressão de IRF-5 em células endoteliais é essencial para o controle da quebra da barreira hematoencefálica *in vivo*

Para entender o papel de IRF5 na quebra da barreira hematoencefálica após infecção por OROV *in vivo*, utilizamos um sistema de animais nocautes condicionais, em que camundongos que expressam a enzima cre recombinase em associação com marcadores endoteliais (Cdh5 cre) são cruzados com animais floxeados para o gene IRF5 (IRF5 flox), gerando uma prole em que o IRF5 é deletado apenas das células que expressam a enzima cre, no caso as células de endotélio. Sucessivos cruzamentos dão origem a uma prole mista, com animais cre positivos e homozigotos para o gene IRF5 (Cdh5cre+ IRF5f/f), cre positivos e heterozigotos para o gene IRF5 (Cdh5cre+ IRF5f/wt) ou selvagens que podem ser positivos para cre mas não expressarem o gene IRF5 em nenhum alelo (Cdh5cre+ IRF5wt/wt) ou cre negativos (Cdh5cre- IRF5f/f, Cdh5cre- IRF5f/wt ou Cdh5cre- IRF5wt/wt). Camundongos selvagens são sabidamente resistentes à infecção por OROV.

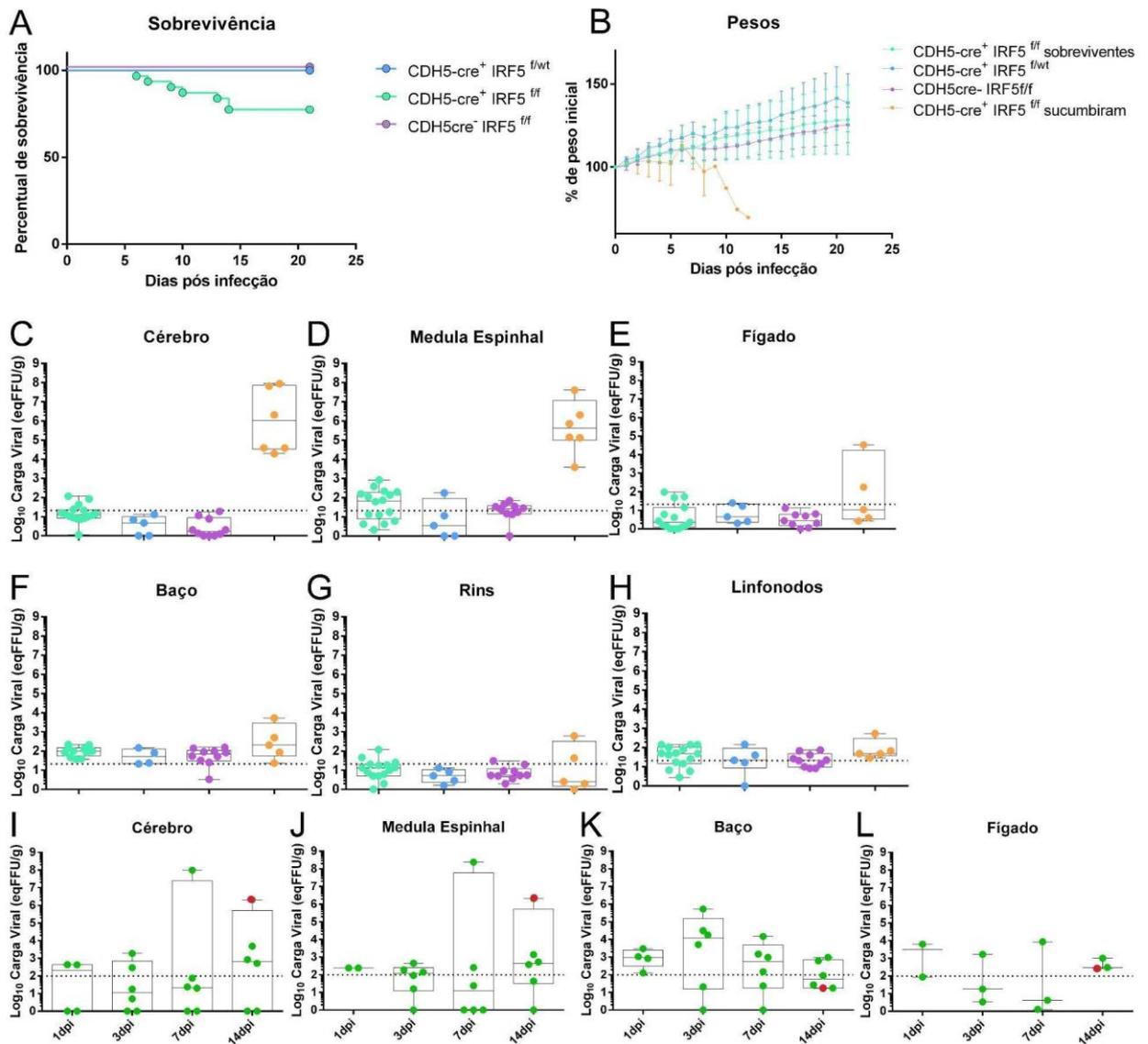
Dessa forma, caracterizamos a perda de peso e mortalidade dos animais nocautes condicionais homozigotos (N=17) ou heterozigotos (N=5) e selvagens (N=8) de 4 semanas de idade após inoculação com 10^5 UFF de OROV via subcutânea na pata traseira. Observamos que cerca de 35% (N=6) dos camundongos Cdh5cre+ IRF5f/f homozigotos sucumbiram a infecção por OROV entre 7 e 14 dias pós infecção (Fig. 4, A). Esses animais apresentavam sinais de acometimento neurológico como perda de peso (Fig. 4, B), perda de equilíbrio, letargia e paralisia dos membros inferiores no momento da coleta. Animais heterozigotos Cdh5cre+ IRF5f/wt responderam da mesma forma que os animais controle cre negativos, onde não ocorreu perda de peso ou sinais de adoecimento dos animais, indicando que é necessário a deleção dos dois alelos de IFR5 para observação do fenótipo nesse modelo e todos os experimentos com animais nocautes condicionais a seguir foram realizados com os animais homozigotos para o gene IRF5.

A coleta de órgãos foi realizada no momento em que foi observado o sinais de acometimento neurológico nos animais ou no dia 21 após infecção nos animais sem sinais de doença. A análise da carga viral nesses tecidos por qRT-PCR mostrou a presença de altos títulos de vírus ($>10^8$ eqFFU/g) no cérebro e medula apenas dos animais que apresentaram sinais de acometimento neurológico (Fig. 4, C-H), indicando que de fato neste modelo o vírus consegue atingir o SNC em parte dos animais com deleção condicional de IRF5 em células endoteliais.

Assim, podemos afirmar que a presença de IRF5 em células endoteliais é essencial para restringir a neuroinfecção de OROV em modelo de camundongos.

Também realizamos coletas em diferentes dias pós infecção para entender a cinética de replicação do vírus nos órgãos dos animais nocautes condicionais (N=21). Foram coletados o cérebro, medula espinhal, fígado e baço nos dias 1, 3, 7 e 14 pós infecção. O vírus só foi detectado em altos títulos por qRT-PCR no SNC daqueles animais no momento em que apresentaram sinais de acometimento neurológico (N=2) em 7dpi e 14dpi. Porém foi possível observar um pico de replicação viral no baço de todos os animais em 3 dpi, que decai ao longo do tempo, indicando que o vírus é capaz de causar uma infecção sistêmica nesses animais, que na maior parte dos casos é solucionada sem a entrada do vírus no SNC (Fig. 4, I-L).

Figura 4 - Sobrevivência, perda de peso e carga viral nos tecidos de animais IRF5^{f/f} e Cdh5cre+IRF5^{f/f} infectados com OROV. (A) Curva de sobrevivência e (B) perda de peso de animais de 4 semanas infectados após infecção subcutânea na pata esquerda com 10^5 UFF de OROV. Os animais são IRF5^{f/f} (genótipo selvagem) N=10, Cdh5cre+IRF5^{f/f} (dois alelos flox mutantes) N=17 e Cdh5cre+IRF5^{f/wt} (heterozigoto com apenas um alelo flox mutante) N=5. Resultados em A são apresentados como eventos de morte e em B como porcentagens individuais de peso. Quantificação do vírus por RT-qPCR nos tecidos (C) cérebro, (D) medula, (E) fígado, (F) baço, (G) rins e (H) linfonodos no momento em que o animal apresentava sinais de doença ou sofrimento, ou 21 dias pós infecção. Quantificação do vírus por RT-qPCR nos tecidos (I) cérebro, (J) medula, (K) fígado, (L) baço coletados 1, 3, 7, e 14 dpi. Cada ponto indica um indivíduo. O ponto vermelho indica o animal que apresentava sinais de acometimento neurológico no momento da coleta. As linhas pontilhadas representam o limite de detecção do ensaio.



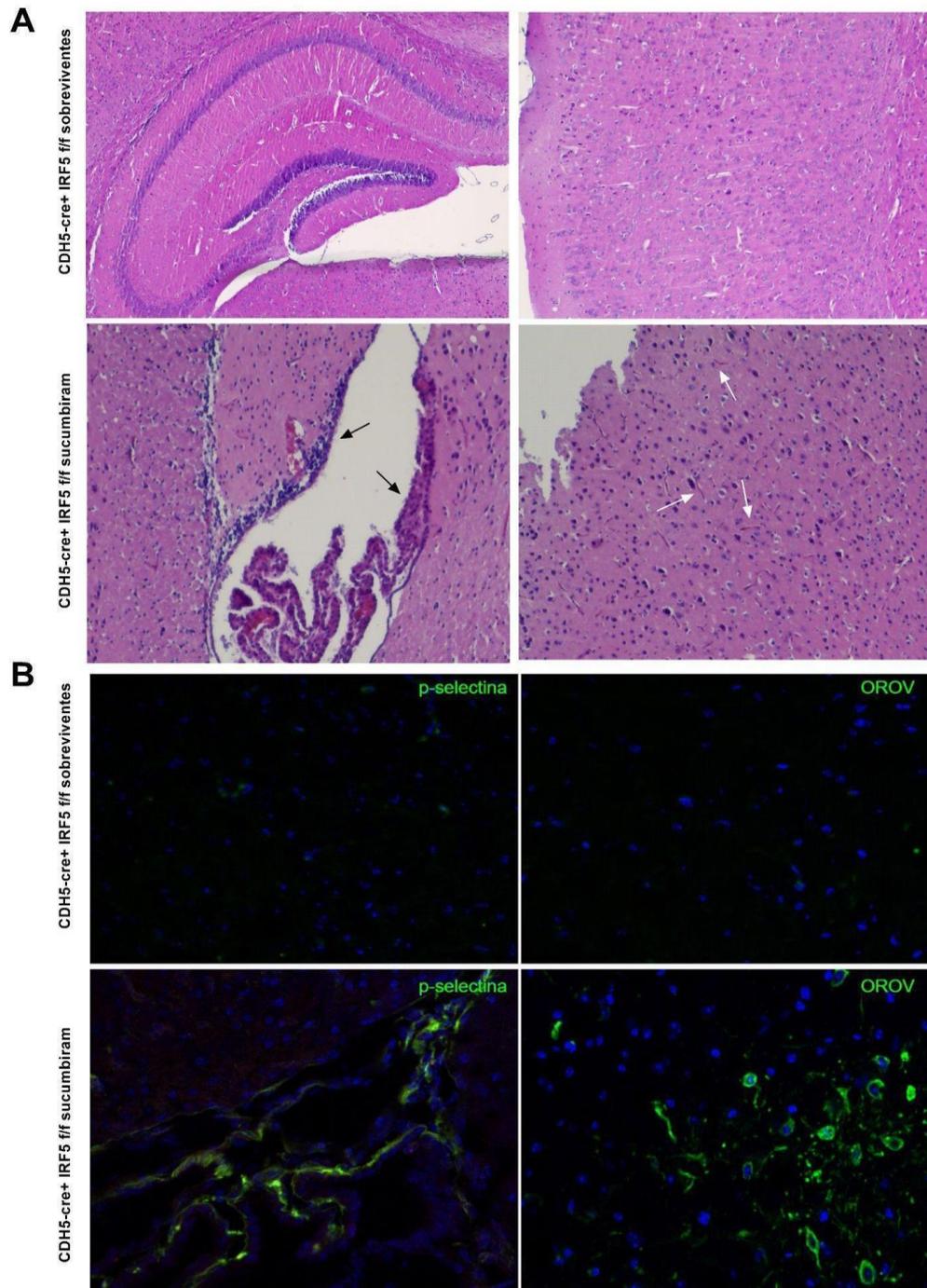
Fonte: Autoria própria

Análises histológicas do cérebro de animais com acometimento neurológico

Para avaliar como estava a estrutura do SNC desses animais devido ao acometimento neurológico, coletamos os cérebros no momento em que apresentavam sinais da doença para a realização de análises histológicas por coloração de Hematoxilina e Eosina (Fig 5, A). Animais *Cdh5cre+ IRF5f/f* infectados mas que não apresentavam sinais de doença no momento da coleta foram utilizados como controle. As análises histológicas permitiram observar um acúmulo de células na região perivascular (seta preta) nos animais com acometimento neurológico comparado com o controle e também um aumento no número de células com alterações morfológicas compatíveis com células da microglia ativadas (setas brancas) nos animais com manifestações neurológicas.

Também foi realizada marcação de antígenos virais e da molécula de adesão endotelial p-selectina por imunofluorescência no cérebro dos animais (Fig 5, B). Da mesma forma, nos animais com sinais neurológicos no momento da coleta, foi possível observar a marcação de antígenos virais no tecido cerebral. Essa marcação não é encontrada nos animais sem sinais de doença, indicando que de fato nos animais com acometimento neurológico o vírus está entrando e se replicando no SNC. Além disso, foi observada marcação de p-selectina na região de microvasos sanguíneos cerebrais nos animais com sinais de doença. A p-selectina é uma molécula essencial para adesão de células imunes ao endotélio em eventos que precedem o processo de entrada dessas células no tecido.

Figura 5 - Análise histológica de tecido cerebral de animais *Cdh5cre+IRF5 f/f* infectados. Coloração por Hematoxilina e Eosina (A) no cérebro dos animais *Cdh5cre+IRF5 f/f* infectados com OROV que sucumbiram a infecção ou que não apresentaram sinais de acometimento neurológico. Setas brancas indicam ativação de microglia e setas pretas acúmulo de células perivasculares. As imagens foram capturadas usando microscopia de luz, no aumento de 4x. Marcação de imunofluorescência no cérebro dos animais com marcação para OROV e p-selectina (B). As imagens foram capturadas usando microscopia de fluorescência confocal, com uma escala de 100 μ m.



Aumento da quantidade e adesão de leucócitos no microendotélio cerebral por análise de microscopia intravital.

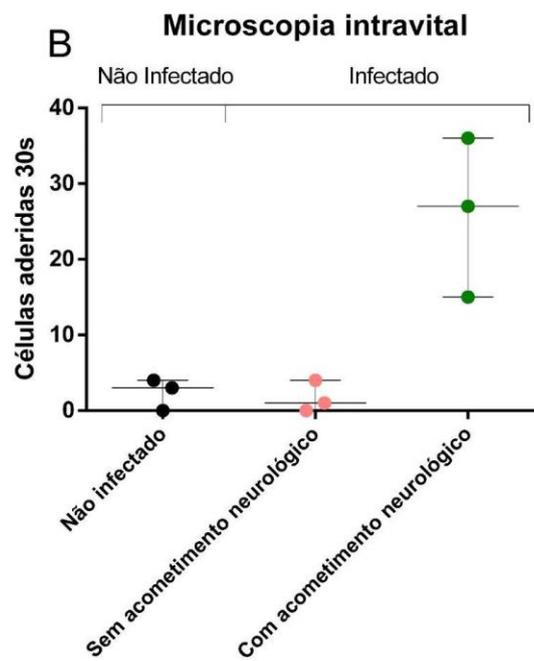
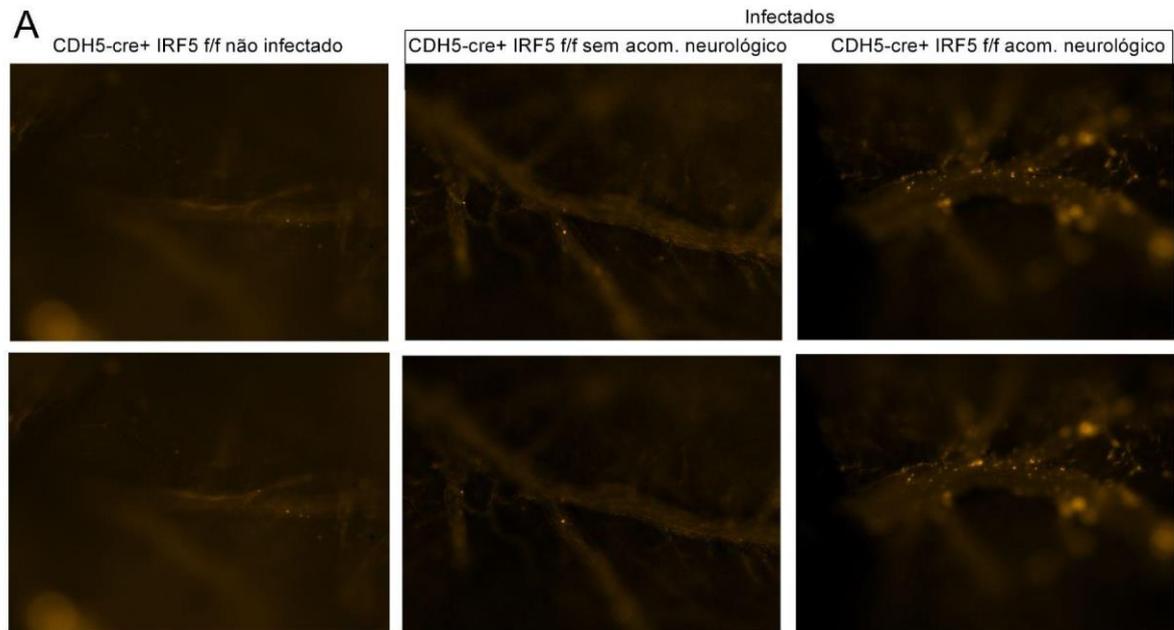
Com o objetivo de analisar o comportamento de leucócitos na microvasculatura cerebral dos animais nocautes condicionais que apresentavam sinais de acometimento neurológico, nós realizamos um ensaio de microscopia intravital. Neste ensaio fizemos a abertura de um espaço de aproximadamente 4mm no crânio dos animais anestesiados para expôr os vasos sanguíneos da pia máter e realizamos a infusão de Rodamina 6G na circulação sanguínea dos animais pelo plexo retro-orbital. A Rodamina 6G é um corante fluorescente que marca leucócitos e plaquetas. Utilizando microscopia intravital focamos nas veias superficiais para observação das células marcadas pelo corante.

A partir das imagens sequenciais obtidas foi possível observar que, nos animais que apresentavam sinais de acometimento neurológico no momento do experimento, existe uma maior quantidade de células marcadas pela Rodamina 6G circulantes (Fig. 6, A) e aderidas aos microvasos sanguíneos (Fig. 6, B) quando comparadas com animais não infectados e com animais infectados mas que não apresentavam sinais de acometimento neurológico no momento da obtenção das imagens. As animações completas obtidas das sequências de imagens capturadas no microscópio estão apresentadas na forma de vídeos podem ser visualizados no seguinte

link:

https://drive.google.com/drive/folders/1plr8mLzPTeOdjXk8WbO0HOIEMQVFEPF0?usp=drive_link

Figura 6 - Microscopia intravital no cérebro de animais infectados *Cdh5 cre+ IRF5 f/f* não infectados e infectados que apresentavam ou não sinais de acometimento neurológico no momento da coleta. Os leucócitos foram marcados por fluorescência com rodamina 6G e as fotos obtidas em microscopia de fluorescência com fotos tiradas a casa 1 segundo (A). Resultados apresentados em quantidade de leucócitos que se mantêm aderidos a parede da microvasculatura cerebral por um período de 30 segundos (B). Os resultados foram obtidos a partir da análise de 30 fotos de 3 animais para cada condição.



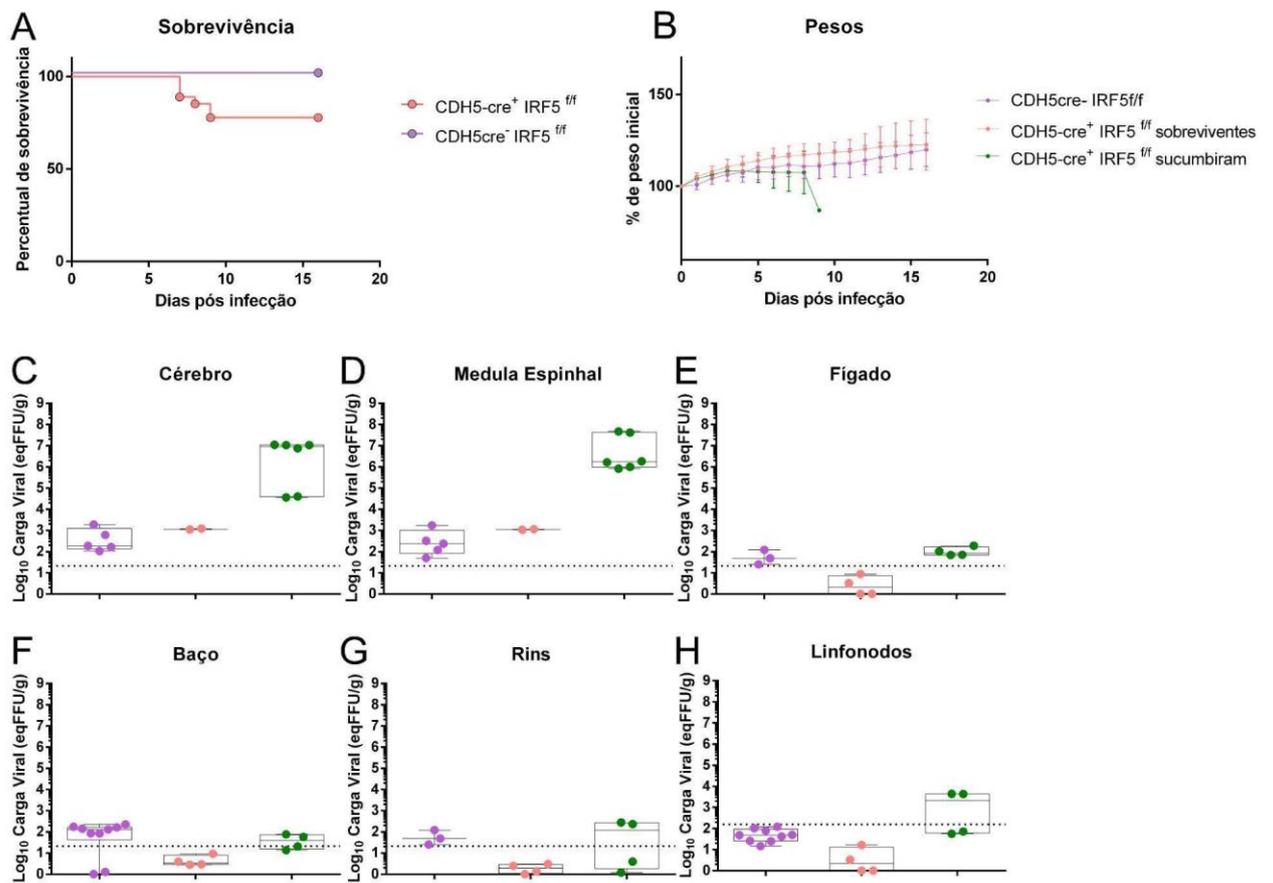
Fonte: Autoria própria

Entrada de OROV no SNC de animais após transferência de leucócitos infectados.

Para aprofundar nossos estudos sobre um possível mecanismo de cavalo de tróia na neuroinvasão de OROV, onde o vírus estaria sendo levado para o interior do SNC por células imunes, realizamos a transferência de células imunes infectadas *in vitro* para os animais nocautes condicionais. Para isso foi realizada a coleta do baço de animais selvagens, que foi usado para isolamento das células residentes no órgão. Tipicamente o baço é composto por linfócitos B e T, plasmócitos, além de células endoteliais que compõem os vasos sanguíneos que irrigam o órgão e hemácias que são lisadas no processo de isolamento das células. Essas células foram infectadas *in vitro* com uma MOI de 3 de OROV, para garantir que todas as células estariam infectadas. Depois de sucessivas lavagens as células foram transferidas pelo plexo retro-orbital para a corrente sanguínea de camundongos *Cdh5cre+ IRF5f/f* (N=4) e selvagens (N=3). Foi observado que 50% (N=2) dos animais *Cdh5cre+ IRF5f/f* receptores sucumbiram a infecção por OROV entre 7 e 14 dias pós infecção, no mesmo intervalo de tempo e apresentando os mesmos sinais de acometimento neurológico já descritos para os animais *Cdh5cre+ IRF5f/f* infectados pela via subcutânea na pata. (Fig. 7, A e B). Os animais apresentaram acentuada perda de peso (Fig. 7, B), perda de equilíbrio, letargia e paralisia dos membros inferiores, que foi notada antes dos outros sinais de adoecimento neste modelo.

A análise da carga viral dos tecidos por qRT-PCR mostrou a presença de altos títulos de vírus ($>10^8$ eqFFU/g) no cérebro e medula dos animais que sucumbiram à infecção. (Fig. 7, C-H). Assim como no modelo de infecção anterior, os outros órgãos não têm aumento expressivo no título viral em nenhum dos animais. Este resultado mostra que células circulantes infectadas com OROV são capazes de fazer com que animais com deleção de IRF5 em células endoteliais desenvolvam doença neurológica após infecção por OROV.

Figura 7 - Sobrevivência, perda de peso e carga viral nos tecidos de animais CDH5cre+IRF5f/f transfectados com células do baço infectadas com OROV. (A) Curva de sobrevivência e (B) perda de peso de animais de 4 semanas infectados pela via intravenosa na veia ocular com 2×10^6 células isoladas do baço e infectadas com MOI de 3 de OROV. Resultados em A são apresentados como eventos de morte e em B como porcentagens individuais de peso. Quantificação do vírus por RT-qPCR nos tecidos (C) linfonodos inguinais, (D) baço, (E) fígado, (F) rins, (G) cérebro e (H) medula espinhal no momento em que o animal apresentava sinais de doença ou sofrimento, ou 16 dias pós infecção. Cada ponto indica um indivíduo. As linhas pontilhadas representam o limite de detecção do ensaio



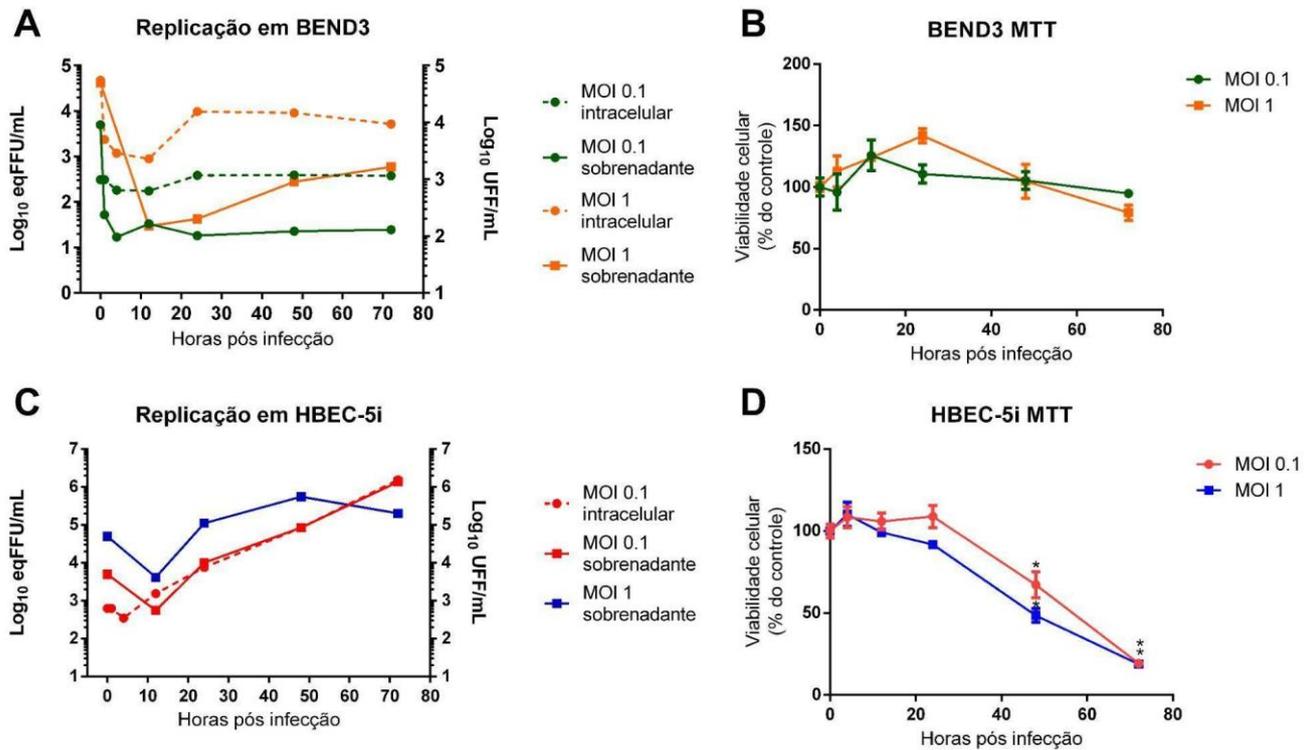
Fonte: Autoria própria

OROV replica em linhagens de células de microvasculatura endotelial cerebral humanas e murinas.

Com o objetivo de analisar a replicação de OROV em células do endotélio, realizamos a cinética de replicação viral em duas linhagens de microvasculatura cerebral, uma de humanos (HBEC-5i) e outra de camundongos (BEND3). Para tanto, as linhagens celulares foram infectadas com MOI de 1 e 0,1. Nossos resultados mostram que OROV consegue infectar ambas linhagens celulares, mesmo quando as células foram infectadas com uma baixa MOI de 0,1 (Fig. 8, A e B), indicando que a presença de possíveis componentes antivirais induzidos de forma parácrina, a partir da infecção de uma parte das células presentes no ensaio, não foi capaz de restringir completamente a infecção por OROV em células endoteliais. Enquanto na HBEC-5i a infecção viral é produtiva, com aumento em até 1 log na quantidade de vírus em tempos tardios da infecção, como 48 ou 72h (Fig. 8, C); a infecção em BEND3 é pouco eficiente e aparentemente produtiva apenas em células infectadas com MOI de 1. Em menores quantidades (MOI 0,1), o vírus se mantém dentro das células por até 72 h mas não é encontrado no sobrenadante (Fig. 8, A). Dessa forma, os dados mostram que OROV se replica mais eficientemente em células endoteliais humanas do que camundongos.

Além disso, com o objetivo de analisar a viabilidade celular ao longo da infecção, realizamos um ensaio de identificação de atividade metabólica celular pelo método de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina), nas células HBEC-5i e BEND3 infectadas com o vírus. Os resultados indicam que OROV não induz, ou induz pouca morte celular em BEND3, afinal não vimos uma diminuição da taxa de sobrevivência celular mesmo com a maior MOI de 1 (Fig. 8, B). Já em HBEC-5i, foi observado um aumento na taxa de morte celular nos tempos tardios da infecção, entre 48 h e 72 h, quando comparados com o controle 0 h, em ambos MOIs testados (1 e 0,1). (Fig. 8, D). Assim, estes resultados indicam que o OROV estabelece infecção produtiva, induz efeito citopático e morte de endotélio cerebral humano, o que pode ser importante durante o fenômeno de neuroinvasão em humanos. Já células endoteliais de camundongos permaneceram viáveis após infecção com OROV.

Figura 8 - Cinética de replicação e viabilidade em células endoteliais durante infecção por OROV com MOI 1 e 0,1. A quantificação do vírus em cada tempo da cinética (0, 1, 4, 12, 24, 48 e 72 horas pós infecção) em células BEND3 (A) e HBEC-5i (C) foi realizada por RT-qPCR na monocamada celular (linhas tracejadas) e por ensaio de formação de foco no sobrenadante celular (linhas contínuas). A viabilidade celular foi quantificada por ensaio de MTT ao longo da infecção por OROV nas células BEND3 (B) e HBEC-5i (D). Absorbância foi lida em 570 nm.



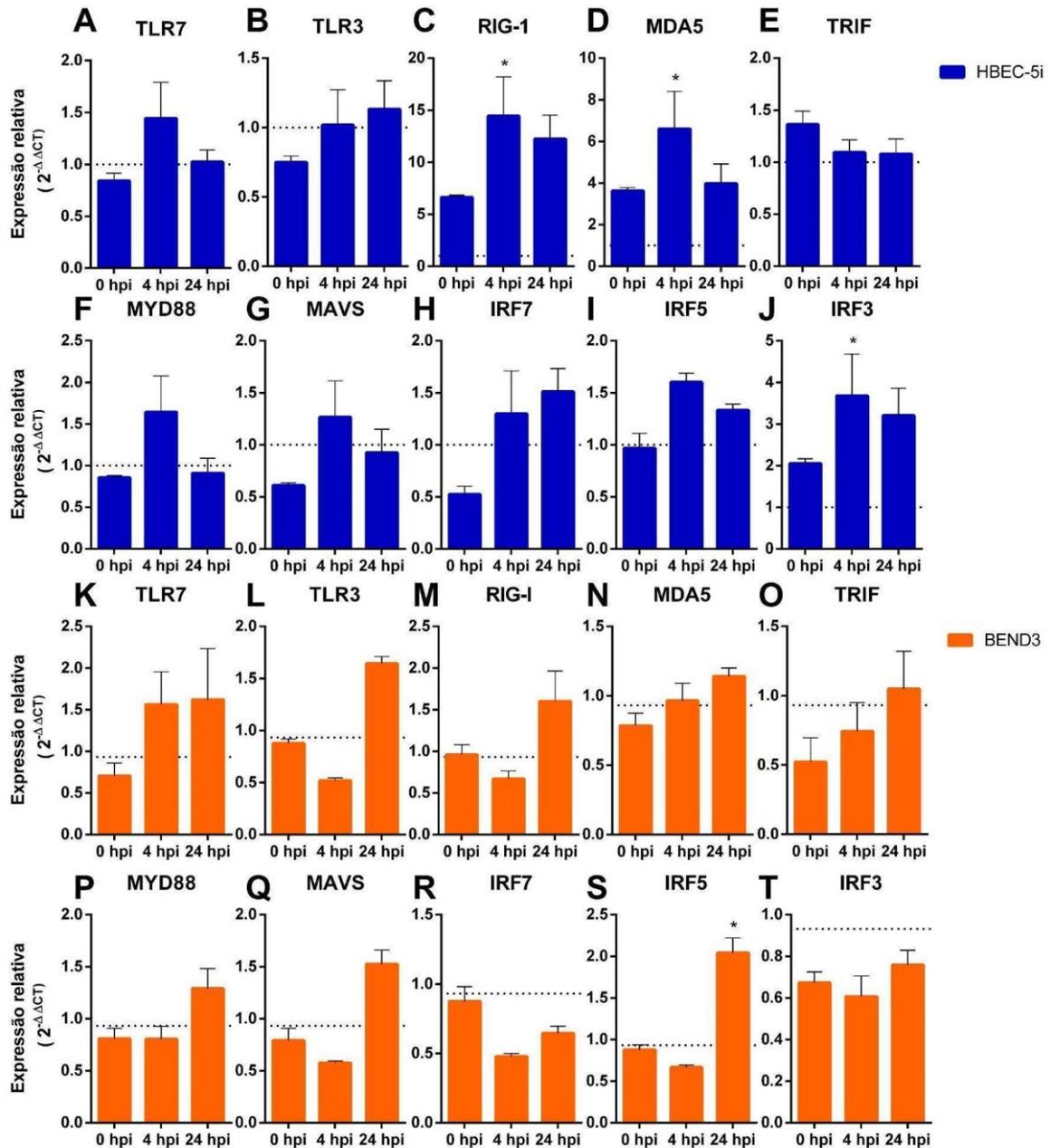
Fonte: Autoria própria

OROV regula expressão de genes associados à resposta imune inata

Para caracterizar o padrão de resposta associado com proteção ou permissividade de células endoteliais após infecção com OROV, avaliamos a expressão gênica de BEND3 e HBEC-5i em diferentes momentos, 0, 4 e 12 horas, após infecção com OROV utilizando uma MOI de 1. Para isso, a monocamada celular dos tempos iniciais de infecção 0, 4 e 24 h foram coletados e analisados por qPCR para a expressão de fatores associados à resposta imune inata como as vias de reconhecimento (*Toll Like Receptor 3 e 7*, RIG-I e MDA5), sinalização (TRIF, MYD88, MAVS, IRF-3, IRF-5 e IRF-7), interferons (IFN- β) e genes estimulados por interferon (ISGs) (IFITM2, IFIT1 e IFIT2).

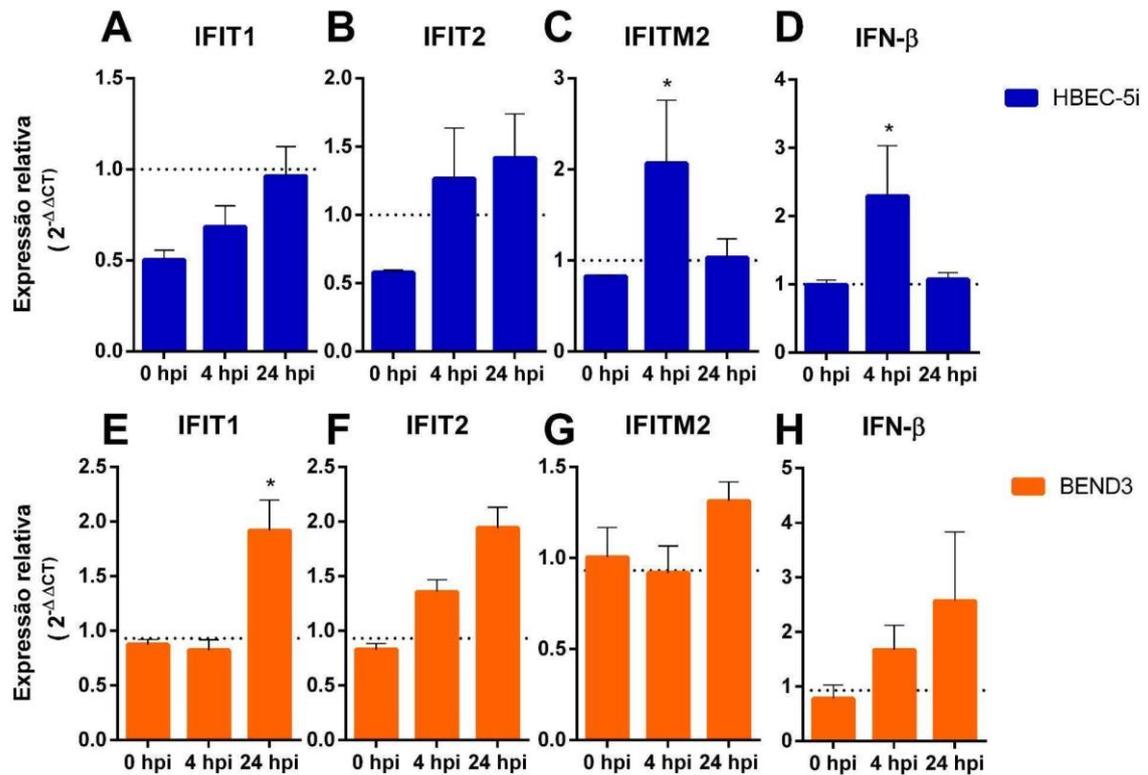
Ambas as células apresentaram modulação gênica de vias de reconhecimento e sinalização, sendo possível observar aumento da expressão de RIG-I, MDA5 e IRF-3 nos tempos iniciais (4hpi) da infecção nas células HBEC-5i (Fig 9, A-J). Enquanto nas células BEND3 também foi possível observar uma tendência de aumento de genes de algumas vias, com destaque para o aumento significativo de IRF-5 em 24 hpi (Fig 9, K-T). Como resultado da ativação dessas vias, também foi possível observar aumento da expressão de IFN-B nas duas células, assim como aumento da expressão dos ISGs IFIT1, IFIT2 e IFITM2 (Fig 10, A-H).

Figura 9 - Expressão de genes das vias de reconhecimento e sinalização da resposta imune inata em células endoteliais após infecção com OROV. Cinética de expressão gênica quantificada por qPCR, em cultura de células BEND3 após infecção com OROV (laranja) (A-J) e cultura de células HBEC-5i (azul) (K-T). A linha tracejada representa a média da expressão gênica do controle. As barras representam médias da expressão relativa do gene alvo +/- erro padrão. Diferenças significativas pelo teste two way ANOVA seguido de teste Sidak estão representadas por * $p < 0,05$.



Fonte: Autoria própria

Figura 10 - Expressão de Interferon (IFN) e genes estimulados por Interferon (ISGs) em células endoteliais após infecção com OROV. Cinética de expressão gênica quantificada por qPCR, em cultura de células BEND3 após infecção com OROV (laranja) (A-D) e cultura de células HBEC-5i (azul) (E-H). A linha tracejada representa a média da expressão gênica do controle. As barras representam médias da expressão relativa do gene alvo +/- erro padrão. Diferenças significativas pelo teste two way ANOVA seguido de teste Sidak estão representadas por * $p < 0,05$.



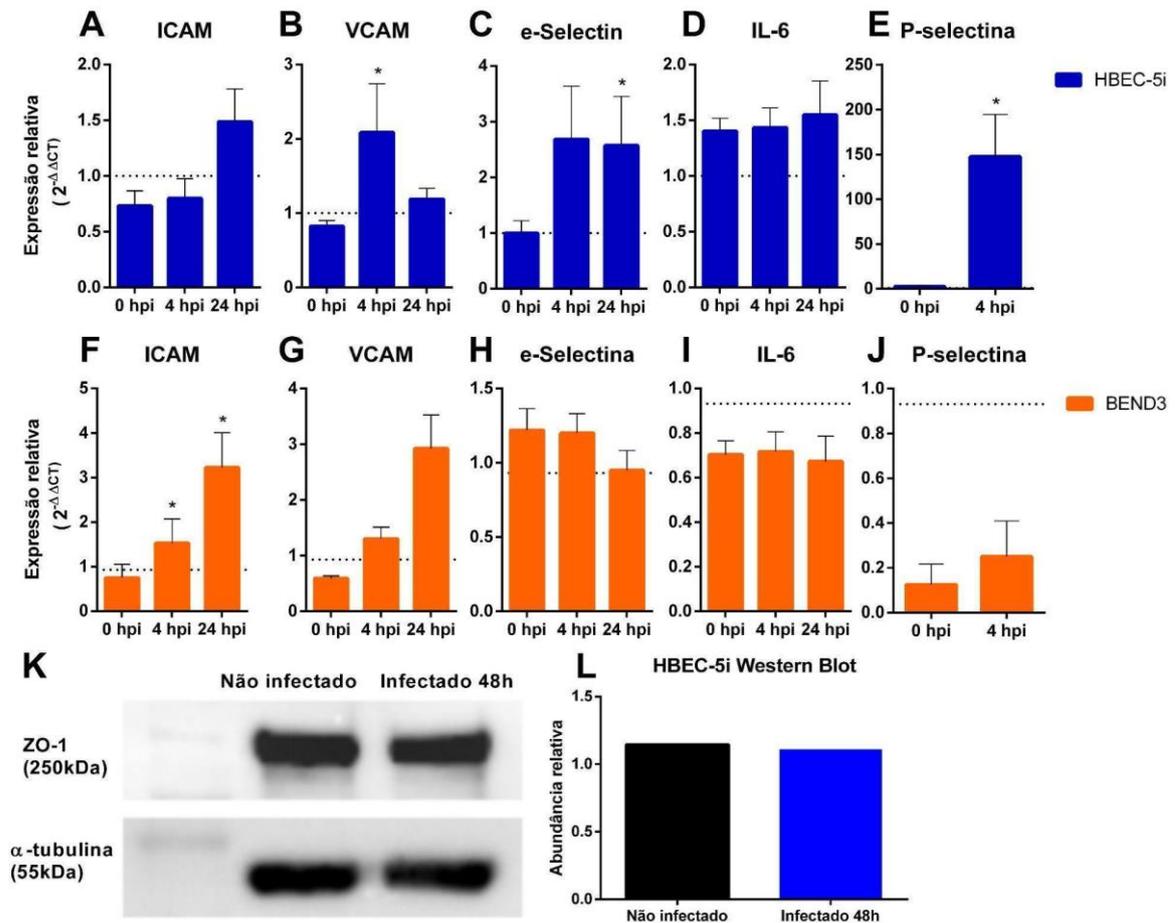
Fonte: Autoria própria

Regulação da expressão de fatores de adesão endoteliais, mas não de junções oclusivas após infecção por OROV

Para caracterizar a modulação de fatores que possam estar associados com alterações na barreira hematoencefálica, analisamos os fatores de adesão endoteliais ICAM, VCAM, p-selectina e e-selectina, a citocina pró-inflamatória IL-6 e a junção oclusiva ZO-1. As análises foram realizadas pelo padrão de expressão gênica por qPCR em diferentes momentos após infecção de BEND3 e HBEC-5i e também expressão de proteínas por western blot.

Os resultados de expressão gênica indicam que houve indução da expressão de fatores de adesão endoteliais em ambas as células, como ICAM e VCAM nas células murinas (Fig. 11, F e G) e VCAM, e-selectina e um aumento expressivo de p-selectina nas células humanas (Fig. 11, B, C e E). Os fatores de adesão são essenciais para a aderência e transmigração de células imunes por células endoteliais. A citocina pró-inflamatória IL-6 que é conhecida por promover a ruptura da barreira hematoencefálica não teve modulação diferencial em nenhuma das células (Fig. 11, D e I), assim como a junção oclusiva ZO-1 (Fig. 11, K e L), indicando que a infecção por OROV não leva a modulação de fatores relacionados com a ruptura da integridade da ligação entre células endoteliais.

Figura 11 - Expressão de fatores de adesão endoteliais e junções oclusivas em células endoteliais após infecção com OROV. Cinética de expressão gênica quantificada por qPCR, em cultura de células BEND3 após infecção com OROV (laranja) (A-E) e cultura de células HBEC-5i (azul) (F-J). A linha tracejada representa a média da expressão gênica do controle. As Barras representam médias da expressão relativa do gene alvo +/- erro padrão. Diferenças significativas pelo teste two way ANOVA seguido de teste Sidak estão representadas por * $p < 0,05$. Ensaio de Western Blott onde foi analisado a expressão da proteína ZO-1 em células HBEC-5i 48 h pi com OROV (K) e a sua quantificação relativa utilizando alpha-tubulina como controle (L).



Fonte: Autoria própria

Passagem de OROV em sistema de Transwell sem alterações na integridade da barreira

Para analisar se a infecção por OROV leva a disrupção da integridade da barreira de células endoteliais, realizamos experimentos utilizando o sistema de Sensor Elétrico de Impedância de Substrato Celular (do inglês ECIS), um método que quantifica impedância em tempo real para análise do comportamento de uma monocamada celular. Neste sistema a monocamada celular cresce fixada a uma placa que contém eletrodos na sua parte inferior, assim elas funcionam como um isolante aumentando a medida de impedância. Conforme vão ocorrendo distúrbios nas ligações entre as células ou morte celular, as pequenas correntes alternadas e não invasivas geradas pelo eletrodo são captadas pelo instrumento diminuindo a impedância captada. Ou seja, quanto menor a impedância, maior a disrupção da barreira que aquelas células estavam formando. Após a formação da monocamada no eletrodo, determinada pela impedância próxima de 1, foi realizada a infecção com OROV utilizando a MOI de 1.

Os resultados obtidos pelo ECIS indicam que a infecção pelo vírus em células endoteliais humanas causa alterações na barreira celular que se inicia em 36 hpi (Fig. 12, A). Já nas células murinas não foi observado disrupção da barreira celular devido a infecção viral, neste caso a diminuição de impedância ao longo do tempo ocorre em todas as condições e controles negativos ao mesmo tempo, sendo um indício de morte celular devido ao tempo de cultivo (Fig. 12, C). Nos dois casos a trombina foi utilizada como controle positivo por induzir a quebra de barreira.

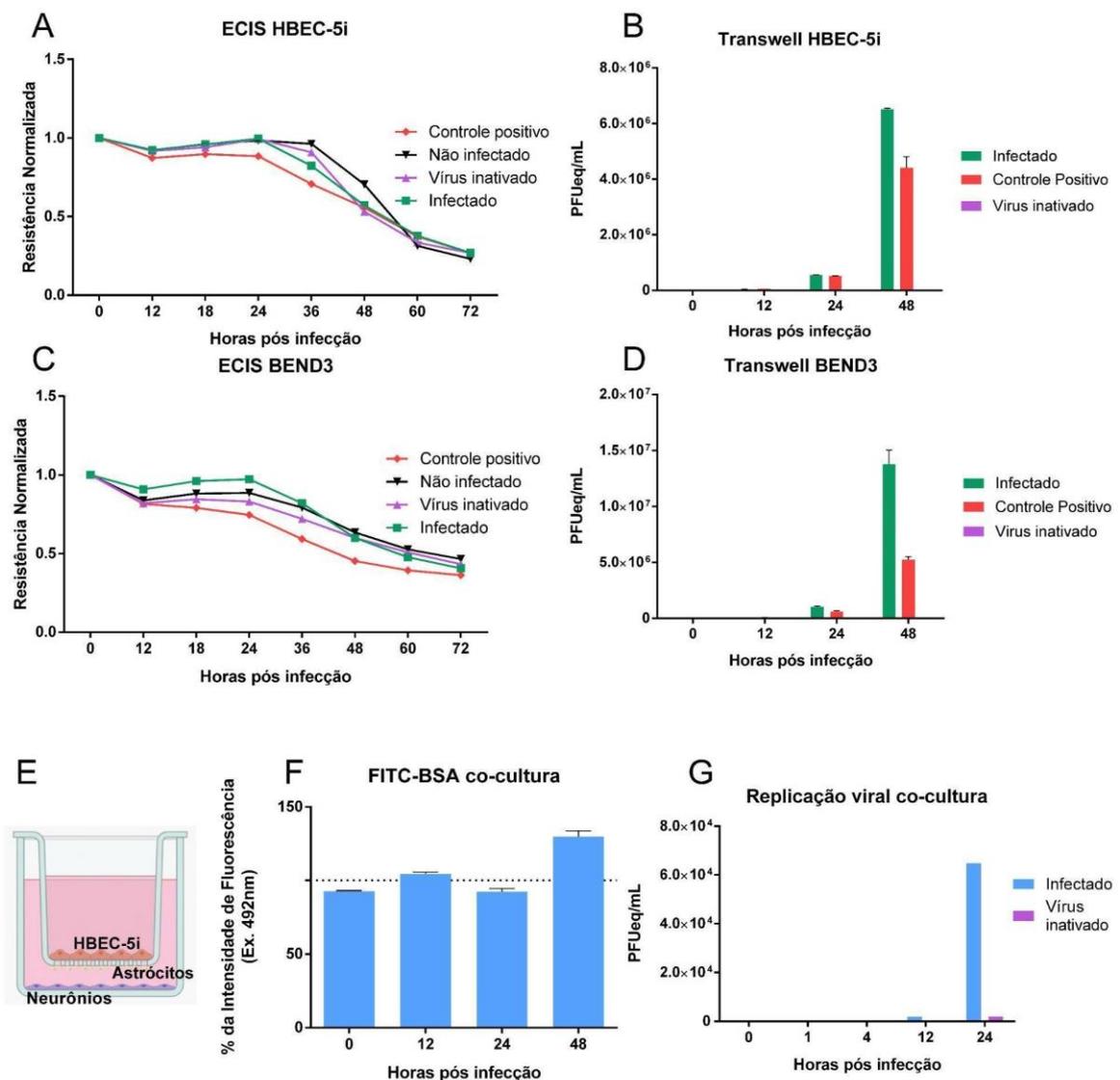
Ao mesmo tempo da realização desses experimentos, as células endoteliais foram cultivadas em sistemas de transwell, seguindo a mesma concentração celular e protocolos de infecção do ECIS. Neste sistema as células são cultivadas em membranas de 0,4µm que fazem a separação do inserto e do fundo do poço. Após a formação da monocamada celular, nós realizamos a infecção com OROV utilizando a MOI de 1, com o objetivo de observar se o vírus é capaz de passar por essa barreira celular formada. Apesar do ECIS indicar quebra da barreira causada pela infecção viral em HBEC-5i apenas após 36hpi e não indicar quebra na BEND3, em ambos modelos cultivados em transwell o vírus foi encontrado na câmara inferior por RT-qPCR já em 24hpi (Fig. 12, B e D). O que indica que o vírus passa pela barreira endotelial mesmo antes de causar quebra de junções oclusivas ou morte celular.

Com o objetivo de tornar o modelo de transwell ainda mais complexo para mimetizar a barreira hemato-encefálica, que contém diversos tipos celulares, cultivamos células HBEC-5i na câmara superior do inserto, imediatamente abaixo foram cultivados astrócitos e no fundo do poço foram

cultivados neurônios (SH) (Fig. 12, E). As células foram incubadas com um conjugado de FITC com albumina do soro bovino (BSA, do inglês *bovine serum albumin*) em diferentes tempos após infecção. A presença de fluorescência do FITC na câmara inferior do modelo indica quebra da barreira, pois só ocorre no caso de passagem de BSA pela camada de células endoteliais. Isso porque o BSA é uma proteína grande que naturalmente não cruza a barreira hematoencefálica em seu estado preservado. Nossos resultados indicam que um aumento da passagem de FITC-BSA pela barreira ocorre apenas após 48 hpi em comparação com o controle sem vírus (Fig. 12, F). Porém foi possível detectar vírus viáveis na câmara inferior por ensaio de RT-qPCR já em 12 hpi, indicando que sua passagem pode ocorrer mesmo na presença da barreira ainda intacta (Fig. 12, G). Um fator interessante é que o vírus foi detectado na câmara inferior 12 horas antes do que comparado com o modelo de transwell contendo apenas as células endoteliais, utilizando o mesmo método de detecção, indicando que de alguma forma a presença de vários tipos celulares pode auxiliar na passagem do vírus.

Figura 12 - OROV cruza a monocamada de células endoteliais sem causar aumento de permeabilidade.

Quantificação da resistência na monocamada celular por ECIS em células HBEC-5i (A) e BEND3 (C). Como controle positivo foi utilizado a trombina e como controle negativo células não infectadas. As células HBEC-5i (B) e BEND3 (D) foram cultivadas na parte superior de insertos de transwell e a quantidade de vírus na câmara inferior do modelo foi analisada por ensaio de RT-qPCR. Esquema gráfico do ensaio indicando que células HBEC-5i foram cultivadas na parte superior de insertos de transwell imediatamente abaixo cultivados astrócitos e neurônios (SH) no fundo do poço (E). Células com diferentes tempos de infecção foram incubadas com FITC-BSA durante 30 min e a fluorescência na câmara inferior do inserto foi quantificada por espectrometria, a porcentagem foi calculada com relação aos insertos não infectados (F). Em pontilhado temos indicado a porcentagem do inserto não infectado. A quantidade de vírus na câmara inferior do modelo foi analisada por ensaio de RT-qPCR (G).



Fonte: Autoria própria

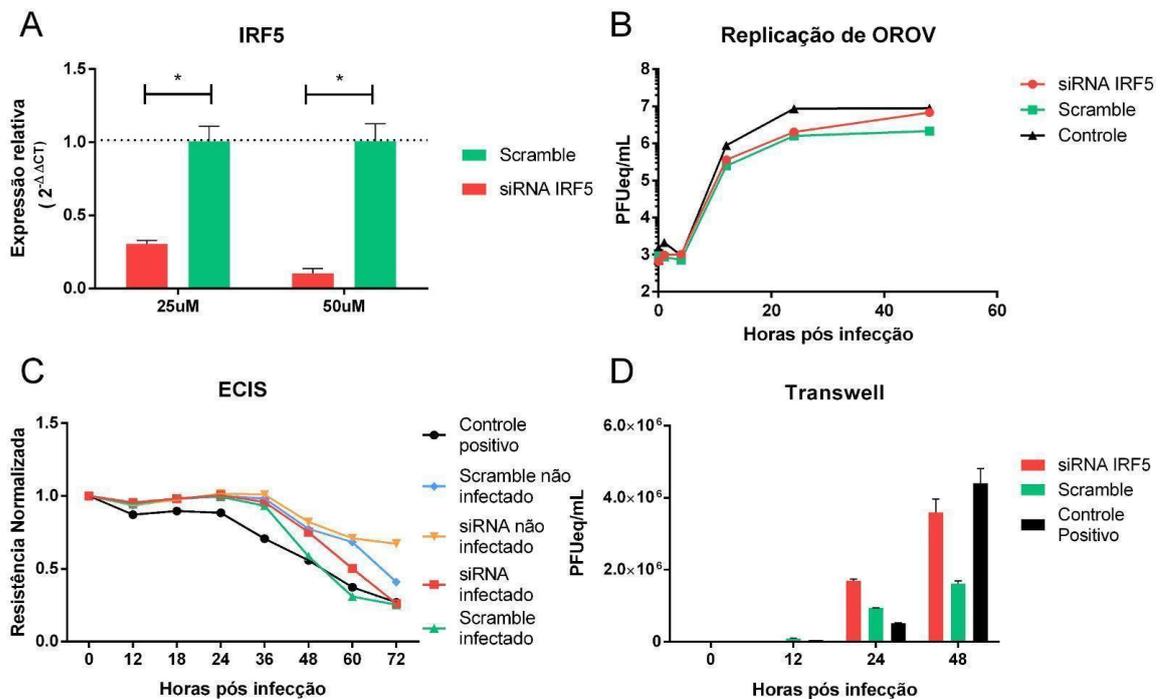
Avaliação da ausência de IRF5 na replicação de OROV nas células endoteliais

Após constatar os efeitos de IRF5 no modelo de células endoteliais *in vivo* fomos avaliar o papel desse gene na replicação e manutenção da barreira de células endoteliais humanas *in vitro*. Para isso, fizemos o silenciamento do IRF5 em células HBEC-5i utilizando o kit comercial (Dharmacon Reagents) seguindo as recomendações do fabricante utilizando as concentrações de 25uM e 50uM de siRNA para definir a melhor concentração de uso e coletamos após 24h para quantificação da expressão gênica. Observamos por análise de qPCR que ambas concentrações funcionaram para inibição da expressão de IRF5 (Fig. 13, A).

Realizamos a transfecção com o siRNA IRF5 ou siRNA SCRAMBLE (controle negativo da transfecção) na concentração de 50uM por 24h antes da infecção com OROV utilizando uma MOI de 0,1 e coletamos o sobrenadante em diferentes tempos para obter uma cinética de replicação viral. As células transfectadas não apresentaram diferença significativa na replicação viral com relação ao controle scramble e ao controle infectado não transfectado em nenhum dos tempos analisados, atingindo altos títulos ao final de 48h de infecção (Fig. 13, B).

Também foi repetido o ensaio de ECIS e o modelo de transwell com a inibição de IRF5 nas células endoteliais por siRNA. Os resultados foram similares aos encontrados nas células não transfectadas já descritos. O vírus é encontrado na câmara inferior do inserto de transwell já em 12hpi e 24hpi (Fig. 13, D), mesmo antes de serem detectadas alterações na integridade da barreira de células endoteliais por ensaio de ECIS (Fig. 13, C), indicando que o efeito facilitador da deleção de IRF-5 para a neuroinvasão por OROV é indireto, não aumentando a replicação ou taxa de morte de células endoteliais.

Figura 13 - Silenciamento de IRF5 em células HBEC-5i infectadas com OROV. As células HBEC-5i foram transfectadas com 50uM ou 25uM de siRNA IRF5 ou siRNA SCRAMBLE e a expressão do gene IRF-5 foi quantificado por qPCR (A). As barras representam médias da expressão relativa do gene alvo +/- erro padrão. A linha tracejada representa a média da expressão do gene em células não transfectadas. Diferenças significativas pelo teste two way ANOVA seguido de teste Sidak estão representadas por * $p < 0,05$. A quantificação do vírus em cada tempo da cinética (0, 1, 4, 12, 24, 48 e 72 horas pós infecção) em células HBEC-5i transfectadas com 50uM de siRNA IRF5 ou siRNA SCRAMBLE foi realizada por RT-qPCR no sobrenadante (B). Quantificação da resistência na monocamada celular por ECIS em células HBEC-5i transfectadas. Como controle positivo foi utilizado a trombina e como controle negativo células não infectadas (C). As células HBEC-5i transfectadas foram cultivadas na parte superior de insertos de transwell e a quantidade de vírus na câmara inferior do modelo foi analisada por ensaio de RT-qPCR (D).



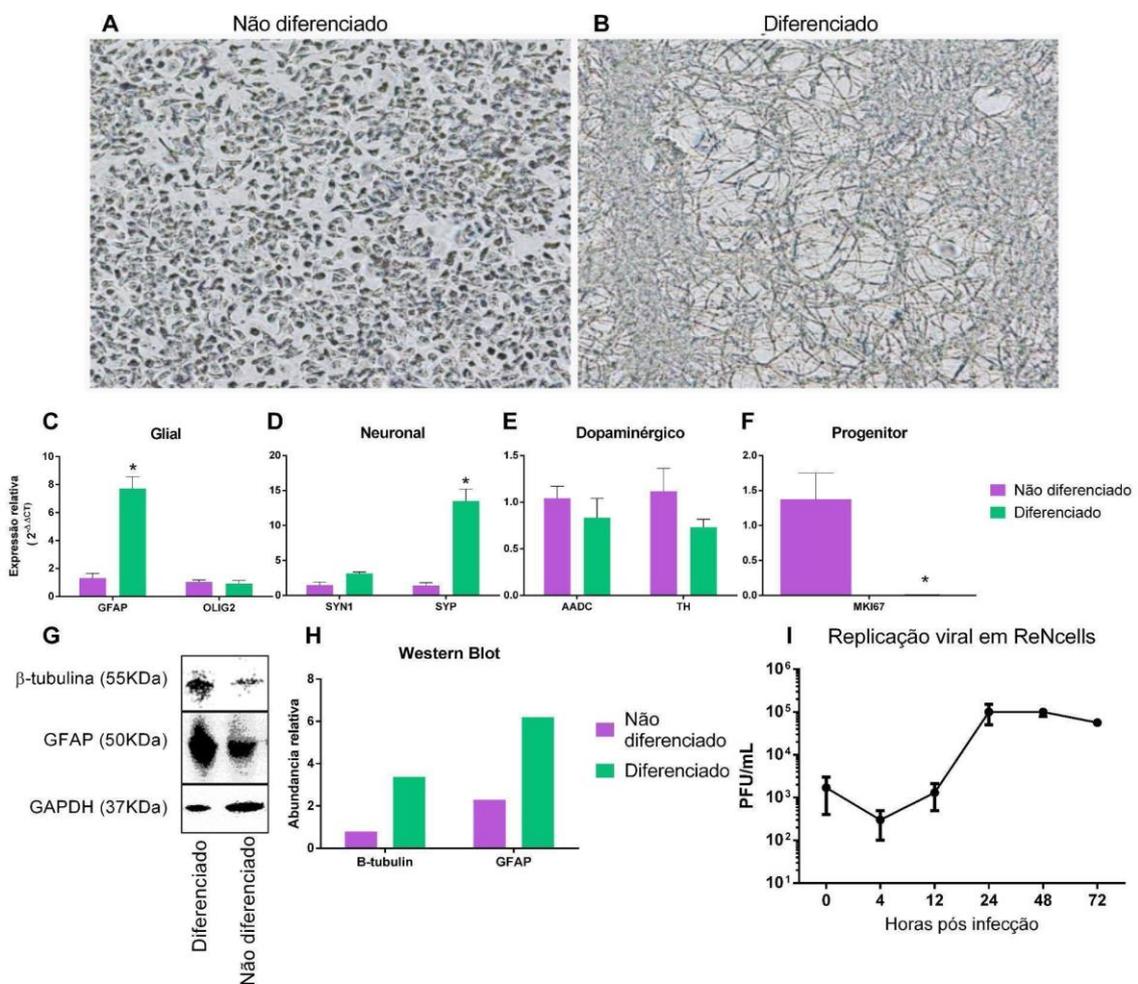
Fonte: Autoria própria

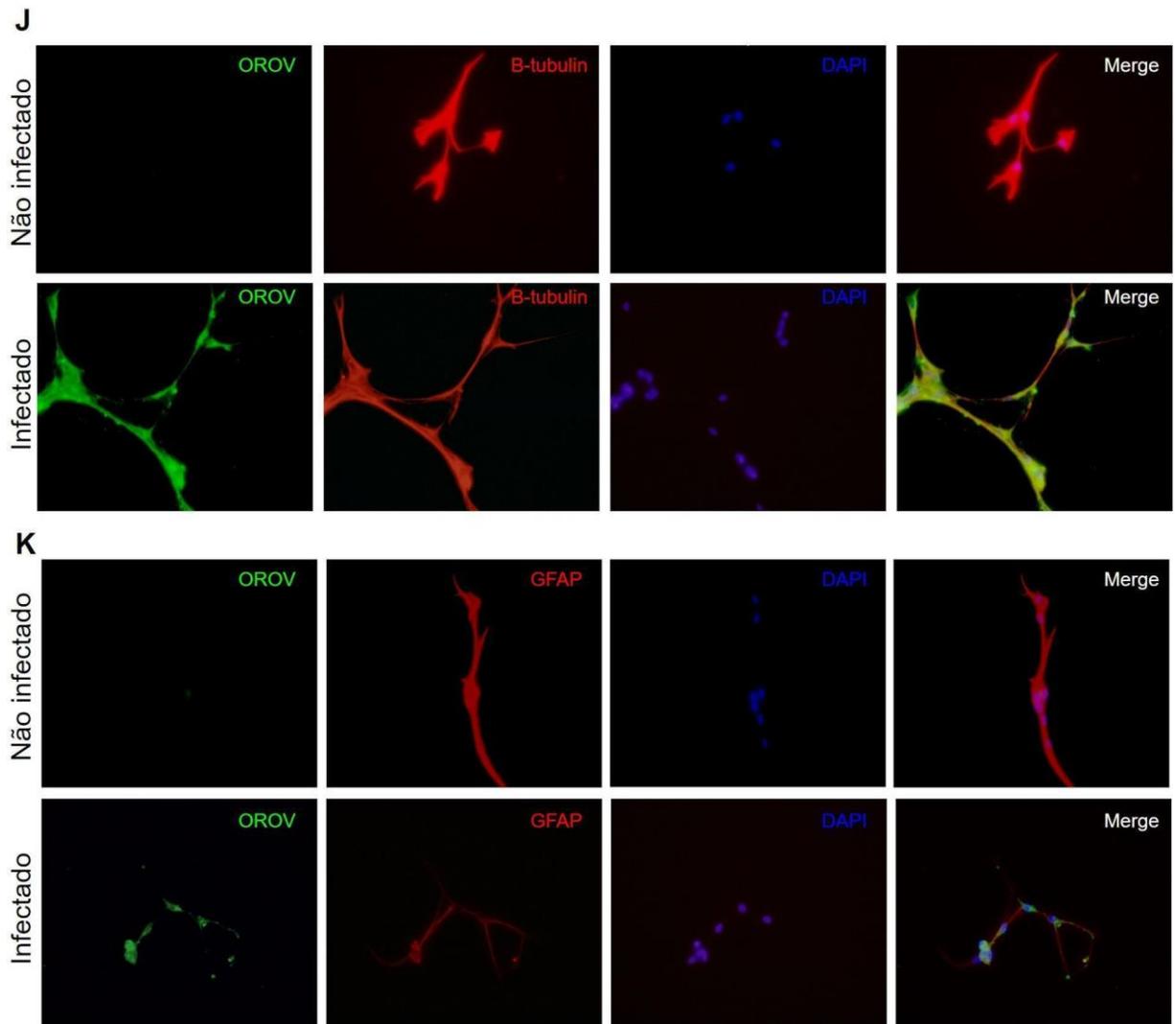
Células neuronais e células da glia diferenciadas de precursoras neurais humanas são permissivas à infecção por OROV

Como a expressão de IRF5 em células endoteliais humanas não se mostrou ser um fator que atua diretamente na replicação viral ou passagem do vírus pela barreira hemato-encefálica, decidimos explorar outros tipos celulares do SNC humano. Para isso utilizamos um modelo de células precursoras neurais humanas (ReNcell) derivadas da região mesencefálica ventral do cérebro humano que foram diferenciadas conforme descrito na metodologia por 14 dias. Durante o processo de diferenciação, uma mudança conformacional na estrutura celular pode ser observada, passando de uma morfologia poligonal para um processo de alongação celular, com estruturas semelhantes a axônios crescendo a partir dos corpos celulares (Fig. 14, A e B). A análise genética por qPCR revela aumento na expressão de genes associados à diferenciação de células gliais (GFAP) e diferenciação neuronal (SYP) após 14 dias. Enquanto isso, o marcador de células progenitoras (MKI67) mostra expressão diminuída após 14 dias (Fig. 14, C-F). A análise de western blot de marcadores neuronais e astrocíticos, β -tubulina e GFAP, respectivamente, também foi conduzida. Foi possível observar um aumento dessas proteínas em células ReN diferenciadas após 14 dias, em comparação com a expressão de GAPDH.

O primeiro objetivo então foi determinar se a cultura de ReNcells diferenciadas era permissiva a infecção por OROV. As células foram infectadas com OROV utilizando uma MOI de 0,1 e os sobrenadantes foram coletados nos tempos 0, 4, 12, 24, 48 e 72 hpi. Os sobrenadantes foram titulados por ensaio de formação de placas e os resultados demonstram que as células ReN diferenciadas são suscetíveis à infecção por OROV e o vírus pode se replicar produtivamente, atingindo sua replicação máxima de 10^5 PFU/mL em 24hpi (Fig. 14, I). Além disso, foi possível observar a marcação do vírus em células neurais e gliais 24hpi por ensaio de imunofluorescência, o que também demonstra que essas células estão sendo infectadas pelo vírus (Figura 14, J e K)

Figura 14 - Diferenciação e infecção de células ReNcells. Diferenças morfológicas em imagens obtidas por microscopia de luz com aumento de 10X da linhagem celular ReN indiferenciada (A) e após passar por um processo de diferenciação de 14 dias (B). Expressão gênica de marcadores de diferenciação celular quantificados por qPCR em células indiferenciadas e após 14 dias de diferenciação (C-F). As barras representam médias da expressão gênica alvo relativa +/- erro padrão. Diferenças significativas por ANOVA de duas vias seguido pelo teste de Sidak são indicadas por $*p < 0,05$. Ensaio de Western Blot onde a expressão das proteínas β -tubulina, GFAP e GAPDH foi analisada em células ReN indiferenciadas e após 14 dias de diferenciação (G), e sua quantificação relativa usando GAPDH como controle (H). Quantificação do vírus no sobrenadante coletado em cada ponto de tempo da cinética (0, 4, 12, 24, 48 e 72 horas pós-infecção) foi realizada por ensaio de formação de placa. Dados representados em unidades formadoras de placas (PFU) por mililitro (mL) (I). Imunofluorescência realizada às 24 horas após a infecção (hpi) em células ReN cultivadas em lâminas de vidro e infectadas com OROV a uma Multiplicidade de Infecção (MOI) de 1. A coloração foi realizada usando anticorpos anti-OROV e anti- β -tubulina (J) ou anti-GFAP (K). Os núcleos foram corados com DAPI. As imagens foram capturadas usando microscopia de fluorescência, com uma escala de 100 μ m.





Fonte: Autoria própria

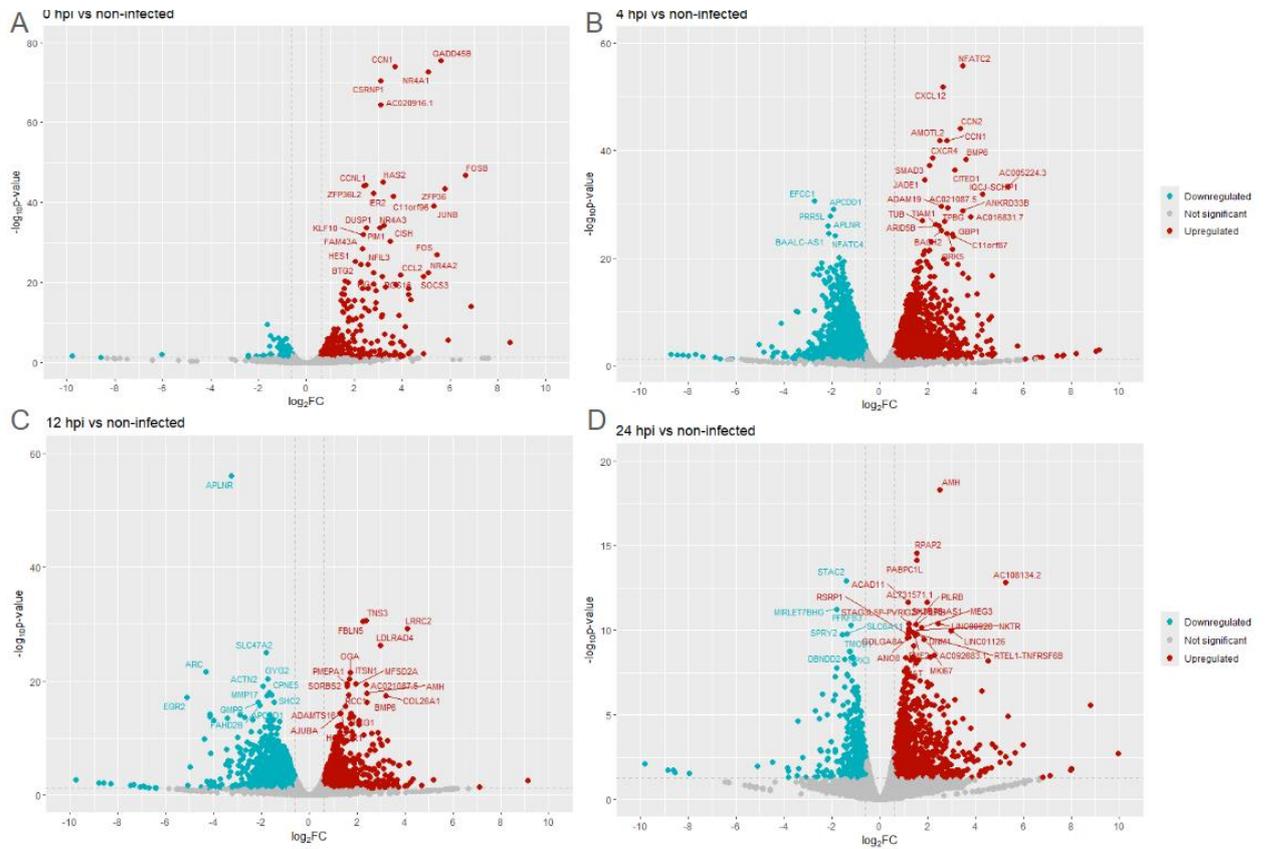
A infecção por OROV leva à modulação de genes celulares conforme determinado pelo ensaio de RNA-seq.

Com o objetivo de traçar o perfil de expressão gênica na cultura mista de células da glia e neurônios, realizamos análises de transcriptoma em células ReN infectadas e não infectadas com OROV. Para isso foram utilizadas as mesmas células coletadas na cinética de replicação viral.

A obtenção dos dados por Sequenciamento de Próxima Geração (NGS) foi realizada pela empresa GENEWIZ (Azenta). O software R foi utilizado para avaliar os dados do sequenciamento de RNA. Alterações de \log_2 fold (\log_2 fold-change $\geq 1/\log_2$ fold-change ≤ -1) e o valor ajustado de $p < 0,05$ foram utilizados para avaliar o grau de expressão diferencial. Os 30 genes com maior regulação em todos os tempos analisados, seja positiva ou negativa, foram indicados nos gráficos de vulcão (Fig. 15, A-D), fornecendo uma indicação visual de sua importância na reação do hospedeiro à infecção viral.

Entre os genes que foram mais expressos em células infectadas destacam-se aqueles com função neuroprotetora (GADD45B e FOSB), genes que regulam a adesão celular a barreira endotelial (CCN1, CCN2 e FBLN5), migração celular (TNS3), que atuam em processos celulares diversos como proliferação celular, diferenciação e apoptose (NR4A1, RPAP2, PMEPA1, CSRNP1, NFATC2, CCNL1, LDLRAD4 e PABPC1L) e genes relacionados com a resposta imune (CXCR4, CXCL12 e BMP6). Já entre os genes com regulação negativa temos aqueles que atuam no metabolismo celular (PFKFB3, GMPR e PRR5L), transporte de íons pela membrana (EFCC1 e SLC47A2), atividade e desenvolvimento neuronal (ARC, STAC2, SLC6A11 e SPRY2) e angiogênese (APLNR).

Figura 15 - Gráficos de Vulcão da análise de expressão gênica por RNA-seq a partir de sobrenadantes de células diferenciadas ReN não infectadas (mock) e infectadas por OROV em 0h (A), 4h (B), 12h (C) e 24h (D) pós-infecção. Genes com mudança \log_2 fold ≥ 1 ou \log_2 fold ≤ -1 e valor de p ajustado $< 0,05$ são destacados em vermelho para genes super regulados e em azul para genes super regulados para baixo. Os nomes dos 30 principais genes diferencialmente expressos são rotulados no gráfico.



Fonte: Autoria própria

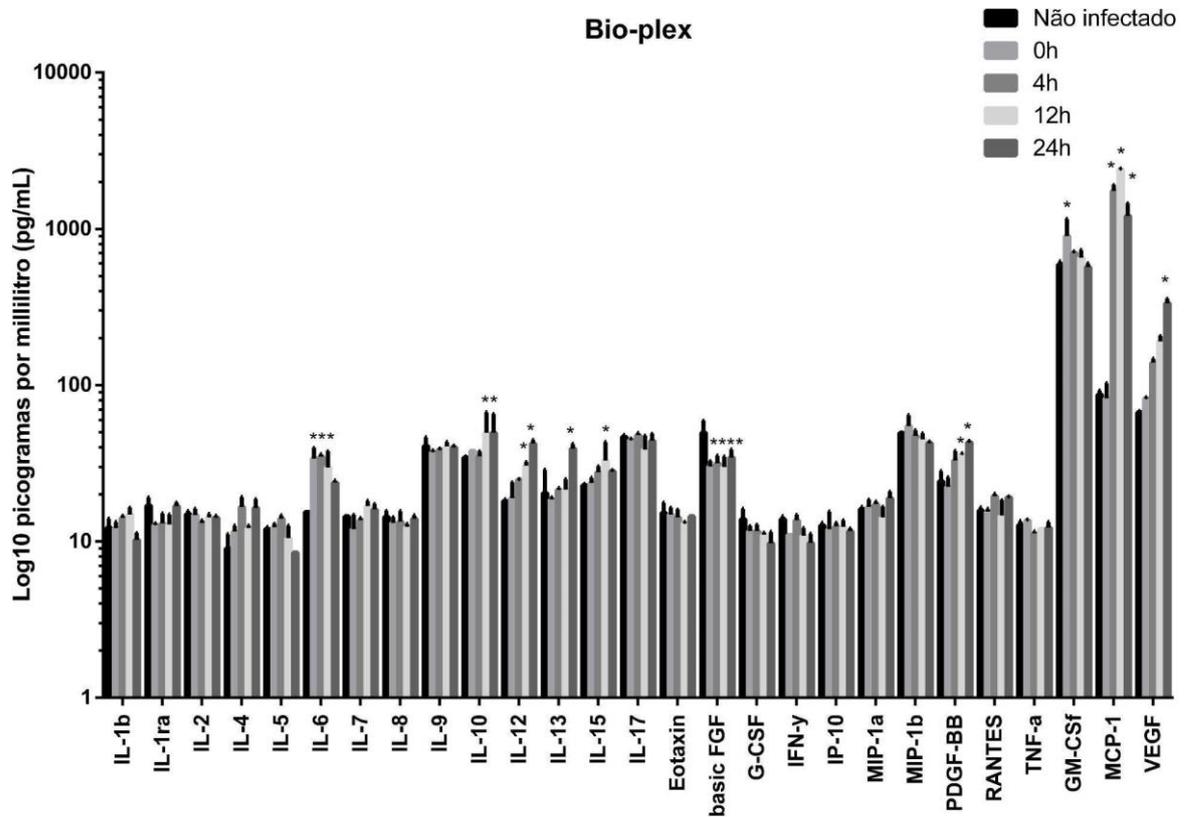
Liberação de citocinas e quimiocinas no sobrenadante de neurônios e astrócitos diferenciados infectados com OROV.

Os sobrenadantes coletados durante o ensaio de cinética de replicação viral foram utilizados para análise por Bio-plex. Isso nos permitiu delinear o perfil de citocinas e quimiocinas em neurônios e células da glia diferenciados durante a infecção por OROV.

Foi possível detectar um aumento da liberação dos fatores de crescimento PDGF-BB, GM-CSF, e VEGF. Também observamos que algumas citocinas pró-inflamatórias, IL-6, IL-12 e IL-13, e a citocina anti-inflamatória e imunossupressora IL-10 tiveram sua liberação aumentada nas células infectadas. De forma contrária, apenas o fator de crescimento FGF básico apresentou diminuição de liberação (Fig. 16).

O dado mais significativo de liberação no sobrenadante foi da proteína quimioatraente de monócitos-1 (MCP-1), com uma expressão acima de 1000 pg/mL detectada em 4 horas pós-infecção e que se manteve com uma alta concentração em todos os tempos seguintes (Fig. 16), indicando que a replicação de OROV em células da glia e neurônios pode estimular a migração de leucócitos e contribuir no fenômeno de neuroinvasão por cavalo de troia.

Figura 16 - Análise Bioplex de várias citocinas e quimiocinas nos sobrenadantes de cultura de células ReN diferenciadas não infectadas (controle) e infectadas pelo OROV (0h, 4h, 12h e 24h pós-infecção) (A-B). As barras representam as médias de expressão de citocinas ou quimiocinas +/- erro padrão. Diferenças significativas pela análise de variância de dois fatores seguida pelo teste de Sidak são indicadas por * $p < 0.05$. Os dados são representados em Log₁₀ picogramas por mililitro (pg/mL).



Fonte: Autoria própria

DISCUSSÃO

O OROV é um dos mais importantes arbovírus emergentes na América do Sul, sendo responsável por grandes surtos de doença febril exantemática na região amazônica. Apesar da sua importância, ainda são poucos os estudos que investigam os fatores patogênicos associados à doença e ao acometimento neurológico em parte dos pacientes. Neste trabalho conseguimos demonstrar que a expressão do gene IRF-5 em células endoteliais é essencial para a entrada do OROV no SNC *in vivo*, destacando o IRF5 como uma importante molécula reguladora imunológica do hospedeiro durante a infecção por OROV. Nossos resultados correspondem a estudos anteriores, que demonstram que cerca de 40% dos animais nocautes de corpo inteiro para o gene IRF5 sucumbiam na segunda semana pós infecção, na mesma janela de infecção dos animais nocautes condicionais que não expressam IRF5 nas células endoteliais utilizados no nosso estudo, apresentando inclusive sinais neurológicos similares aos encontrados anteriormente (Proenca-Modena et al., 2016). Porém o mecanismo e os tipos celulares associados a esse controle da entrada do OROV no SNC por IRF-5 ainda não haviam sido elucidados.

O acúmulo de células na região perivascular de animais nocautes condicionais que apresentavam sinais de acometimento neurológico pode ser um indicativo de inflamação que ocorre com o aumento de células imunes aderidas as células da microvasculatura cerebral, apesar de não ser possível distinguir os tipos celulares pela técnica utilizada. Outro sinal de que a resposta imune está sendo ativada no cérebro dos animais com manifestações neurológicas durante a infecção é a ativação de células da microglia. Quando ativadas as células da microglia apresentam mudança de morfologia e função, passando a ter função fagocitária. Esse processo ocorre em resposta a lesões no tecido cerebral, infecções ou inflamação, sendo parte fundamental da resposta imune no SNC (Dheen et al., 2007).

Os dados observados aqui indicam que o mecanismo de neuroinvasão de OROV em camundongos pode ser em parte mediado por um mecanismo conhecido como “Cavalo de Tróia”, onde leucócitos periféricos infectados transportam o vírus para o SNC. Os dados obtidos pela transferência de células infectadas *in vitro* para os animais nocautes condicionais levantam a hipótese de que a deleção de IRF-5 nas células endoteliais pode facilitar a entrada de OROV no SNC por linfócitos circulantes infectados. Outro fator importante foi o aumento do número de células imunes circulantes e aderidas na microvasculatura cerebral dos camundongos que apresentavam sinais de acometimento neurológico no ensaio de microscopia intravital.

Outro fator importante que deve ser considerado é a via de infecção. Quando realizada a infecção viral na pata do animal ocorre uma replicação inicial no sítio de inoculação antes de atingir a corrente sanguínea, e assim podemos promover a infecção de tipos celulares presentes na região, como é o caso das células de Langerhan, células dendríticas que atuam na apresentação de antígenos e ativação da resposta de linfócitos T, que são encontradas na epiderme. Essas células quando ativadas podem fazer a apresentação dos antígenos nos linfonodos locais dando início a resposta imune (Johnson et al., 2012). De fato já foi demonstrado na literatura que o primeiro sítio de replicação de alguns arbovírus, como a DENV e WNV, após a picada pelo mosquito são as células de Langerham (Ida et al., 2009; Johnson et al., 2012).

Além disso, dados do presente estudo mostram um aumento da expressão de fatores de adesão endoteliais essenciais para a transmigração de leucócitos em células endoteliais humanas e murinas, como ICAM, VCAM, e-selectina e p-selectina. A expressão desses fatores de adesão endoteliais são eventos-chave durante a neuroinvasão por mecanismo de “cavalo de tróia” na infecção por diferentes vírus. Um exemplo é a replicação do Vírus da Encefalite Japonesa (JEV) nas células endoteliais, que embora não apresente ruptura da barreira no primeiro momento, a infecção promove a expressão de moléculas de adesão endotelial e quimiocinas que resulta na infiltração de leucócitos *in vivo* dando início a infecção no SNC (Zou et al., 2021).

Os achados do nosso estudo corroboram com estudos prévios que demonstram que o gene IRF-5 desempenha papel importante na resposta imune contra outros vírus. Estudos sobre o papel antiviral do IRF-5 na infecção pelo vírus do Nilo Ocidental (WNV) demonstram que o IRF-5 age na via de ativação de MAVS e trabalha com outros fatores de transcrição, como IRF-3 e IRF-7, para controlar a resposta de IFN-I das células dendríticas após a infecção pelo vírus. A deficiência de IRF-5 faz com que as citocinas inflamatórias e células imunes ativadas nos tecidos linfóides diminuam durante a infecção (Chow et al., 2019). Em outro estudo em que foi utilizado vírus da influenza A (IAV) a deficiência de IRF5 em modelo animal resultou em uma diminuição da produção de células mieloides e, portanto, uma diminuição da produção de citocinas inflamatórias. No entanto, isso acontece sem prejudicar a produção de IFN-I ou a replicação viral. Foi utilizado também um modelo de células-tronco pluripotentes induzidas humanas (hiPSCs) com mutações nos alelos do IRF-5 para estudar o papel do gene em células humanas. Os resultados indicaram que a deficiência de IRF-5 em DCs humanas também leva à redução da produção de citocinas pró inflamatórias durante a infecção com o IAV (Forbester et

al., 2020). Esses resultados na infecção por diferentes vírus mostram a importância do gene IRF-5 na liberação de citocinas e na regulação da atividade de células imunes.

A expressão de IRF-5 em células endoteliais da veia umbilical humana (HUVECs) também foi relacionado com o aumento da expressão da molécula de adesão endotelial VCAM-1 na lesão de isquemia-reperfusão, acelerando a adesão de leucócitos as células endoteliais (Cai et al., 2017). Também já foi relatado o aumento da expressão de matriz metaloproteinase-3 (MMP-3) induzida por TNF- α em uma via dependente de IRF-5 em condroblastos. As MMPs pertencem a uma classe de enzimas responsáveis pela degradação dos componentes da matriz extracelular, que têm papel importante na manutenção da BHE (Guo et al., 2018).

Em nosso estudo o IRF-5 se mostra como protagonista não apenas no contexto das células imunes, mas também em células endoteliais. Nossos resultados apontam para um novo mecanismo de regulação da entrada de leucócitos no SNC de forma dependente da expressão de IRF-5, que pode ocorrer devido à expressão de fatores de adesão endoteliais ou liberação de citocinas e quimiocinas. No entanto, ainda é necessário uma investigação mais profunda para compreender o exato mecanismo de ação do IRF-5 nas células endoteliais.

Também demonstramos que a capacidade do OROV de infectar células endoteliais pode ser um evento patogênico chave, afinal camundongos adultos são naturalmente resistentes, enquanto seres humanos são vulneráveis ao desenvolvimento de doenças após infecção por esse vírus. E de fato conseguimos observar que o OROV infecta de forma produtiva células endoteliais humanas *in vitro*, enquanto nas células murinas, apesar de estabelecer uma infecção e se manter na célula por longos períodos, ela não leva a liberação de grande quantidade de vírus viável. Esse fato sugere que o OROV pode possuir algum mecanismo mais eficiente de antagonizar a resposta antiviral em células endoteliais humanas do que em células endoteliais murinas. Estudos mostram que as células endoteliais da microvasculatura humanas são infectadas por diversos arbovírus causadores de doença encefalítica, como o vírus do Oeste do Nilo (WNV) (Wang et al., 2008), vírus Zika (ZIKV) (Papa et al., 2017) e vírus da Dengue (DENV) (da Conceição et al., 2013), sendo que a replicação viral neste tipo celular pode ou não induzir efeito citopático e tem papel importante na passagem dos vírus através da barreira endotelial.

O aumento da expressão de IRF-5 nas células murinas, sendo o único dos genes das vias de sinalização moduladas de forma significativa neste tipo celular, corrobora com os resultados obtidos em modelo animal, em que uma parcela dos camundongos nocautes para o gene IRF5 sucumbem ao vírus, enquanto animais do tipo selvagem não desenvolvem a doença (Proença-

Modena et al., 2016). Já nas células endoteliais humanas, a ausência de indução de IRF-5 após infecção por OROV pode refletir algum mecanismo de antagonismo viral ou a existência de mecanismos de ativação pós-transcricional. Desse modo, os dados indicam que a infecção por OROV em células endoteliais murinas leva ao aumento de expressão de fatores importantes na resposta imune inata, em especial IRF-5, o que pode explicar a sua menor infecção pelo vírus, enquanto as células humanas não conseguem combater a infecção com a mesma eficácia.

Apesar de não encontrarmos modulação de junções oclusivas, assim como a manutenção da integridade da barreira endotelial observada nos experimentos de ECIS e modelos de transwell nos tempos iniciais da infecção viral, associado com o fato de detectarmos o OROV na câmara inferior dos modelos de transwell, indica que o vírus pode utilizar vias alternativas que permitam sua passagem pela barreira composta pelas células endoteliais. Assim, especulamos que OROV possa atravessar a BHE inicialmente por mecanismos como transcitose ou liberação basolateral através das células endoteliais.

Esse mecanismo já foi demonstrado para vírus como Vírus da Encefalite Equina Venezuelana (VEEV) e Vírus da Encefalite Equina do Oeste (WEEV), em que a entrada no SNC pela via hematogênica *in vivo* ocorre por transcitose mediada por caveolina-1 (Cav-1) sem causar danos a integridade da barreira hematoencefálica, mesmo sem estabelecer replicação nas células endoteliais (Salimi et al., 2020). Em outro caso o modelo de infecção com a cepa neurovirulenta de Vírus do Oeste do Nilo (WNV) *in vitro* também foi demonstrado que a passagem do vírus pela barreira endotelial ocorre sem a ruptura da sua integridade, enquanto a replicação do vírus na célula levou ao aumento das moléculas de adesão endoteliais VCAM e e-selectina (Verma et al., 2009). Por outro lado, foi identificado que a infecção de astrócitos foi o fator responsável pela expressão de fatores que levaram a diminuição da expressão junções oclusivas e aumento da permeabilidade da barreira neste modelo, mostrando que existe uma interação complexa entre os outros tipos celulares que compõem a BHE que podem afetar a quebra da barreira (Verma et al., 2010).

Apesar disso, não conseguimos estabelecer uma relação entre o silenciamento de IRF-5 nas culturas celulares endoteliais *in vitro* com efeitos sobre a replicação viral ou modulação da integridade da barreira. Esse resultado indica que o papel do IRF-5 no controle da neuroinvasão pelo OROV nas células endoteliais provavelmente não se dá através do controle da replicação do vírus nessas células, levantando a hipótese de que possam existir outros mecanismos relacionados. Já foi demonstrado que o gene IRF-5 de humanos pode ser comparado com o

encontrado nas células de camundongos por compartilharem semelhanças funcionais e estruturais. Em ambos os casos o IRF-5 atua na ativação de genes das mesmas vias da resposta imune inata após ativação em resposta a estímulos gerados pelo reconhecimento de PAMPs por receptores citoplasmáticos como RIG-I e MDA5 ou associados a membranas como os TLRs (Takaoka et al., 2005).

Como destacado anteriormente, a formação complexa entre os diversos tipos celulares que compõem a BHE, assim como todos os fatores que atuam na manutenção da sua integridade e na resposta imunológica não são passíveis de serem reproduzidos de forma integral nos modelos *in vitro* utilizados. Além das BMECs, que o componente estrutural primário da BHE, também temos os periócitos que atuam na regulação da angiogênese e integridade vascular, as células da microglia que liberam citocinas e matrix metalloproteinases (MMPs) em resposta a estímulos de patógenos e as extensões do corpo de astrócitos que liberam fatores solúveis que promovem a integridade da BHE pela modulação das junções oclusivas (Abbott et al., 2010). Além disso, citocinas e mediadores inflamatórios secretados pelas células de suporte podem modular a integridade da BHE. Entre esses fatores que atuam na quebra da barreira, podemos destacar as citocinas (TNF- α , IL-6 e IL-1 β) e quimiocinas (CCL2 e CXCL12) pró-inflamatórias (Yang et al., 2022), a diminuição da expressão de junções oclusivas e a degradação dessas junções mediada pelas MMPs (Rempe et al., 2016). Dessa forma são necessários mais estudos que compreendam a complexidade e dinâmica dos mecanismos de passagem do OROV pela BHE, principalmente se tratando de modelos humanos.

É importante salientar que, assim como no nosso estudo, a maioria dos trabalhos realizados sobre a neuroinvasão de arbovírus utilizam modelos experimentais de camundongos ou de células endoteliais *in vitro*. Na maioria dos casos, camundongos selvagens adultos não desenvolvem manifestações neurológicas por infecção sistêmica, a não ser nos estudos realizados com modelos de camundongos imunodeficientes. Esse fator é importante para entender o papel de vias específicas da resposta imune, mas nem sempre é reprodutível com o que ocorre na infecção nos seres humanos. No caso do OROV, a maioria dos casos de doença neurológica reportados em humanos ocorreram em indivíduos que tinham algum nível de imunossupressão causada por doenças adjacentes ou outras infecções virais.

Nos experimentos realizados com a cultura de células gliais e neurônios diferenciados de células progenitoras do SNC observamos que não apenas as células estão sendo infectadas pelo OROV, mas também estão respondendo à infecção por meio da liberação de citocinas,

quimiocinas e modulação de diversos processos celulares. No ensaio de bio-plex observamos um aumento da liberação de interleucinas pró-inflamatórias, como IL-6, IL-12 e IL-13, e da citocina anti-inflamatória e imunossupressora, IL-10. Também notamos uma diminuição no FGF basic, um fator de crescimento que regula funções celulares como proliferação e diferenciação (Yun et al., 2010). Observamos também um aumento de fatores de crescimento como o PDGF-BB, fator de crescimento derivado de plaquetas essencial para recrutamento de periócitos do sistema nervoso central (Gaengel et al., 2009), GM-CSF, fator de crescimento que leva a estimulação de colônias de granulócitos e macrófagos (Shi et al., 2006), e VEGF, fator de crescimento endotelial vascular, responsável por induzir proliferação e diferenciação em células endoteliais, contribuindo para a angiogênese (Apte et al., 2019). Além disso, o aumento mais significativo foi encontrado em MCP-1, proteína quimioatratante de monócitos-1, que desempenha um papel essencial na infiltração e migração de monócitos e macrófagos através do endotélio vascular (Deshmane et al., 2009).

Informações importantes sobre as respostas do hospedeiro à infecção pelo OROV também foram fornecidas pelos genes super regulados na análise de RNA-seq. Entre eles GADD45B, que é extensivamente expresso no sistema nervoso e desempenha um papel crítico na desmetilação do DNA, neuroplasticidade e neuroproteção (Shen et al., 2022), bem como CCN1, que é conhecido por promover a adesão de células endoteliais e formação da matriz extracelular (Du et al., 2018), e pode ser importante no processo de neuroinvasão do vírus. Outros genes super regulados incluem NR4A1, que atua como um fator de transcrição nuclear (Yu et al., 2023) e NFATC2, que regula a progressão do ciclo celular durante a ativação de linfócitos (Caetano et al., 2002). Além disso, temos a regulação de genes como RPAP2, que atua na expressão de genes de RNA nuclear (Wani et al., 2014), e PABPC1L, que se liga às caudas poliA dos RNAs mensageiros para regular a estabilidade e a tradução do mRNA (Ozturk et al., 2016). CXCR4 e BMP6, que codificam o receptor de quimiocina CXC e um ligante secretado do TGF-beta, respectivamente (Liu et al., 2023; Wang et al., 2021), regulando uma série de processos como a resposta imune e homeostase do ferro, também foram super regulados. O gene CXCR4 também é um receptor conhecido pelo seu papel na infecção de células imunes, como no caso da infecção pelo HIV em que o CXCR4 atua como correceptor facilitando a entrada do vírus nas células CD4⁺ (Loetscher et al., 1998).

Examinando os papéis dos genes que tiveram uma diminuição da sua expressão, eles também refletem uma variedade de processos biológicos que podem ser inibidos no curso da infecção. Genes como PFKFB3 e GMPR, por exemplo, que estão envolvidos no metabolismo

celular e na geração de energia, podem sinalizar uma desaceleração ou reprogramação metabólica nas células infectadas para preservar os recursos energéticos (Bairagya et al., 2022; Zhang et al., 2022). Da mesma forma, um possível efeito da infecção viral na atividade neuronal, plasticidade sináptica e desenvolvimento neuronal é sugerido pela regulação de genes ligados à função sináptica e ao desenvolvimento neural, como ARC (Korb and Finkbeiner, 2011), STAC2 (Legha et al., 2010), SLC6A11 (Salcedo et al., 2021) e SPRY2 (Karhausen et al., 2018). Além disso, APLNR está associado à proliferação de células endoteliais envolvidas em processos de angiogênese (Şişli et al., 2022). Mudanças na homeostase celular e na integridade da membrana provocadas pela invasão viral podem ser refletidas na inibição de genes relacionados ao transporte de íons e à dinâmica da membrana, como SLC6A11 (Salcedo et al., 2021).

Assim como no nosso estudo, foi mostrado que em astrócitos humanos a infecção por OROV também leva a modulação de vias relacionadas a replicação do DNA celular, ciclo celular, remodelação da matriz extracelular, vias de ativação de IFN-I, canais iônicos e sinapses. Sendo fatores importantes que podem afetar a neuropatogênese (Geddes et al., 2021).

Essas descobertas podem ter implicações importantes no desenvolvimento de intervenções terapêuticas, tendo como alvo o IRF-5, para mitigar complicações relacionadas ao SNC associadas a infecções virais.

CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos podemos concluir que:

- A expressão de IRF-5 em células endoteliais é um evento chave para impedir o acesso de OROV ao sistema nervoso central, já que a ausência deste fator de transcrição no endotélio de camundongos nocautes condicionais leva a um quadro de acometimento neurológico em animais normalmente resistentes à infecção por esse vírus.
- O quadro de acometimento neurológico neste modelo animal está associado com uma alta carga viral no SNC, acúmulo perivascular de células, ativação de microglia e aumento do número e da adesão de células imunes circulantes nos microvasos sanguíneos cerebrais.
- Células imunes circulantes infectadas com OROV têm a capacidade de causar doença neurológica em camundongos nocautes para IRF-5 em células endoteliais. Levantando a hipótese de que a neuroinvasão por OROV em modelo animal possa ocorrer um mecanismo de “cavalo de tróia”.
- OROV é capaz de infectar e se replicar de forma produtiva e com a capacidade de gerar efeito citopático em células endoteliais humanas. Apesar de infectar também células endoteliais murinas, o vírus se mantém na célula sem gerar uma infecção produtiva.
- Células endoteliais de camundongos restringem a replicação de OROV possivelmente pela formação de uma resposta inata efetiva, com aumento na produção de receptores de reconhecimento padrão (TLR7), de interferon do tipo I (IFN- β), de genes induzidos por IFN (OAS1L e MX-1) e de IRF5, o fator de transcrição analisado neste estudo.
- A infecção por OROV em células endoteliais *in vitro* aumenta a expressão dos fatores de adesão endotelial (e-selectina, p-selectina, ICAM-1 e VCAM-1) e também *in vivo* com o aumento da marcação para p-selectina, indicando que a adesão e transmigração de leucócitos pode estar associada com a neuroinvasão por esse vírus.
- A infecção por OROV não interfere na integridade das junções oclusivas endoteliais, mesmo na ausência de IRF-5, embora o vírus seja capaz de cruzar a barreira endotelial em experimentos de “*transwell*”. Assim, os dados indicam que OROV pode cruzar essa barreira por mecanismos dependentes da infecção viral, como transcitose ou liberação basolateral através de células endoteliais infectadas.

- Em células neuronais e da glia diferenciadas de células progenitoras humanas do SNC, a infecção por OROV ocorre de forma produtiva e leva a modulação de quimiocinas e citocinas associadas a angiogênese e recrutamento de leucócitos, assim como a modulação de diversas vias celulares que indicam intensa resposta celular frente a infecção viral.

REFERÊNCIAS

- Abbott, N.J., Patabendige, A.A.K., Dolman, D.E.M., Yusof, S.R., Begley, D.J., 2010. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol. Dis.* 37, 13–25. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2009.07.030>
- Acrani, G.O., Gomes, R., Proença-Módena, J.L., da Silva, A.F., Carminati, P.O., Silva, M.L., Santos, R.I.M.,
- Arruda, E., 2010. Apoptosis induced by Oropouche virus infection in HeLa cells is dependent on virus protein expression. *Virus Res.* 149, 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2009.12.013>
- Acrani, G.O., Tilston-Lunel, N.L., Spiegel, M., Weidmann, M., Dilcher, M., Andrade da Silva, D.E., Nunes, M.R.T., Elliott, R.M., 2015. Establishment of a minigenome system for Oropouche virus reveals the S genome segment to be significantly longer than reported previously. *J. Gen. Virol.* 96, 513–523. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000005>
- Aguilar, P.V., Barrett, A.D., Saeed, M.F., Watts, D.M., Russell, K., Guevara, C., Ampuero, J.S., Suarez, L., Cespedes, M., Montgomery, J.M., Halsey, E.S., Kochel, T.J., 2011. Iquitos virus: a novel reassortant Orthobunyavirus associated with human illness in Peru. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5, e1315. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001315>
- Almeida, G.M., Souza, J.P., Mendes, N.D., Pontelli, M.C., Pinheiro, N.R., Nogueira, G.O., Cardoso, R.S., Paiva, I.M., Ferrari, G.D., Veras, F.P., Cunha, F.Q., Horta-Junior, J.A.C., Alberici, L.C., Cunha, T.M., Podolsky-Gondim, G.G., Neder, L., Arruda, E., Sebollela, A., 2021. Neural Infection by Oropouche Virus in Adult Human Brain Slices Induces an Inflammatory and Toxic Response. *Front. Neurosci.* 15, 674576. <https://doi.org/10.3389/fnins.2021.674576>
- Anderson, C.R., Spence, L., Downs, W.G., Aitken, T.H., 1961. Oropouche virus: a new human disease agent from Trinidad, West Indies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 10, 574–578. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1961.10.574>
- Apte, R.S., Chen, D.S., Ferrara, N., 2019. VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development. *Cell* 176, 1248–1264. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.021>
- Azevedo, R.S. da S., Nunes, M.R.T., Chiang, J.O., Bensabath, G., Vasconcelos, H.B., Pinto, A.Y. das N., Martins, L.C., Monteiro, H.A. de O., Rodrigues, S.G., Vasconcelos, P.F. da C., 2007. Reemergence of Oropouche fever, northern Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 13, 912–915. <https://doi.org/10.3201/eid1306.061114>
- Bai, F., Kong, K.-F., Dai, J., Qian, F., Zhang, L., Brown, C.R., Fikrig, E., Montgomery, R.R., 2010. A Paradoxical Role for Neutrophils in the Pathogenesis of West Nile Virus. *J. Infect. Dis.* 202, 1804–1812. <https://doi.org/10.1086/657416>
- Bairagya, H.R., Tasneem, A., Rai, G.P., Reyaz, S., 2022. New biochemical insights into the dynamics of water molecules at the GMP or IMP binding site of human GMPR enzyme: A molecular dynamics study. *Proteins* 90, 200–217. <https://doi.org/10.1002/prot.26207>
- Baisley, K.J., Watts, D.M., Munstermann, L.E., Wilson, M.L., 1998. Epidemiology of endemic Oropouche virus transmission in upper Amazonian Peru. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 59, 710–716. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1998.59.710>
- Bastos, M. de S., Figueiredo, L.T.M., Naveca, F.G., Monte, R.L., Lessa, N., Pinto de Figueiredo, R.M., Gimaque, J.B. de L., Pivoto João, G., Ramasawmy, R., Mourão, M.P.G., 2012. Identification of Oropouche Orthobunyavirus in the cerebrospinal fluid of three patients in the Amazonas, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 86, 732–735. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0485>
- Bastos, M.F., Kayano, A.C.A.V., Silva-Filho, J.L., Dos-Santos, J.C.K., Judice, C., Blanco, Y.C., Shryock, N., Sercundes, M.K., Ortolan, L.S., Francelin, C., Leite, J.A., Oliveira, R., Elias, R.M., Câmara, N.O.S., Lopes, S.C.P., Albrecht, L., Farias, A.S., Vicente, C.P., Werneck, C.C., Giorgio, S., Verinaud, L., Epiphany, S., Marinho, C.R.F., Lalwani, P., Amino, R., Aliberti, J., Costa, F.T.M., 2018. Inhibition of

hypoxia-associated response and kynurenine production in response to hyperbaric oxygen as mechanisms involved in protection against experimental cerebral malaria. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 32, 4470–4481. <https://doi.org/10.1096/fj.201700844R>

Brasil, Ministério da Saúde. Informe Semanal das Arboviroses Nº 21. 03 de julho de 2024. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/ptbr/assuntos/saude-de-a-az/a/arboviroses/informe-semanal/ninformesemanal-no-21.pdf/view>. Acesso em 29/07/2024.

Caetano, M.S., Vieira-de-Abreu, A., Teixeira, L.K., Werneck, M.B.F., Barcinski, M.A., Viola, J.P.B., 2002. NFATC2 transcription factor regulates cell cycle progression during lymphocyte activation: evidence of its involvement in the control of cyclin gene expression. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 16, 1940–1942. <https://doi.org/10.1096/fj.02-0282fje>

Cai, H., Yao, Z., Li, W., 2017. IRF-5 accelerates leukocyte adhesion to endothelial cells in ischemia-reperfusion injury through regulating the transcription of VCAM-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 492, 192–198. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.08.044>

Ceccaldi, P.E., Gillet, J.P., Tsiang, H., 1989. Inhibition of the transport of rabies virus in the central nervous system. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 48, 620–630. <https://doi.org/10.1097/00005072-198911000-00004>

Cevik, O., Li, D., Baljinnnyam, E., Manvar, D., Pimenta, E.M., Waris, G., Barnes, B.J., Kaushik-Basu, N., 2017. Interferon regulatory factor 5 (IRF5) suppresses hepatitis C virus (HCV) replication and HCV-associated hepatocellular carcinoma. *J. Biol. Chem.* 292, 21676–21689. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.792721>

Chang, C.-Y., Li, J.-R., Chen, W.-Y., Ou, Y.-C., Lai, C.-Y., Hu, Y.-H., Wu, C.-C., Chang, C.-J., Chen, C.-J., 2015. Disruption of in vitro endothelial barrier integrity by Japanese encephalitis virus-Infected astrocytes. *Glia* 63, 1915–1932. <https://doi.org/10.1002/glia.22857>

Chow, K.T., Driscoll, C., Loo, Y.-M., Knoll, M., Gale, M., 2019. IRF5 regulates unique subset of genes in dendritic cells during West Nile virus infection. *J. Leukoc. Biol.* 105, 411–425. <https://doi.org/10.1002/JLB.MA0318-136RRR>

Ciuderis, K.A., Berg, M.G., Perez, L.J., Hadji, A., Perez-Restrepo, L.S., Aristizabal, L.C., Forberg, K., Yamaguchi, J., Cardona, A., Weiss, S., Qiu, X., Hernandez-Ortiz, J.P., Averhoff, F., Cloherty, G.A., Osorio, J.E., 2022. Oropouche virus as an emerging cause of acute febrile illness in Colombia. *Emerg. Microbes Infect.* 11, 2645–2657. <https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2136536>

da Conceição, T.M., Rust, N.M., Berbel, A.C.E.R., Martins, N.B., do Nascimento Santos, C.A., Da Poian, A.T., de Arruda, L.B., 2013. Essential role of RIG-I in the activation of endothelial cells by dengue virus. *Virology* 435, 281–292. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.09.038>

da Costa, V.G., de Rezende Féres, V.C., Saivish, M.V., de Lima Gimaque, J.B., Moreli, M.L., 2017. Silent emergence of Mayaro and Oropouche viruses in humans in Central Brazil. *Int. J. Infect. Dis. IJID Off. Publ. Int. Soc. Infect. Dis.* 62, 84–85. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2017.07.016>

de Mendonça, S.F., Rocha, M.N., Ferreira, F.V., Leite, T.H.J.F., Amadou, S.C.G., Sucupira, P.H.F., Marques, J.T., Ferreira, A.G.A., Moreira, L.A., 2021. Evaluation of *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and *Culex quinquefasciatus* Mosquitoes Competence to Oropouche virus Infection. *Viruses* 13, 755. <https://doi.org/10.3390/v13050755>

de Oliveira, E., Azevedo, R. do S.S., Coelho-Dos-Reis, J.G., Antonelli, L.R. do V., Ferreira, M.S., Campi-Azevedo, A.C., Costa-Silva, M.F., Martins, L.C., Chiang, J.O., Teixeira-Carvalho, A., Martins-Filho, O.A., Vasconcelos, P.F.C., 2019. IFN- α as a time-sensitive biomarker during Oropouche virus infection in early and late seroconverters. *Sci. Rep.* 9, 17924. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54223-w>

de Souza Luna, L.K., Rodrigues, A.H., Santos, R.I.M., Sesti-Costa, R., Criado, M.F., Martins, R.B., Silva, M.L., Delcaro, L.S., Proença-Modena, J.L., Figueiredo, L.T.M., Acrani, G.O., Arruda, E., 2017. Oropouche virus is detected in peripheral blood leukocytes from patients. *J. Med. Virol.* 89, 1108–1111. <https://doi.org/10.1002/jmv.24722>

de Souza, W.M., Weaver, S.C., 2024. Effects of climate change and human activities on vector-borne diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41579-024-01026-0>

Deshmane, S.L., Kremlev, S., Amini, S., Sawaya, B.E., 2009. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *J. Interferon Cytokine Res.* 29, 313–326. <https://doi.org/10.1089/jir.2008.0027>

Dheen, S.T., Kaur, C., Ling, E.-A., 2007. Microglial activation and its implications in the brain diseases. *Curr. Med. Chem.* 14, 1189–1197. <https://doi.org/10.2174/092986707780597961>

Du, H., Zhou, Y., Suo, Y., Liang, X., Chai, B., Duan, R., Huang, X., Li, Q., 2018. CCN1 accelerates re-epithelialization by promoting keratinocyte migration and proliferation during cutaneous wound healing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 505, 966–972. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.09.001>

Duffau, P., Menn-Josephy, H., Cuda, C.M., Dominguez, S., Aprahamian, T.R., Watkins, A.A., Yasuda, K., Monach, P., Lafyatis, R., Rice, L.M., Kenneth Haines, G., Gravallesse, E.M., Baum, R., Richez, C., Perlman, H., Bonegio, R.G., Rifkin, I.R., 2015. Promotion of Inflammatory Arthritis by Interferon Regulatory Factor 5 in a Mouse Model. *Arthritis Rheumatol.* Hoboken NJ 67, 3146–3157. <https://doi.org/10.1002/art.39321>

Emergence of a novel reassortant Oropouche virus drives persistent outbreaks in the Brazilian Amazon region from 2022 to 2024 [WWW Document], 2024. . *Virological*. URL <https://virological.org/t/emergence-of-a-novel-reassortant-oropouche-virus-drives-persistent-outbreaks-in-the-brazilian-amazon-region-from-2022-to-2024/955> (accessed 4.14.24).

Epidemiological Update - Oropouche in the Region of the Americas - 6 March 2024 - PAHO/WHO | Pan American Health Organization [WWW Document], 2024. URL <https://www.paho.org/en/documents/epidemiological-update-oropouche-region-americas-6-march-2024> (accessed 4.14.24).

Fabié, A., Mai, L.T., Dagenais-Lussier, X., Hammami, A., van Grevenynghe, J., Stäger, S., 2018. IRF-5 Promotes Cell Death in CD4 T Cells during Chronic Infection. *Cell Rep.* 24, 1163–1175. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.06.107>

Forbester, J.L., Clement, M., Wellington, D., Yeung, A., Dimonte, S., Marsden, M., Chapman, L., Coomber, E.L., Tolley, C., Lees, E., Hale, C., Clare, S., Udalova, I., Dong, T., Dougan, G., Humphreys, I.R., 2020. IRF5 Promotes Influenza Virus-Induced Inflammatory Responses in Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Myeloid Cells and Murine Models. *J. Virol.* 94, e00121-20. <https://doi.org/10.1128/JVI.00121-20>

Forshey, B.M., Guevara, C., Laguna-Torres, V.A., Cespedes, M., Vargas, J., Gianella, A., Vallejo, E., Madrid, C., Aguayo, N., Gotuzzo, E., Suarez, V., Morales, A.M., Beingolea, L., Reyes, N., Perez, J., Negrete, M., Rocha, C., Morrison, A.C., Russell, K.L., Blair, P.J., Olson, J.G., Kochel, T.J., NMRCD Febrile Surveillance Working Group, 2010. Arboviral etiologies of acute febrile illnesses in Western South America, 2000-2007. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4, e787. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000787>

Gaengel, K., Genové, G., Armulik, A., Betsholtz, C., 2009. Endothelial-mural cell signaling in vascular development and angiogenesis. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 29, 630–638. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.161521>

Gaillet, M., Pichard, C., Restrepo, J., Lavergne, A., Perez, L., Enfissi, A., Abboud, P., Lambert, Y., Ma, L., Monot, M., Demar, M., Djossou, F., Servas, V., Nacher, M., Andrieu, A., Prudhomme, J., Michaud, C., Rousseau, C., Jeanne, I., Duchemin, J.-B., Epelboin, L., Rousset, D., 2021. Outbreak of Oropouche Virus in French Guiana. *Emerg. Infect. Dis.* 27, 2711–2714. <https://doi.org/10.3201/eid2710.204760>

Geddes, V.E.V., Brustolini, O.J.B., Cavalcante, L.T. de F., Moreira, F.R.R., de Castro, F.L., Guimarães, A.P. de C., Gerber, A.L., Figueiredo, C.M., Diniz, L.P., Neto, E. de A., Tanuri, A., Souza, R.P., Assunção-Miranda, I., Alves-Leon, S.V., Romão, L.F., de Souza, J.P.B.M., de Vasconcelos, A.T.R., de Aguiar, R.S., 2021. Common Dysregulation of Innate Immunity Pathways in Human Primary Astrocytes Infected With Chikungunya, Mayaro, Oropouche, and Zika Viruses. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 11, 641261. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.641261>

- Gómez-Camargo, D.E., Egurrola-Pedraza, J.A., Cruz, C.D., Popuche, D., Ochoa-Díaz, M.M., Guevara, C., Silva, M., Abente, E.J., Ampuero, J.S., 2021. Evidence of Oropouche Orthobunyavirus Infection, Colombia, 2017. *Emerg. Infect. Dis.* 27, 1756–1758. <https://doi.org/10.3201/eid2706.204405>
- Graham, R.R., Kozyrev, S.V., Baechler, E.C., Reddy, M.V.P.L., Plenge, R.M., Bauer, J.W., Ortmann, W.A., Koeth, T., González Escribano, M.F., Argentine and Spanish Collaborative Groups, Pons-Estel, B., Petri, M., Daly, M., Gregersen, P.K., Martín, J., Altshuler, D., Behrens, T.W., Alarcón-Riquelme, M.E., 2006. A common haplotype of interferon regulatory factor 5 (IRF5) regulates splicing and expression and is associated with increased risk of systemic lupus erythematosus. *Nat. Genet.* 38, 550–555. <https://doi.org/10.1038/ng1782>
- Guo, L., Hao, R., Tian, F., An, N., Wang, K., 2018. Interferon regulatory factor 5 (IRF5) regulates the expression of matrix metalloproteinase-3 (MMP-3) in human chondrocytes. *Int. Immunopharmacol.* 55, 231–236. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.11.035>
- Hu, G., Barnes, B.J., 2009. IRF-5 is a mediator of the death receptor-induced apoptotic signaling pathway. *J. Biol. Chem.* 284, 2767–2777. <https://doi.org/10.1074/jbc.M804744200>
- Hughes, H.R., Adkins, S., Alkhovskiy, S., Beer, M., Blair, C., Calisher, C.H., Drebot, M., Lambert, A.J., de Souza, W.M., Marklewitz, M., Nunes, M.R.T., Shí 石晓宏, X., Ictv Report Consortium, null, 2020. ICTV Virus Taxonomy Profile: Peribunyaviridae. *J. Gen. Virol.* 101, 1–2. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001365>
- Ida, T., Mandl, J.N., Kottlil, S., Sugiyama, M., Tsunetsugu-Yokota, Y., Kitchen, S.G., Zack, J.A., Klotman, M.E., 2009. Dengue Virus Infects Human Skin Langerhans Cells through Langerin for Dissemination to Dendritic Cells. *J. Exp. Med.* 206, 2947–2959. <https://doi.org/10.1084/jem.20090739>
- Izaguirre, A., Barnes, B.J., Amrute, S., Yeow, W.-S., Megjugorac, N., Dai, J., Feng, D., Chung, E., Pitha, P.M., Fitzgerald-Bocarsly, P., 2003. Comparative analysis of IRF and IFN- α expression in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* 74, 1125–1138. <https://doi.org/10.1189/jlb.0603255>
- Johnson, K.E., Chandra, S., Cronin, J.G., Peacock, T.P., Rollier, C.S., Skinner, M.A., Charleston, B., Caproni, L.J., 2012. Langerhans Cells Migrate to Local Lymph Nodes Following Cutaneous Infection with an Arbovirus. *J. Invest. Dermatol.* 132, 2010–2013. <https://doi.org/10.1038/jid.2012.96>
- Karhausen, J.A., Qi, W., Smeltz, A.M., Li, Y.-J., Shah, S.H., Kraus, W.E., Mathew, J.P., Podgoreanu, M.V., Kertai, M.D., 2018. Genome-wide association study links receptor tyrosine kinase inhibitor Sprouty2 to thrombocytopenia after coronary artery bypass surgery. *Thromb. Haemost.* 118, 1572–1585. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1667199>
- Korb, E., Finkbeiner, S., 2011. Arc in synaptic plasticity: from gene to behavior. *Trends Neurosci.* 34, 591–598. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2011.08.007>
- Krausgruber, T., Blazek, K., Smallie, T., Alzabin, S., Lockstone, H., Sahgal, N., Hussell, T., Feldmann, M., Udalova, I.A., 2011. IRF5 promotes inflammatory macrophage polarization and TH1-TH17 responses. *Nat. Immunol.* 12, 231–238. <https://doi.org/10.1038/ni.1990>
- Kristjansdottir, G., Sandling, J.K., Bonetti, A., Roos, I.M., Milani, L., Wang, C., Gustafsdottir, S.M., Sigurdsson, S., Lundmark, A., Tienari, P.J., Koivisto, K., Elovaara, I., Pirttilä, T., Reunanen, M., Peltonen, L., Saarela, J., Hillert, J., Olsson, T., Landegren, U., Alcina, A., Fernández, O., Leyva, L., Guerrero, M., Lucas, M., Izquierdo, G., Matesanz, F., Syvänen, A.-C., 2008. Interferon regulatory factor 5 (IRF5) gene variants are associated with multiple sclerosis in three distinct populations. *J. Med. Genet.* 45, 362–369. <https://doi.org/10.1136/jmg.2007.055012>
- Lazear, H.M., Lancaster, A., Wilkins, C., Suthar, M.S., Huang, A., Vick, S.C., Clepper, L., Thackray, L., Brassil, M.M., Virgin, H.W., Nikolich-Zugich, J., Moses, A.V., Gale, M., Früh, K., Diamond, M.S., 2013. IRF-3, IRF-5, and IRF-7 Coordinately Regulate the Type I IFN Response in Myeloid Dendritic Cells Downstream of MAVS Signaling. *PLoS Pathog.* 9, e1003118. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003118>

- Legha, W., Gaillard, S., Gascon, E., Malapert, P., Hocine, M., Alonso, S., Moqrich, A., 2010. *stac1* and *stac2* genes define discrete and distinct subsets of dorsal root ganglia neurons. *Gene Expr. Patterns GEP* 10, 368–375. <https://doi.org/10.1016/j.gep.2010.08.003>
- Lien, C., Fang, C.-M., Huso, D., Livak, F., Lu, R., Pitha, P.M., 2010. Critical role of IRF-5 in regulation of B-cell differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 4664–4668. <https://doi.org/10.1073/pnas.0911193107>
- Liu, S., Xie, S.M., Liu, W., Gagea, M., Hanker, A.B., Nguyen, N., Singareeka Raghavendra, A., Yang-Kolodji, G., Chu, F., Neelapu, S.S., Marchese, A., Hanash, S., Zimmermann, J., Arteaga, C.L., Tripathy, D., 2023. Targeting CXCR4 abrogates resistance to trastuzumab by blocking cell cycle progression and synergizes with docetaxel in breast cancer treatment. *Breast Cancer Res. BCR* 25, 62. <https://doi.org/10.1186/s13058-023-01665-w>
- Loetscher, M., Amara, A., Oberlin, E., Brass, N., Legler, D.F., Meese, E., Rousset, F., Melchers, F., Baggiolini, M., Moser, B., 1998. The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 6190–6195. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.11.6190>
- Lorenz, C., Chiaravalloti-Neto, F., 2024. Brazil reports an increased incidence of oropouche and mayaro fever in the amazon region. *Travel Med. Infect. Dis.* 58, 102692. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2024.102692>
- Martins-Filho, P.R., Soares-Neto, R.F., de Oliveira-Júnior, J.M., Alves dos Santos, C., 2024. The underdiagnosed threat of oropouche fever amidst dengue epidemics in Brazil. *Lancet Reg. Health - Am.* 32, 100718. <https://doi.org/10.1016/j.lana.2024.100718>
- Martins-Luna, J., Del Valle-Mendoza, J., Silva-Caso, W., Sandoval, I., Del Valle, L.J., Palomares-Reyes, C., Carrillo-Ng, H., Peña-Tuesta, I., Aguilar-Luis, M.A., 2020. Oropouche infection a neglected arbovirus in patients with acute febrile illness from the Peruvian coast. *BMC Res. Notes* 13, 67. <https://doi.org/10.1186/s13104-020-4937-1>
- McCarthy, M.K., Reynoso, G.V., Winkler, E.S., Mack, M., Diamond, M.S., Hickman, H.D., Morrison, T.E., 2020. MyD88-dependent influx of monocytes and neutrophils impairs lymph node B cell responses to chikungunya virus infection via Irf5, Nos2 and Nox2. *PLoS Pathog.* 16, e1008292. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008292>
- Messina, J.P., Brady, O.J., Golding, N., Kraemer, M.U.G., Wint, G.R.W., Ray, S.E., Pigott, D.M., Shearer, F.M., Johnson, K., Earl, L., Marczak, L.B., Shirude, S., Davis Weaver, N., Gilbert, M., Velayudhan, R., Jones, P., Jaenisch, T., Scott, T.W., Reiner, R.C., Hay, S.I., 2019. The current and future global distribution and population at risk of dengue. *Nat. Microbiol.* 4, 1508–1515. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0476-8>
- Miceli-Richard, C., Comets, E., Loiseau, P., Puechal, X., Hachulla, E., Mariette, X., 2007. Association of an IRF5 gene functional polymorphism with Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 56, 3989–3994. <https://doi.org/10.1002/art.23142>
- Miner, J.J., Diamond, M.S., 2016. Mechanisms of restriction of viral neuroinvasion at the blood-brain barrier. *Curr. Opin. Immunol.* 38, 18–23. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2015.10.008>
- Mourão, M.P.G., Bastos, M.S., Gimaqu, J.B.L., Mota, B.R., Souza, G.S., Grimmer, G.H.N., Galusso, E.S., Arruda, E., Figueiredo, L.T.M., 2009. Oropouche fever outbreak, Manaus, Brazil, 2007–2008. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 2063–2064. <https://doi.org/10.3201/eid1512.090917>
- Murphy, F.A., Harrison, A.K., Whitfield, S.G., 1973. Bunyaviridae: morphologic and morphogenetic similarities of Bunyamwera serologic supergroup viruses and several other arthropod-borne viruses. *Intervirology* 1, 297–316. <https://doi.org/10.1159/000148858>
- Navarro, J.-C., Giambalvo, D., Hernandez, R., Auguste, A.J., Tesh, R.B., Weaver, S.C., Montañez, H., Liria, J., Lima, A., Travassos da Rosa, J.F.S., da Silva, S.P., Vasconcelos, J.M., Oliveira, R., Vianez, J.L.S.G., Nunes, M.R.T., 2016. Isolation of Madre de Dios Virus (Orthobunyavirus; Bunyaviridae), an Oropouche Virus Species Reassortant, from a Monkey in Venezuela. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 95, 328–

338. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0679>

Nunes, M.R.T., Martins, L.C., Rodrigues, S.G., Chiang, J.O., Azevedo, R. do S. da S., Travassos da Rosa, A.P.A., Vasconcelos, P.F. da C., 2005. Oropouche Virus Isolation, Southeast Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 1610–1613. <https://doi.org/10.3201/eid1110.050464>

Ortiz, D.I., Piche-Ovares, M., Romero-Vega, L.M., Wagman, J., Troyo, A., 2021. The Impact of Deforestation, Urbanization, and Changing Land Use Patterns on the Ecology of Mosquito and Tick-Borne Diseases in Central America. *Insects* 13, 20. <https://doi.org/10.3390/insects13010020>

Ozturk, S., Sozen, B., Uysal, F., Bassorgun, I.C., Usta, M.F., Akkoyunlu, G., Demir, N., 2016. The poly(A)-binding protein genes, EPAB, PABPC1, and PABPC3 are differentially expressed in infertile men with non-obstructive azoospermia. *J. Assist. Reprod. Genet.* 33, 335–348. <https://doi.org/10.1007/s10815-016-0654-z>

Papa, M.P., Meuren, L.M., Coelho, S.V.A., Lucas, C.G. de O., Mustafá, Y.M., Lemos Matassoli, F., Silveira, P.P., Frost, P.S., Pezzuto, P., Ribeiro, M.R., Tanuri, A., Nogueira, M.L., Campanati, L., Bozza, M.T., Paula Neto, H.A., Pimentel-Coelho, P.M., Figueiredo, C.P., de Aguiar, R.S., de Arruda, L.B., 2017. Zika Virus Infects, Activates, and Crosses Brain Microvascular Endothelial Cells, without Barrier Disruption. *Front. Microbiol.* 8, 2557. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02557>

Parra Barrera, E.L., Reales-González, J., Salas, D., Reyes Santamaría, E., Bello, S., Rico, A., Pardo, L., Parra, E., Rodriguez, K., Alarcon, Z., Guerra Vega, A.P., Porras, M.A., Gomez-Rangel, S.Y., Duarte, C., Moreno, J., 2023. Fatal acute undifferentiated febrile illness among clinically suspected leptospirosis cases in Colombia, 2016–2019. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 17, e0011683. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011683>

Pinheiro, F., Travassos da Rosa, A., Vasconcelos, P., 1962. Oropouche fever. *Textb. Pediatr. Infect. Dis.* 2418–2423.

Pinheiro, F.P., Hoch, A.L., Gomes, M.L., Roberts, D.R., 1981a. Oropouche virus. IV. Laboratory transmission by *Culicoides paraensis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 30, 172–176.

Pinheiro, F.P., Rocha, A.G., Freitas, R.B., Ohana, B.A., Travassos da Rosa, A.P., Rogério, J.S., Linhares, A.C., 1982a. [Meningitis associated with Oropouche virus infections]. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 24, 246–251.

Pinheiro, F.P., Travassos da Rosa, A.P., Gomes, M.L., LeDuc, J.W., Hoch, A.L., 1982b. Transmission of Oropouche virus from man to hamster by the midge *Culicoides paraensis*. *Science* 215, 1251–1253. <https://doi.org/10.1126/science.6800036>

Pinheiro, F.P., Travassos da Rosa, A.P., Travassos da Rosa, J.F., Bensabath, G., 1976. An outbreak of Oropouche virus disease in the vicinity of santarem, para, barzil. *Tropenmed. Parasitol.* 27, 213–223.

Pinheiro, F.P., Travassos da Rosa, A.P., Travassos da Rosa, J.F., Ishak, R., Freitas, R.B., Gomes, M.L., LeDuc, J.W., Oliva, O.F., 1981b. Oropouche virus. I. A review of clinical, epidemiological, and ecological findings. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 30, 149–160.

Preston, J.E., Joan Abbott, N., Begley, D.J., 2014. Transcytosis of macromolecules at the blood-brain barrier. *Adv. Pharmacol. San Diego Calif* 71, 147–163. <https://doi.org/10.1016/bs.apha.2014.06.001>

Proenca-Modena, J.L., Hyde, J.L., Sesti-Costa, R., Lucas, T., Pinto, A.K., Richner, J.M., Gorman, M.J., Lazear, H.M., Diamond, M.S., 2016. Interferon-Regulatory Factor 5-Dependent Signaling Restricts Orthobunyavirus Dissemination to the Central Nervous System. *J. Virol.* 90, 189–205. <https://doi.org/10.1128/JVI.02276-15>

Proenca-Modena, J.L., Sesti-Costa, R., Pinto, A.K., Richner, J.M., Lazear, H.M., Lucas, T., Hyde, J.L., Diamond, M.S., 2015. Oropouche virus infection and pathogenesis are restricted by MAVS, IRF-3, IRF-7, and type I interferon signaling pathways in nonmyeloid cells. *J. Virol.* 89, 4720–4737. <https://doi.org/10.1128/JVI.00077-15>

Reiss, C.S., Plakhov, I.V., Komatsu, T., 1998. Viral replication in olfactory receptor neurons and entry

- into the olfactory bulb and brain. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 855, 751–761. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb10655.x>
- Rempe, R.G., Hartz, A.M.S., Bauer, B., 2016. Matrix metalloproteinases in the brain and blood-brain barrier: Versatile breakers and makers. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 36, 1481–1507. <https://doi.org/10.1177/0271678X16655551>
- Ribeiro Amorim, M., Cornejo Pontelli, M., Fabiano de Souza, G., Primon Muraro, S., de Toledo-Teixeira, D.A., Forato, J., Bispo-Dos-Santos, K., Barbosa, N.S., Cavalheiro Martini, M., Lorencini Parise, P., Vieira, A., Paier Milanez, G., Lambertini Pinto daSilva, L., Jaychand Lalwani, P., Santos Farias, A., Ramirez Vinolo, M.A., Sesti-Costa, R., Arruda, E., Proenca-Modena, J.L., 2020. Oropouche Virus Infects, Persists and Induces IFN Response in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells as Identified by RNA PrimeFlow™ and qRT-PCR Assays. *Viruses* 12, 785. <https://doi.org/10.3390/v12070785>
- Roberts, B.K., Collado, G., Barnes, B.J., 2024. Role of interferon regulatory factor 5 (IRF5) in tumor progression: Prognostic and therapeutic potential. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Cancer* 1879, 189061. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2023.189061>
- Rodrigues, A.H., Santos, R.I., Arisi, G.M., Bernardes, E.S., Silva, M.L., Rossi, M.A., Lopes, M.B.S., Arruda, E., 2011. Oropouche virus experimental infection in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). *Virus Res.* 155, 35–41. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2010.08.009>
- Romero-Alvarez, D., Escobar, L.E., 2018. Oropouche fever, an emergent disease from the Americas. *Microbes Infect.* 20, 135–146. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2017.11.013>
- Romero-Alvarez, D., Escobar, L.E., 2017. Vegetation loss and the 2016 Oropouche fever outbreak in Peru. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 112, 292–298. <https://doi.org/10.1590/0074-02760160415>
- Saeed, M.F., Wang, H., Nunes, M., Vasconcelos, P.F., Weaver, S.C., Shope, R.E., Watts, D.M., Tesh, R.B., Barrett, A.D., 2000. Nucleotide sequences and phylogeny of the nucleocapsid gene of Oropouche virus. *J. Gen. Virol.* 81, 743–748. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-3-743>
- Salcedo, C., Wagner, A., Andersen, J.V., Vinten, K.T., Waagepetersen, H.S., Schousboe, A., Freude, K.K., Aldana, B.I., 2021. Downregulation of GABA Transporter 3 (GAT3) is Associated with Deficient Oxidative GABA Metabolism in Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Astrocytes in Alzheimer’s Disease. *Neurochem. Res.* 46, 2676–2686. <https://doi.org/10.1007/s11064-021-03276-3>
- Salimi, H., Cain, M.D., Jiang, X., Roth, R.A., Beatty, W.L., Sun, C., Klimstra, W.B., Hou, J., Klein, R.S., 2020. Encephalitic Alphaviruses Exploit Caveola-Mediated Transcytosis at the Blood-Brain Barrier for Central Nervous System Entry. *mBio* 11, e02731-19. <https://doi.org/10.1128/mBio.02731-19>
- Santos, R.I., Almeida, M.F.P., Paula, F.E., Rodrigues, A.H., Saranzo, A.M., Paula, A.E., Silva, M.L., Correa, V.M.A., Acrani, G.O., Neder, L., Arruda, E., 2012. Experimental infection of suckling mice by subcutaneous inoculation with Oropouche virus. *Virus Res.* 170, 25–33. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2012.07.006>
- Santos, R.I., Bueno-Júnior, L.S., Ruggiero, R.N., Almeida, M.F., Silva, M.L., Paula, F.E., Correa, V.M.A., Arruda, E., 2014. Spread of Oropouche virus into the central nervous system in mouse. *Viruses* 6, 3827–3836. <https://doi.org/10.3390/v6103827>
- Santos, R.I.M., Rodrigues, A.H., Silva, M.L., Mortara, R.A., Rossi, M.A., Jamur, M.C., Oliver, C., Arruda, E., 2008. Oropouche virus entry into HeLa cells involves clathrin and requires endosomal acidification. *Virus Res.* 138, 139–143. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2008.08.016>
- Schwarz, M.M., Price, D.A., Ganaie, S.S., Feng, A., Mishra, N., Hoehl, R.M., Fatma, F., Stubbs, S.H., Whelan, S.P.J., Cui, X., Egawa, T., Leung, D.W., Amarasinghe, G.K., Hartman, A.L., 2022. Oropouche orthobunyavirus infection is mediated by the cellular host factor Lrp1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 119, e2204706119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2204706119>
- Schwerk, C., Tenenbaum, T., Kim, K.S., Schrotten, H., 2015. The choroid plexus—a multi-role player during infectious diseases of the CNS. *Front. Cell. Neurosci.* 9, 80. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00080>

- Sciancalepore, S., Schneider, M.C., Kim, J., Galan, D.I., Riviere-Cinnamond, A., 2022. Presence and Multi-Species Spatial Distribution of Oropouche Virus in Brazil within the One Health Framework. *Trop. Med. Infect. Dis.* 7, 111. <https://doi.org/10.3390/tropicalmed7060111>
- Shen, X., Shi, S., Li, H., Wang, C., Zhang, Y., Yu, H., Li, Y., Liu, B., 2022. The role of Gadd45b in neurologic and neuropsychiatric disorders: An overview. *Front. Mol. Neurosci.* 15. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.1021207>
- Shi, Y., Liu, C.H., Roberts, A.I., Das, J., Xu, G., Ren, G., Zhang, Y., Zhang, L., Yuan, Z.R., Tan, H.S.W., Das, G., Devadas, S., 2006. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and T-cell responses: what we do and don't know. *Cell Res.* 16, 126–133. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7310017>
- Silva, J.C. de O., Siqueira, I.R.F., Dornelas, L.F., Ribeiro, C.M., Gomes, J.P.B., Guadagnin, I.W., Pereira, A.R., Julião, G.R., Camargo, J. de S.A.A., Basano, S.A., Camargo, L.M.A., 2024. Occurrence of arbovirus infections in two riverine populations in the municipality of Humaitá, Amazonas, Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 57, e004032024. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0515-2023>
- Silva-Caso, W., Aguilar-Luis, M.A., Palomares-Reyes, C., Mazulis, F., Weilg, C., Del Valle, L.J., Espejo-Evaristo, J., Soto-Febres, F., Martins-Luna, J., Del Valle-Mendoza, J., 2019. First outbreak of Oropouche Fever reported in a non-endemic western region of the Peruvian Amazon: Molecular diagnosis and clinical characteristics. *Int. J. Infect. Dis. IJID Off. Publ. Int. Soc. Infect. Dis.* 83, 139–144. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2019.04.011>
- Silva-Ramos, C.R., Gil-Mora, J., Serna-Rivera, C.C., Martínez Díaz, H.-C., Restrepo-López, N., Agudelo-Flórez, P., Arboleda, M., Díaz, F.J., Faccini-Martínez, Á.A., Hidalgo, M., Melby, P.C., Aguilar, P.V., Cabada, M.M., Tobón-Castaño, A., Rodas, J.D., members of the GIDRN – Global Infectious Diseases Research Network, 2023. Etiological characterization of acute undifferentiated febrile illness in Apartadó and Villeta municipalities, Colombia, during COVID-19 pandemic. *Infez. Med.* 31, 517–532. <https://doi.org/10.53854/liim-3104-11>
- Şişli, H.B., Hayal, T.B., Şenkal, S., Kıratlı, B., Sağraç, D., Seçkin, S., Özpolat, M., Şahin, F., Yılmaz, B., Doğan, A., 2022. Apelin Receptor Signaling Protects GT1-7 GnRH Neurons Against Oxidative Stress In Vitro. *Cell. Mol. Neurobiol.* 42, 753–775. <https://doi.org/10.1007/s10571-020-00968-2>
- Smith, G.C., Francly, D.B., 1991. Laboratory studies of a Brazilian strain of *Aedes albopictus* as a potential vector of Mayaro and Oropouche viruses. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 7, 89–93.
- Takaoka, A., Yanai, H., Kondo, S., Duncan, G., Negishi, H., Mizutani, T., Kano, S.-I., Honda, K., Ohba, Y., Mak, T.W., Taniguchi, T., 2005. Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature* 434, 243–249. <https://doi.org/10.1038/nature03308>
- Takaoka, A., Yanai, H., Kondo, S., Duncan, G., Negishi, H., Mizutani, T., Kano, S., Honda, K., Ohba, Y., Mak, T.W., Taniguchi, T., 2005. Functional Characterization of Murine Interferon Regulatory Factor 5 (IRF-5) and Its Role in the Innate Antiviral Response. *J. Biol. Chem.* 280, 17559–17566. <https://doi.org/10.1074/jbc.M412415200>
- Tesh, R.B., 1994. The emerging epidemiology of Venezuelan hemorrhagic fever and Oropouche fever in tropical South America. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 740, 129–137. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1994.tb19863.x>
- Tilston-Lunel, N.L., Hughes, J., Acrani, G.O., da Silva, D.E.A., Azevedo, R.S.S., Rodrigues, S.G., Vasconcelos, P.F.C., Nunes, M.R.T., Elliott, R.M., 2015. Genetic analysis of members of the species Oropouche virus and identification of a novel M segment sequence. *J. Gen. Virol.* 96, 1636–1650. <https://doi.org/10.1099/vir.0.000108>
- Tiong, V., Shu, M.-H., Wong, W.F., AbuBakar, S., Chang, L.-Y., 2018. Nipah Virus Infection of Immature Dendritic Cells Increases Its Transendothelial Migration Across Human Brain Microvascular Endothelial Cells. *Front. Microbiol.* 9, 2747. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02747>
- Verma, S., Kumar, M., Gurjav, U., Lum, S., Nerurkar, V.R., 2010. Reversal of West Nile virus-induced blood-brain barrier disruption and tight junction proteins degradation by matrix metalloproteinases inhibitor. *Virology* 397, 130–138. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2009.10.036>

- Verma, S., Lo, Y., Chapagain, M., Lum, S., Kumar, M., Gurjav, U., Luo, H., Nakatsuka, A., Nerurkar, V.R., 2009. West Nile virus infection modulates human brain microvascular endothelial cells tight junction proteins and cell adhesion molecules: Transmigration across the in vitro blood-brain barrier. *Virology* 385, 425–433. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.11.047>
- Vernal, S., Martini, C.C.R., da Fonseca, B.A.L., 2019. Oropouche Virus-Associated Aseptic Meningoencephalitis, Southeastern Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 25, 380–382. <https://doi.org/10.3201/eid2502.181189>
- Wang, P., Dai, J., Bai, F., Kong, K.-F., Wong, S.J., Montgomery, R.R., Madri, J.A., Fikrig, E., 2008. Matrix metalloproteinase 9 facilitates West Nile virus entry into the brain. *J. Virol.* 82, 8978–8985. <https://doi.org/10.1128/JVI.00314-08>
- Wang, S., Chen, C., Yu, L., Mueller, J., Rausch, V., Mueller, S., 2021. Bone morphogenetic protein 6-mediated crosstalk between endothelial cells and hepatocytes recapitulates the iron-sensing pathway in vitro. *J. Biol. Chem.* 297, 101378. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.101378>
- Wani, S., Hirose, Y., Ohkuma, Y., 2014. Human RNA polymerase II-associated protein 2 (RPAP2) interacts directly with the RNA polymerase II subunit Rpb6 and participates in pre-mRNA 3'-end formation. *Drug Discov. Ther.* 8, 255–261. <https://doi.org/10.5582/ddt.2014.01044>
- Watts, D.M., Lavera, V., Callahan, J., Rossi, C., Oberste, M.S., Roehrig, J.T., Cropp, C.B., Karabatsos, N., Smith, J.F., Gubler, D.J., Wooster, M.T., Nelson, W.M., Hayes, C.G., 1997a. Venezuelan equine encephalitis and Oropouche virus infections among Peruvian army troops in the Amazon region of Peru. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 56, 661–667. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1997.56.661>
- Watts, D.M., Phillips, I., Callahan, J.D., Griebenow, W., Hyams, K.C., Hayes, C.G., 1997b. Oropouche virus transmission in the Amazon River basin of Peru. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 56, 148–152. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1997.56.148>
- Weaver, S.C., Charlier, C., Vasilakis, N., Lecuit, M., 2018. Zika, Chikungunya, and Other Emerging Vector-Borne Viral Diseases. *Annu. Rev. Med.* 69, 395–408. <https://doi.org/10.1146/annurev-med-050715-105122>
- Weiss, M., Byrne, A.J., Blazek, K., Saliba, D.G., Pease, J.E., Perocheau, D., Feldmann, M., Udalova, I.A., 2015. IRF5 controls both acute and chronic inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 11001–11006. <https://doi.org/10.1073/pnas.1506254112>
- Wilkins, C., Gale, M., 2010. Recognition of viruses by cytoplasmic sensors. *Curr. Opin. Immunol., Innate immunity Antigen processing* 22, 41–47. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2009.12.003>
- Wise, E.L., Márquez, S., Mellors, J., Paz, V., Atkinson, B., Gutierrez, B., Zapata, S., Coloma, J., Pybus, O.G., Jackson, S.K., Trueba, G., Fejer, G., Logue, C.H., Pullan, S.T., 2020. Oropouche virus cases identified in Ecuador using an optimised qRT-PCR informed by metagenomic sequencing. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 14, e0007897. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007897>
- Wise, E.L., Pullan, S.T., Márquez, S., Paz, V., Mosquera, J.D., Zapata, S., Jackson, S.K., Fejer, G., Trueba, G., Logue, C.H., 2018. Isolation of Oropouche Virus from Febrile Patient, Ecuador. *Emerg. Infect. Dis.* 24, 935–937. <https://doi.org/10.3201/eid2405.171569>
- Wong, K.T., Shieh, W.-J., Kumar, S., Norain, K., Abdullah, W., Guarner, J., Goldsmith, C.S., Chua, K.B., Lam, S.K., Tan, C.T., Goh, K.J., Chong, H.T., Jusoh, R., Rollin, P.E., Ksiazek, T.G., Zaki, S.R., Nipah Virus Pathology Working Group, 2002. Nipah virus infection: pathology and pathogenesis of an emerging paramyxoviral zoonosis. *Am. J. Pathol.* 161, 2153–2167. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64493-8](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64493-8)
- Yang, J., Ran, M., Li, H., Lin, Y., Ma, K., Yang, Y., Fu, X., Yang, S., 2022. New insight into neurological degeneration: Inflammatory cytokines and blood–brain barrier. *Front. Mol. Neurosci.* 15. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2022.1013933>
- Yu, W., He, J., Wang, F., He, Q., Shi, Y., Tao, X., Sun, B., 2023. NR4A1 mediates NK-cell dysfunction in hepatocellular carcinoma via the IFN- γ /p-STAT1/IRF1 pathway. *Immunology* 169, 69–82.

<https://doi.org/10.1111/imm.13611>

Yun, Y.-R., Won, J.E., Jeon, E., Lee, S., Kang, W., Jo, H., Jang, J.-H., Shin, U.S., Kim, H.-W., 2010. Fibroblast growth factors: biology, function, and application for tissue regeneration. *J. Tissue Eng.* 2010, 218142. <https://doi.org/10.4061/2010/218142>

Zhang, Y., Zhong, Y., Liu, W., Zheng, F., Zhao, Y., Zou, L., Liu, X., 2022. PFKFB3-mediated glycometabolism reprogramming modulates endothelial differentiation and angiogenic capacity of placenta-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res. Ther.* 13, 391. <https://doi.org/10.1186/s13287-022-03089-3>

Zou, S.-S., Zou, Q.-C., Xiong, W.-J., Cui, N.-Y., Wang, K., Liu, H.-X., Lou, W.-J., Higazy, D., Zhang, Y.-G., Cui, M., 2021. Brain Microvascular Endothelial Cell-Derived HMGB1 Facilitates Monocyte Adhesion and Transmigration to Promote JEV Neuroinvasion. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 11, 701820. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.701820>

APÊNDICES

Publicação como coautora

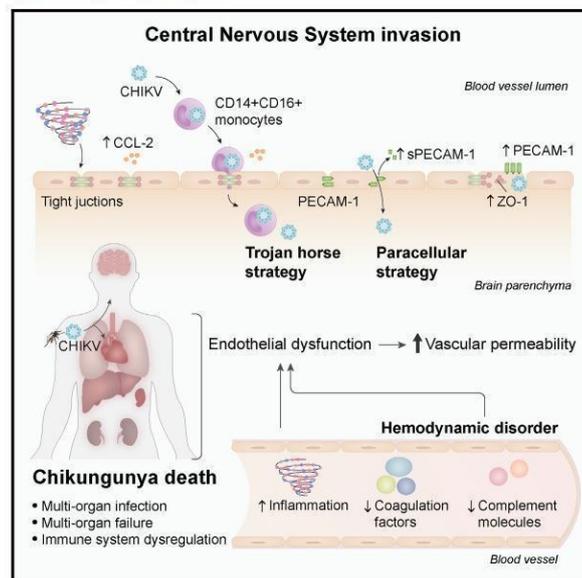
(3 primeiras páginas)

Resource

Cell Host & Microbe

Pathophysiology of chikungunya virus infection associated with fatal outcomes

Graphical abstract



Authors

William M. de Souza,
 Marcilio J. Fumagalli,
 Shirlene T.S. de Lima, ...,
 José Luiz Proença-Módena,
 Nuno R. Faria, Scott C. Weaver

Correspondence

wmdesouza@uky.edu

In brief

de Souza et al. show the complex factors behind fatal chikungunya cases, highlighting multi-organ infection, central nervous system damage, and severe inflammation. The findings suggest the chikungunya virus crosses the blood-brain barrier, contributing to central nervous system infection. This comprehensive study sheds light on chikungunya pathophysiology and fatal outcomes.

Highlights

- Host and viral factors that are associated with chikungunya fatalities are defined
- Chikungunya deaths involve the infection of multiple organs and severe inflammation
- Chikungunya virus crosses the blood-brain barrier
- Chikungunya deaths are associated with dysregulated hemostasis and immune response



de Souza et al., 2024, Cell Host & Microbe 32, 606–622
 April 10, 2024 © 2024 The Author(s). Published by Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/j.chom.2024.02.011>

CellPress

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,⁸ 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



Clarissa P.M. Ferraz,⁶ Débora B. Silva,⁶ Larissa M.F. Duarte,⁶ Priscilla P. Barbosa,⁷ Mariene R. Amorim,⁷ Carla C. Judice,²² Daniel A. Toledo-Teixeira,⁷ Mariana S. Ramundo,^{16,18} Patrícia V. Aguiar,^{8,23} Emerson L.L. Araújo,²⁴ Fabio T.M. Costa,²² Thiago Cerqueira-Silva,^{25,26} Ricardo Khourj,^{25,26} Viviane S. Boaventura,^{25,26,27} Luiz Tadeu M. Figueiredo,²⁸ Rong Fang,⁸ Brechla Moreno,¹⁹ Sandra López-Vergés,^{19,29} Liana Perdigão Mello,⁶ Munir S. Skaf,²⁰ Rodrigo R. Catharino,¹³ Fabiana Granja,^{7,30} Daniel Martins-de-Souza,^{17,31,32} Jessica A. Plante,^{2,3} Kenneth S. Plante,^{2,3} Ester C. Sabino,^{16,18} Michael S. Diamond,³³ Eliseo Eugenin,^{10,36} José Luiz Proença-Módena,^{7,36} Nuno R. Faria,^{14,15,16,36} and Scott C. Weaver^{2,3,4,34,36}

²⁰Institute of Chemistry and Center for Computing in Engineering and Sciences, University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil

²¹Programa de Pós Graduação em Bioinformática, Instituto Metrópole Digital, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, Rio Grande do Norte, Brazil

²²Laboratory of Tropical Diseases, Institute of Biology, University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil

²³Center for Tropical Diseases, Institute for Human Infection and Immunity, University of Texas Medical Branch, Galveston, TX, USA

²⁴Coordenação Geral de Atenção às Doenças Transmissíveis na Atenção Primária, Departamento de Gestão ao cuidado Integral, Secretaria de Atenção Primária à Saúde, Ministério da Saúde, Brasília, Brazil

²⁵Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina, Salvador, Bahia, Brazil

²⁶Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Muniz, Laboratório de Medicina e Saúde Pública de Precisão, Salvador, Bahia, Brazil

²⁷Hospital Santa Izabel, Santa Casa de Misericórdia da Bahia, Serviço de Otorrinolaringologia, Salvador, Bahia, Brazil

²⁸Virology Research Centre, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

²⁹Sistema Nacional de Investigación from SENACYT, Panama, Panama

³⁰Biodiversity Research Centre, Federal University of Roraima, Boa Vista, Roraima, Brazil

³¹D'Or Institute for Research and Education, São Paulo, São Paulo, Brazil

³²Experimental Medicine Research Cluster, University of Campinas, Campinas, São Paulo, Brazil

³³Departments of Medicine, Molecular Microbiology, Pathology & Immunology, Washington University School of Medicine, Saint Louis, MO, USA

³⁴Institute for Human Infection and Immunity, University of Texas Medical Branch, Galveston, TX, USA

³⁵These authors contributed equally

³⁶These authors contributed equally

³⁷Lead contact

*Correspondence: wmdesouza@uky.edu

<https://doi.org/10.1016/j.chom.2024.02.011>

November 2023, the first vaccine against chikungunya (CHIK) was approved by the U.S. Food and Drug Administration.

CHIK is characterized by acute, subacute, or chronic disease. Most cases present with acute fever, myalgia, headache, rash, and arthralgia lasting up to 3 weeks.^{5,7} Subacute cases are usually characterized by fatigue and articular symptoms between 21 and 90 days after symptom onset. In some CHIK cases, arthralgia can persist for months or years with debilitating polyarthralgia and polyarthritides.^{8,9} Other complications, such as ophthalmologic, cardiac, and neurological involvement, have also been described in CHIK patients.^{1,7,10,11}

Since 2004, the spread of CHIKV has been associated with explosive outbreaks in India and other parts of Asia, the Indian Ocean basin, southern Europe, and, more recently, in Latin America.^{12,13} The case-fatality ratio (CFR) for CHIK in La Reunion, Southeast Asia, and Brazil has been estimated between 1 and 1.3 deaths per 1,000 cases, similar to that observed during dengue epidemics.^{4,14} CHIK deaths were associated with sepsis and irreversible multiple organ dysfunction syndrome and more frequent in neonates and elderly people in Brazil, Puerto Rico, and Guadeloupe.^{12,15,16}

To date, several studies have addressed CHIKV-host interactions and CHIK pathogenesis and pathophysiology.^{17–21} However, the characteristics and mechanisms associated with fatal outcomes remain poorly understood, partly because most fatal cases have been described only briefly in case reports or systematic reviews.^{22–24} Here, we combine epidemiological, virological, histopathological, cytokine response, molecular dynamics, metabolomics, proteomics, and genomic analyses to investigate the viral and host factors associated with CHIK deaths.

RESULTS

Spatiotemporal dynamics of CHIK deaths in Brazil

To estimate the burden of CHIK deaths in Brazil, we analyzed suspected fatal CHIK cases reported between January 2015 and June 2023. A total of 909 suspected CHIK deaths were reported to the Brazilian Ministry of Health across 22 of 27 states (Figure 1A). We found a positive correlation between the total number of suspected CHIK cases and the number of suspected CHIK deaths per year during the annual epidemics in Brazil (Pearson's $r = 0.83$, $p < 0.0001$; Figure 1B). The national cumulative CFR was 0.8 deaths per 1,000 cases, ranging from 0 to 2.2 deaths per 1,000 cases among Brazilian states (Figure 1C). Northeastern Brazil accounted for 63.9% (749,783 of 1,173,659) of suspected CHIK cases reported, and 76.1% (692 of 909) of suspected CHIK deaths reported in Brazil between 2015 and 2023 (Figure 1A). Ceará State had 30.6% (278 of 909) of all suspected CHIK deaths reported from 2015 to 2023, mainly from the 2017 CHIKV epidemic, accounting for 188 suspected CHIK deaths (Figures 1A and 1B). The cumulative CFR in Ceará State from 2015 to 2023 was 1.3 deaths per 1,000 cases (Figure 1C).

CHIK deaths are associated with multi-organ infection, central nervous system damage, and hemodynamic disorder

To investigate the viral and host factors associated with CHIK deaths, we performed real-time reverse transcription quantitative polymerase chain reactions (RT-qPCR), histopathology, cytokine quantification, metabolomic, proteomic, and

Lista completa de artigos publicados durante o doutoramento

1. DE SOUZA, WILLIAM M. ; FUMAGALLI, MARCILIO J. ; DE LIMA, SHIRLENE T.S. ; PARISE, PIERINA L. ; CARVALHO, DEYSE C.M. ; HERNANDEZ, CRISTIAN ; DE JESUS, RONALDO ; DELAFIORI, JEANY ; CANDIDO, DARLAN S. ; CARREGARI, VICTOR C. ; MURARO, STEFANIE P. ; SOUZA, GABRIELA F. ; SIMÕES MELLO, LEDA M. ; CLARO, INGRA M. ; DÍAZ, YAMILKA ; KATO, RODRIGO B. ; TRENTIN, LUCAS N. ; COSTA, CLAUBER H.S. ; MAXIMO, ANA CAROLINA B.M. ; CAVALCANTE, KARENE F. . Pathophysiology of chikungunya virus infection associated with fatal outcomes. *Cell Host & Microbe*, v. 32, p. 1-17, 2024.
2. ZAMBALDE, ÉRIKA PEREIRA ; DIAS, THOMAZ LUSCHER ; MAKTURA, GRAZIELLE CELESTE ; AMORIM, MARIENE R. ; BRENHA, BIANCA ; SANTOS, LUANA NUNES ; BUSCARATTI, LUCAS ; ELSTON, JOÃO GABRIEL DE ANGELI ; MANCINI, MARIANA CAMARGO SILVA ; PAVAN, ISADORA CAROLINA BETIM ; TOLEDO-TEIXEIRA, DANIEL A. ; BISPO-DOS-SANTOS, KARINA ; PARISE, PIERINA L. ; MORELLI, ANA PAULA ; SILVA, LUIZ GUILHERME SALVINO DA ; CASTRO, ÍCARO MAIA SANTOS DE ; SACCON, TATIANA D. ; MORI, MARCELO A. ; GRANJA, FABIANA ; NAKAYA, HELDER I. . Increased mTOR Signaling and Impaired Autophagic Flux Are Hallmarks of SARS-CoV-2 Infection. *Current Issues in Molecular Biology (Online)*, v. 45, p. 327-336, 2023.
3. ANDRADE, LUIS AF ; BAGNO, FLÁVIA F ; SÉRGIO, SARAH AR ; PARISE, PIERINA L ; TOLEDO-TEIXEIRA, DANIEL A ; FERNANDES, ANA PSM ; TEIXEIRA, SANTUZA MR ; GRANJA, FABIANA ; PROENÇA-MODENA, JOSÉ LUIZ ; DA FONSECA, FLAVIO G . Heterogeneity of humoral response patterns in mildly symptomatic, non-hospitalized COVID-19 patients: A one-year longitudinal study. *EXPERIMENTAL BIOLOGY AND MEDICINE*, v. 1, p. 153537022311579, 2023.
4. KNITTEL, THIAGO L ; WASSANO, NATÁLIA S ; DIAS, ARTUR HS ; NUNES SANTOS, LUANA ; FERRARI, ALLAN JR ; MURARO, STÉFANIE PRIMON ; CARREGARI, VICTOR C ; DAVANZO, GUSTAVO G ; SOUZA, GABRIELA F ; BOLDRINI, VINICIUS O ; VIRGÍLIO-DA-SILVA, JOÃO VICTOR ; BRUNETTI, NATALIA S ; PROFETA, GERSON S ; MONTEIRO, LAUAR B ; DE MORAES, DIOGO ; VERAS, FLAVIO P ; TAVARES, LUCAS A ; FORATO, JULIA ; CASTRO, ICARO MS ; PARISE, P. L. . SARS-CoV-2 uses CD4 to infect T helper lymphocytes. *eLife*, v. 12, p. 1-26, 2023.
5. SALGADO, BARBARA BATISTA ; MAUÉS, FÁBIO CARMONA DE JESUS ; JORDÃO, MAELE ; PEREIRA, RENATO LEMOS ; TOLEDO-TEIXEIRA, DANIEL A. ; PARISE, PIERINA L. ; GRANJA, FABIANA ; SOUZA, HIGO FERNANDO SANTOS ; YAMAMOTO, MARCIO MASSAO ; CHIANG, JANNIFER OLIVEIRA ; MARTINS, LIVIA CARICIO ; BOSCARDIN, SILVIA BEATRIZ ; LALWANI, JAILA DIAS BORGES ; VASCONCELOS, PEDRO FERNANDO C ; PROENÇA-MODENA, JOSÉ LUIZ ; LALWANI, PRITESH . Antibody cross-reactivity and evidence of susceptibility to emerging Flaviviruses in the dengue-endemic Brazilian Amazon.

INTERNATIONAL JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES, v. 129, p. 142-151, 2023.

6. FERNÁNDEZ, DIANA ; YUN, RUIMEI ; ZHOU, JIEHUA ; PARISE, PIERINA L. ; MOSSO-GONZÁLEZ, CLEMENTE ; VILLASANTE-TEZANOS, ALEJANDRO ; WEAVER, SCOTT C. ; PANDO-ROBLES, VICTORIA ; AGUILAR, PATRICIA V. . Differential Susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* Mosquitoes to Infection by Mayaro Virus Strains. AMERICAN JOURNAL OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE, v. 109, p. 115-122, 2023.

7. GROSS, LUÍSA GRAVE ; GASPARINI, MATHEUS SCHWENGBER ; SANTOS, LEANDRO MECI DOS ; HAMADE, AHMAD MOHAMAD ALI ; FAVARATO, ARTHUR PINHEIRO ; PARISE, PIERINA LORENCINI ; PROENÇA-MODENA, JOSÉ LUIZ ; ALVES, MÔNICA . Detection of SARS-CoV-2 virus on the ocular surface of an asymptomatic health-care professional. ARQUIVOS BRASILEIROS DE OFTALMOLOGIA, v. 86, p. 1-3, 2022.

8. BAGNO, FLÁVIA F. ; ANDRADE, LUIS A. F. ; SÉRGIO, SARAH A. R. ; PARISE, PIERINA L. ; TOLEDO-TEIXEIRA, DANIEL A. ; GAZZINELLI, RICARDO T. ; FERNANDES, ANA P. S. M. ; TEIXEIRA, SANTUZA M. R. ; GRANJA, FABIANA ; PROENÇA-MÓDENA, JOSÉ L. ; DA FONSECA, FLAVIO G. . Previous Infection with SARS-CoV-2 Correlates with Increased Protective Humoral Responses after a Single Dose of an Inactivated COVID-19 Vaccine. Viruses-Basel, v. 14, p. 510, 2022.

9. ZAMBALDE, ÉRIKA PEREIRA ; PAVAN, ISADORA CAROLINA BETIM ; MANCINI, MARIANA CAMARGO SILVA ; SEVERINO, MATHEUS BRANDEMARTE ; SCUDERO, ORLANDO BONITO ; MORELLI, ANA PAULA ; AMORIM, MARIENE RIBEIRO ; BISPO-DOS-SANTOS, KARINA ; GÓIS, MARIANA MARCELA ; TOLEDO-TEIXEIRA, DANIEL A. ; PARISE, PIERINA LORENCINI ; MAUAD, THAIS ; DOLHNIKOFF, MARISA ; SALDIVA, PAULO HILÁRIO NASCIMENTO ; MARQUES-SOUZA, HENRIQUE ; PROENÇA-MODENA, JOSÉ LUIZ ; VENTURA, ARMANDO MORAIS ; SIMABUCO, FERNANDO MOREIRA . Characterization of the Interaction Between SARS-CoV-2 Membrane Protein (M) and Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA) as a Potential Therapeutic Target. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, v. 12, p. 849017, 2022.

10. CRUNFLI, FERNANDA ; CARREGARI, VICTOR C. ; VERAS, FLAVIO P. ; SILVA, LUCAS S. ; NOGUEIRA, MATEUS HENRIQUE ; ANTUNES, ANDRÉ SARAIVA LEÃO MARCELO ; VENDRAMINI, PEDRO HENRIQUE ; VALENÇA, ALINE GAZZOLA FRAGNANI ; BRANDÃO-TELES, CAROLINE ; ZUCCOLI, GIULIANA DA SILVA ; REIS-DE-OLIVEIRA, GUILHERME ; SILVA-COSTA, LÍCIA C. ; SAIA-CEREDA, VERÔNICA MONTEIRO ; SMITH, BRADLEY J. ; CODO, ANA CAMPOS ; DE SOUZA, GABRIELA F ; MURARO, STÉFANIE P. ; PARISE, PIERINA LORENCINI ; TOLEDO-TEIXEIRA, DANIEL A. ; SANTOS DE CASTRO, ÍCARO MAIA . Morphological, cellular, and molecular basis of brain infection in COVID-19 patients. PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA, v. 119, p. 1, 2022.

11. BORIN, ALEXANDRE ; COIMBRA, LAÍS D. ; BISPO-DOS-SANTOS, KARINA ; NACIUK, FABRÍCIO F. ; FONTOURA, MARINA ; SIMEONI, CAMILA L. ; GOMES, GIOVANNI F. ; AMORIM, MARIENE R. ; GRAVINA, HUMBERTO D. ; SHIMIZU, JACQUELINE FARINHA ; PASSOS, AMANDA S. C. ; DE OLIVEIRA, ISADORA M. ; DE CARVALHO, ANA CAROLINA ; CARDOSO, ALISSON CAMPOS ; PARISE, PIERINA L. ; TOLEDO-TEIXEIRA, DANIEL A. ; SOTORILLI, GIULIANA E. ; PERSINOTI, GABRIELA F. ; CLARO, INGRA MORALES ; SABINO, ESTER C. . Identification and characterization of the anti-SARS-CoV-2 activity of cationic amphiphilic steroidal compounds. *Virulence*, v. 13, p. 1031-1048, 2022.
12. PASCOAL, LÍVIA BITENCOURT ; RODRIGUES, PATRÍCIA BRITO ; GENARO, LÍVIA MOREIRA ; GOMES, ARILSON BERNARDO DOS SANTOS PEREIRA ; TOLEDO-TEIXEIRA, DANIEL AUGUSTO ; PARISE, PIERINA LORENCINI ; BISPO-DOS-SANTOS, KARINA ; SIMEONI, CAMILA LOPES ; GUIMARÃES, PAULA VERI ; BUSCARATTI, LUCAS ILDEFONSO ; ELSTON, JOÃO GABRIEL DE ANGELI ; MARQUES-SOUZA, HENRIQUE ; MARTINS-DE-SOUZA, DANIEL ; AYRIZONO, MARIA DE LOURDES SETSUKO ; VELLOSO, LÍCIO AUGUSTO ; PROENCA-MODENA, JOSÉ LUIZ ; MORAES-VIEIRA, PEDRO MANOEL MENDES ; MORI, MARCELO ALVES SILVA ; FARIAS, ALESSANDRO SANTOS ; VINOLO, MARCO AURÉLIO RAMIREZ . Microbiota-derived short-chain fatty acids do not interfere with SARS-CoV-2 infection of human colonic samples. *Gut Microbes*, v. 13, p. 1-9, 2021.
13. AMORIM, MARIENE R. ; SOUZA, WILLIAM M. ; BARROS, ANTONIO C.G. ; TOLEDO-TEIXEIRA, DANIEL A. ; DOS-SANTOS, KARINA BISPO ; SIMEONI, CAMILA L. ; PARISE, PIERINA L. ; VIEIRA, ALINE ; FORATO, JULIA ; CLARO, INGRA M. ; MOFATTO, LUCIANA S. ; BARBOSA, PRISCILA P. ; BRUNETTI, NATALIA S. ; FRANÇA, EMERSON S.S. ; PEDROSO, GISELE A. ; CARVALHO, BARBARA F.N. ; ZACCARIOTTO, TANIA R. ; KRYWACZ, KAMILA C.S. ; VIEIRA, ANDRÉ S. ; MORI, MARCELO A. . Respiratory Viral Shedding in Healthcare Workers Reinfected with SARS-CoV-2, Brazil, 2020. *EMERGING INFECTIOUS DISEASES*, v. 27, p. 1737-1740, 2021.
14. SOUZA, WILLIAM M ; AMORIM, MARIENE R ; SESTI-COSTA, RENATA ; COIMBRA, LAIS D ; BRUNETTI, NATALIA S ; TOLEDO-TEIXEIRA, DANIEL A ; DE SOUZA, GABRIELA F ; MURARO, STEFANIE P ; PARISE, PIERINA L ; BARBOSA, PRISCILLA P ; BISPO-DOS-SANTOS, KARINA ; MOFATTO, LUCIANA S ; SIMEONI, CAMILA L ; CLARO, INGRA M ; DUARTE, ADRIANA S S ; COLETTI, THAIS M ; ZANGIROLAMI, AUDREY B ; COSTA-LIMA, CAROLINA ; GOMES, ARILSON B S P ; BUSCARATTI, LUCAS I. 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. *Lancet Microbe*, v. 2, p. e527-e535, 2021.
15. DE SOUZA, WILLIAM M. ; MURARO, STÉFANIE P. ; SOUZA, GABRIELA F. ; AMORIM, MARIENE R. ; SESTI-COSTA, RENATA ; MOFATTO, LUCIANA S. ; FORATO, JULIA ; BARBOSA, PRISCILLA P. ; TOLEDO-TEIXEIRA, DANIEL A.

; BISPO-DOS-SANTOS, KARINA ; PARISE, PIERINA L. ; BRUNETTI, NATALIA S. ; MOREIRA, JOSELIA C. O. ; COSTA, VITOR A. ; CARDOZO, DANIELA M. ; MORETTI, MARIA L. ; BARROS-MAZON, SILVIA ; MARCHESI, GABRIELA F. ; AMBROSIO, CHRISTIANE ; SPILKI, FERNANDO R. . Clusters of SARS-CoV-2 Lineage B.1.1.7 Infection after Vaccination with Adenovirus-Vectored and Inactivated Vaccines. *Viruses-Basel*, v. 13, p. 2127, 2021.

16. GASPARINI, MATHEUS S ; DOS SANTOS, LEANDRO M ; HAMADE, AHMAD MA ; GROSS, LUÍSA G ; FAVARATO, ARTHUR P ; DE VASCONCELLOS, JOSÉ PC ; DE MELO, MÔNICA B ; PARISE, PIERINA L ; SIMEONI, CAMILA L ; SILVA, NATÁLIA B ; DA SILVA MORI, MARCELO A ; VIEIRA, ANDRÉ S ; DOS SANTOS FARIAS, ALESSANDRO ; GRANJA, FABIANA ; SCHREIBER, ANGELICA Z ; MORETTI, MARIA L ; PROENÇA-MODENA, JOSÉ L ; ALVES, MÔNICA . Identification of SARS-CoV-2 on the ocular surface in a cohort of COVID-19 patients from Brazil. *EXPERIMENTAL BIOLOGY AND MEDICINE*, v. 1, p. 153537022110246-7, 2021.

17. SILVA-FILHO, JOAO LUIZ ; DE OLIVEIRA, LILIAN G. ; MONTEIRO, LETICIA ; PARISE, PIERINA L. ; ZANLUQUI, NAGELA G. ; POLONIO, CAROLINA M. ; DE FREITAS, CARLA L. ; TOLEDO-TEIXEIRA, DANIEL A. ; DE SOUZA, WILLIAM M. ; BITTENCOURT, NAJARA ; AMORIM, MARIENE R. ; FORATO, JULIA ; MURARO, STÉFANIE P. ; DE SOUZA, GABRIELA F. ; MARTINI, MATHEUS C. ; BISPO-DOS-SANTOS, KARINA ; VIEIRA, ALINE ; JUDICE, CARLA C. ; PASTORE, GLAUCIA M. ; AMARAL, ELIANA . Gas6 drives Zika virus-induced neurological complications in humans and congenital syndrome in immunocompetent mice. *BRAIN BEHAVIOR AND IMMUNITY*, v. 97, p. 260-274, 2021.

18. VENCESLAU, E. M. ; GUIDA, J. P. S. ; NOBREGA, G. M. ; SAMOGIM, A. P. ; PARISE, PIERINA LORENCINI ; JAPECANGA, R. R. ; TOLEDO-TEIXEIRA, D.A. ; FORATO, J. ; TAVARES, A. A. ; SOUZA, A. ; ALTEMANI, A. ; CONSONNI, S. R. ; PASSINI JR., R. ; AMARAL, ELIANA ; PROENÇA-MODENA, JOSE LUIZ ; Maria Laura Costa . Adequate Placental Sampling for the Diagnosis and Characterization of Placental Infection by Zika Virus. *Frontiers in Microbiology*, v. 11, p. 1-11, 2020.

19. CODO, ANA CAMPOS ; DAVANZO, GUSTAVO GASTÃO ; MONTEIRO, LAUAR DE BRITO ; DE SOUZA, GABRIELA FABIANO ; MURARO, STÉFANIE PRIMON ; VIRGILIO-DA-SILVA, JOÃO VICTOR ; PRODONOFF, JULIANA SILVEIRA ; CARREGARI, VICTOR CORASOLLA ; DE BIAGI JUNIOR, CARLOS ALBERTO OLIVEIRA ; CRUNFLI, FERNANDA ; JIMENEZ RESTREPO, JEFFERSSON LEANDRO ; VENDRAMINI, PEDRO HENRIQUE ; REIS-DE-OLIVEIRA, GUILHERME ; BISPO DOS SANTOS, KARINA ; TOLEDO-TEIXEIRA, DANIEL A. ; PARISE, PIERINA LORENCINI ; MARTINI, MATHEUS CAVALHEIRO ; MARQUES, RAFAEL ELIAS ; CARMO, HELISON R. ; BORIN, ALEXANDRE . Elevated Glucose Levels Favor SARS-CoV-2 Infection and Monocyte Response through a HIF-1 α /Glycolysis-Dependent Axis. *Cell Metabolism*, v. 32, p. 1-10, 2020.

20. RIBEIRO AMORIM, MARIENE ; CORNEJO PONTELLI, MARJORIE ; FABIANO DE SOUZA, GABRIELA ; PRIMON MURARO, STÉFANIE ; TOLEDO-TEIXEIRA, DANIEL A. ; FORATO, JULIA ; BISPO-DOS-SANTOS, KARINA ; BARBOSA, NATÁLIA S. ; CAVALHEIRO MARTINI, MATHEUS ; LORENCINI PARISE, PIERINA ; VIEIRA, ALINE ; PAIER MILANEZ, GUILHERME ; LAMBERTI PINTO DASILVA, LUIS ; JAYCHAND LALWANI, PRITESH ; SANTOS FARIAS, ALESSANDRO ; RAMIREZ VINOLO, MARCO AURÉLIO ; SESTI-COSTA, RENATA ; ARRUDA, EURICO ; PROENCA-MODENA, JOSE LUIZ . Oropouche Virus Infects, Persists and Induces IFN Response in Human Peripheral Blood Mononuclear Cells as Identified by RNA PrimeFlow- and qRT-PCR Assays. *Viruses-Basel*, v. 12, p. 785, 2020.
21. NOBREGA, GUILHERME M. ; SAMOGIM, ANA PAULA ; PARISE, PIERINA L. ; VENCESLAU, EMANUELLA M. ; GUIDA, JOSÉ PAULO S. ; JAPECANGA, RODOLFO R. ; AMORIM, MARIENE R. ; TOLEDO-TEIXEIRA, DANIEL A. ; FORATO, JULIA ; CONSONNI, SÍLVIO R. ; COSTA, MARIA LAURA ; PROENCA-MODENA, JOSÉ LUIZ ; AMARAL, ELIANA ; BESTETI PIRES MAYER-MILANEZ, HELAINE MARIA ; RIBEIRO-DO-VALLE, CAROLINA C. ; CALIL, ROSELI ; BENNINI JUNIOR, JOÃO RENATO ; LAJOS, GIULIANE JESUS ; ALTEMANI, ALBINA ; MORETTI, MARIA LUIZA . TAM and TIM receptors mRNA expression in Zika virus infected placentas. *PLACENTA*, v. 101, p. 204-207, 2020.
22. PROENCA-MODENA, JOSÉ LUIZ ; DE SOUZA CARDOSO, RICARDO ; CRIADO, MIRIÃ FERREIRA ; MILANEZ, GUILHERME PAIER ; DE SOUZA, WILLIAM MARCIEL ; PARISE, PIERINA LORENCINI ; BERTOL, JÉSSICA WILDGRUBE ; DE JESUS, BRUNA LAIS SANTOS ; PRATES, MIRELA CRISTINA MOREIRA ; SILVA, MARIA LÚCIA ; BUZATTO, GUILHERME PIETRUCCHI ; DEMARCO, RICARDO CASSIANO ; VALERA, FABIANA CARDOSO PEREIRA ; TAMASHIRO, EDWIN ; ANSELMO-LIMA, WILMA TEREZINHA ; ARRUDA, EURICO . Human adenovirus replication and persistence in hypertrophic adenoids and palatine tonsils in children. *JOURNAL OF MEDICAL VIROLOGY*, v. 0/0, p. 1-13, 2019.
23. JUDICE, CARLA CRISTINA ; TAN, JESLIN J. L. ; PARISE, PIERINA LORENCINI ; KAM, YIU-WING ; MILANEZ, GUILHERME PAIER ; LEITE, JULIANA ALMEIDA ; CASERTA, LEONARDO CARDIA ; ARNS, CLARICE WEIS ; RESENDE, MARIANGELA RIBEIRO ; ANGERAMI, RODRIGO ; AMARAL, ELIANA ; JUNIOR, RENATO PASSINI ; FREITAS, ANDRÉ RICARDO RIBAS ; COSTA, FABIO TRINDADE MARANHÃO ; PROENCA-MODENA, JOSE LUIZ ; NG, LISA F. P. . Efficient detection of Zika virus RNA in patients blood from the 2016 outbreak in Campinas, Brazil. *Scientific Reports*, v. 8, p. 8:4012, 2018.
24. MELO, CARLOS FERNANDO ODIR RODRIGUES ; NAVARRO, LUIZ CLAUDIO ; DE OLIVEIRA, DIOGO NOIN ; GUERREIRO, TATIANE MELINA ; LIMA, ESTELA DE OLIVEIRA ; DELAFIORI, JEANY ; DABAJA, MOHAMED ZIAD ; RIBEIRO, MARTA DA SILVA ; DE MENEZES, MAICO ; RODRIGUES, RAFAEL GUSTAVO MARTINS ; MORISHITA, KAREN NODA ; ESTEVES, CIBELE ZANARDI ; DE AMORIM, ALINE LOPES LUCAS ; AOYAGUI,

CAROLINE TIEMI ; PARISE, PIERINA LORENCINI ; MILANEZ, GUILHERME PAIER ; DO NASCIMENTO, GABRIELA MANSANO ; RIBAS FREITAS, ANDRÉ RICARDO ; ANGERAMI, RODRIGO ; COSTA, FÁBIO TRINDADE MARANHÃO .
A Machine Learning Application Based in Random Forest for Integrating Mass Spectrometry-Based Metabolomic Data: A Simple Screening Method for Patients With Zika Virus. FRONTIERS IN BIOENGINEERING AND BIOTECHNOLOGY, v. 6, p. 1/31-11, 2018.

Tabela suplementar 1 - Primers utilizados para análises de expressão gênica.

Alvo		Sequência (5' - 3')	Referência
HUMANOS			
IRF5	Forward	CCACCTCAGCCCTACAAGAT	(YANAY et al., 2007)
	Reverse	CTCCTCTCCTGCACCAAAAG	
GAPDH	Forward	CCCATGTTTCGTCATGGGTGT	(MICKE et al., 2006)
	Reverse	TGGTCATGAGTCCTTCCACGAT	
IL-6	Forward	GGTACATCCTCGACGGCATCT	(LAU et al., 2013)
	Reverse	GTGCCTCTTTGCTGCTTTCAC	
MyD88	Forward	GACGACGTGCTGCTGGAGCTG	(ISNARDI et al., 2008)
	Reverse	GATGAAGGCATCGAAACGCTCAG	
TLR-3	Forward	TGGTTGGGCCACCTAGAAGTA	(PERROT et al., 2010)
	Reverse	TCTCCATTCTGGCCTGTG	
TLR-7	Forward	CTCCCTGGATCTGTACACCTGTGAG	(SCHAEFER et al., 2004)
	Reverse	CTCCACAGAGCCTTTTCCGGAGCT	
IRF3	Forward	AGCAGAGGACCGGAGCAA	(REIMER; SCHWEIZER; JUNGI, 2007)
	Reverse	AGAGGTGTCTGGCTGGGAAA	
IRF7	Forward	TGTGCCGAGTGCACCTAGAG	(REIMER; SCHWEIZER; JUNGI, 2007)
	Reverse	GAAGCACTCGATGTCGTCATAGAG	
IFIT1	Forward	AGAAGCAGGCAATCACAGAAAA	(SCHÖBEL; RÖSCH; HERKER, 2018)
	Reverse	CTGAAACCGACCATAGTGGAAAT	
IFIT2	Forward	GGTCTCTTCAGCATTATTGGTG	(IMAIZUMI et al., 2014)
	Reverse	TGCCGTAGGCTGCTCTCCA	
IFITM2	Forward	ATCCCGTAACCCGATCAC	(WARREN et al., 2014)
	Reverse	CTTCTGTCCCTAGACTTCAC	
OAS1	Forward	CAAGCTCAAGAGCCTCATCC	(SANTER et al., 2017)
	Reverse	TGGGCTGTGTTGAAATGTGT	
RNase-L	Forward	ATGGAGAGCAGGGATCATAACA	(LIN et al., 2009)
	Reverse	TCAGCACCCAGGGCTGG	
Mx1	Forward	CCTGGAGGAGCAGAGTGACAC	(SHIN et al., 2015)
	Reverse	GGTTAATCGGAGAATTTGGCAA	
IFN-beta	Forward	AGCTCCAAGAAAGGACGAACAT	(LI et al., 2016)
	Reverse	GCCCTGTAGGTGAGGTTGATCT	
MAVS	Forward	GTCACCTCCTGCTGAGA	(JACOBS et al., 2014)
	Reverse	TGCTCTGAATTCTCTCCT	
RIG1	Forward	TGTGTCCTACAGGTTGTGGA	(SCHÖBEL; RÖSCH; HERKER, 2018)
	Reverse	CACTGGGATCTGATTGCAAAA	
MDA5	Forward	CCAAAGCTGAAGAACACAT	(SHAO et al., 2018)
	Reverse	ATCTTCTCTGGTTGCATCT	
TRIF	Forward	GGCCCATCACTTCCTAGCG	(HONG et al., 2015)
	Reverse	GAGAGATCCTGGCCTCAGTTT	
VCAM1	Forward	CTTAAATGCCTGGGAAGATGGT	(KLEIN et al., 2017)
	Reverse	GTCATGAGACGGAGTCACCAAT	
ZO-1	Forward	AGAAGGATGTTTATCGTCGCATT	(YE, P. 2012)
	Reverse	CCAAGAGCCCAGTTTTCCAT	
Ocludina	Forward	GTCCAATATTTGTGGGACAAGG	(YE, P. 2012)
	Reverse	GGCACGTCCTGTGTGCCT	
ICAM	Forward	GGCCTCAGTCAGTGTGA	(LU et al., 2005)
	Reverse	AACCCATTTCAGCGTCA	
e-Selectina	Forward	ACCTCCACGGAAGCTATGACT	(KLEIN et al., 2017)
	Reverse	CAGACCCACACATTGTTGACTT	
p-Selectina	Forward	TCATCCCGGTGAAGCAATGT	(LARTEY et al., 2022)
	Reverse	TGGAGAACGCAAGGACAGGTAT	
Camundongos			
IRF5	Forward	AATACCCACACCTTTTGA	(TAKAOKA et al., 2005)
	Reverse	TTGAGATCCGGGTTTGGAGAT	
GAPDH	Forward	CTCATGACCACAGTCCATGC	(YANAI et al., 2007)
	Reverse	CACATTGGGGGTAGGAACAC	

TLR-3	Forward	TTAGAGTCCAACGGCTTAGAT	(TAKAOKA et al., 2005)
	Reverse	AACGGATTGAAGCGCATA	
TLR-7	Forward	GTTCTTGACCTTGGCACTA	(TAKAOKA et al., 2005)
	Reverse	CCGTGCATATTCATCGTA	
RIG1	Forward	CAGACAGATCCGAGACACTA	(YOUNT et al, 2007)
	Reverse	TGCAAGACCTTTGGCCAGTT	
MDA5	Forward	CGATCCGAATGATTGATGCA	(YOUNT et al, 2007)
	Reverse	AGTTGGTCATTGCAACTGCT	
IRF3	Forward	GGACTTGACATCTCCAACA	(ALMEIDA et al., 2011)
	Reverse	TTGCTCCACGTAGGGACAAT	
IRF7	Forward	CACCCCATCTTCGACTTCA	(KHOROOSHI and OWENS, 2010)
	Reverse	CCAAAACCCAGGTAGATGGTGTA	
IFIT1	Forward	GCCTATCGCCAAGATTTAGATGA	(DAS et al., 2016)
	Reverse	TTCTGGATTTAACCGGACAGC	
IFIT2	Forward	GGAGAGCAATCTGCGACAG	(DAS et al., 2016)
	Reverse	GCTGCCTCATTTAGACCTCTG	
IFITM2	Forward	TGGGCTTCGTTGCCTATGC	(SOOD et al., 2017)
	Reverse	AGAATGGGGTGTCTTTGTGC	
IFN-beta	Forward	ATGAGTGGTGGTTGCAGGC	(ZHANG et al., 2015)
	Reverse	TGACCTTTCAAATGCAGTAGATTCA	
IFN-lambda	Forward	TCCCAGTGGAAAGCAAAGGATTG	(OKAMOTO et al., 2013)
	Reverse	TCAAGCACCTCTTCTCGATGG	
MAVS	Forward	AGCCCTCCAGAGAGCATCAA	(OSHIUMI et al., 2015)
	Reverse	GAGGCAACATTTGCTGCGT	
MyD88	Forward	GATGACTGGCCTGAGCAACT	(LIU et al., 2017)
	Reverse	GCTATCCTTGGGAGCTGTCC	
TRIF	Forward	TGTTGGAAAGCAGTGGCCTAT	(OSHIUMI et al., 2015)
	Reverse	GATGACGTGGTGTCTGCAGA	
VCAM1	Forward	CTTAAATGCCTGGGAAGATGGT	(KLEIN et al, 2017)
	Reverse	GTCAATGAGACGGAGTCACCAAT	
IL-6	Forward	TAGTCCTTCCACCCCAATTTCC	(VALDEARCOS et al., 2012)
	Reverse	TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC	
ZO-1	Forward	GCACCATGCCTAAAGCTGTC	(CHIHARA et al., 2013)
	Reverse	ACTCAACACACCACCATTGC	
E-selectin	Forward	AGCTACCCATGGAACACGAC	(ELLETT et al., 2011)
	Reverse	ACGCAAGTTCTCCAGCTGTT	
ICAM	Forward	TGCGTTTTGGAGCTAGCGGACCA	(IZUMI et al., 2005)
	Reverse	CGAGGACCATACAGCACGTGCCAG	
p-Selectina	Forward	TGAGCACTGCTTGAAGAAAAAGC	(GHOSHAL et al., 2014)
	Reverse	CACGATTTACATTCTGGCCC	
Diferenciação			
MKI67	Forward	ATCGTCCCAGGTGGAAGAGTT	(SALGADO et al., 2023)
	Reverse	ATAGTAACCAGGCGTCTCGTGG	
SYN1	Forward	TCAGACCTTCTACCCCAATCA	(SALGADO et al., 2023)
	Reverse	GTCCTGGAAGTCATGCTGGT	
SYP	Forward	CGAGGTCGAGTTCGAGTACC	(SALGADO et al., 2023)
	Reverse	AATTCGGCTGACGAGGAGTA	
TH	Forward	GCGCAGGAAGCTGATTGCTG	(SALGADO et al., 2023)
	Reverse	TGTCTCCCGGTAGCCGCTG	
AADC	Forward	GAGTCACTGGTGCGCCAGGA	(SALGADO et al., 2023)
	Reverse	CCGTGCGAGAACAGATGGCA	
GFAP	Forward	CAACCTGCAGATTCGAGAAA	(SALGADO et al., 2023)
	Reverse	GTCCTGCCTCACATCACATC	
OLIG2	Forward	GCTGCGACGACTATCTTCCC	(SALGADO et al., 2023)
	Reverse	GCCTCCTAGCTTGTCCCA	
ACTB	Forward	AGTGTGACGTGGACATCCGCAAAG	(SALGADO et al., 2023)
	Reverse	GTCCACCTTCCAGCAGATGTGGAT	

ANEXOS

Aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **O papel de IRF-5 na patogênese e neurovirulência de Oropouche vírus**, registrada com o nº **5423-1/2019**, sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Jose Luiz Proença Módena e Pierina Lorencini Parise, Daniel Augusto de Toledo Teixeira, Matheus Cavalheiro Martini, Stéfanie Primon Muraro, Gabriela Fabiano de Souza**, 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 **14/11/2019**.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	01/01/2020 a 30/04/2022
Vigência da autorização para manipulação animal:	14/11/2019 a 30/04/2022
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J selvagem (WT)
No. de animais:	350
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	175 Machos 175 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout / Irf5tm1Ppr x Tg(Cdh5-cre)7Mlia
No. de animais:	280
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	140 Machos 140 Fêmeas
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J selvagem (WT)
No. de animais:	14
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	14 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout / C57BL/6-Irf5 tm1.2 Mrl
No. de animais:	14
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	14 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout / Irf5tm1Ppr x Tg(Cdh5-cre)7Mlia
No. de animais:	14
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	14 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout / Irf5tm1Ppr x Lyz2tm1(cre)Ifo
No. de animais:	14
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	14 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout / Irf5tm1Ppr x Cd19tm1(cre)Cgn
No. de animais:	14
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	14 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout / Ifnar1tm1.1Ees x Tg(Cdh5-cre)7Mlia
No. de animais:	14
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	14 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout / Ifnar1tm1.1Ees x Lyz2tm1(cre)Ifo

No. de animais:	14
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	14 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout / Ifnar1tm1.1Ees x Cd19tm1(cre)Cgn
No. de animais:	14
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	14 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J selvagem (WT)
No. de animais:	14
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	14 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout / C57BL/6-Irf5 tm1.2 Mrl
No. de animais:	14
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	14 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout / Irf5tm1Ppr x Tg(Cdh5-cre)7Mlia
No. de animais:	14
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	14 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout / Irf5tm1Ppr x Lyz2tm1(cre)lfo
No. de animais:	14
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	14 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout / Irf5tm1Ppr x Cd19tm1(cre)Cgn
No. de animais:	14
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	14 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout / Ifnar1tm1.1Ees x Tg(Cdh5-cre)7Mlia
No. de animais:	14
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	14 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout / Ifnar1tm1.1Ees x Lyz2tm1(cre)lfo
No. de animais:	14
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	14 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout / Ifnar1tm1.1Ees x Cd19tm1(cre)Cgn
No. de animais:	14
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	14 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J selvagem (WT)
No. de animais:	14
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	14 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout / C57BL/6-Irf5 tm1.2 Mrl
No. de animais:	14
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	14 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout / Irf5tm1Ppr x Tg(Cdh5-cre)7Mlia
No. de animais:	14
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	14 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout / Ifnar1tm1.1Ees x Tg(Cdh5-cre)7Mlia
No. de animais:	14
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	14 Machos

Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo isogênico / C57BL/6J selvagem (WT)
No. de animais:	14
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	14 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout / C57BL/6-Irf5 tm1.2 Mrl
No. de animais:	14
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	14 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout / Irf5tm1Ppr x Tg(Cdh5-cre)7Mlia
No. de animais:	14
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	14 Machos
Espécie / linhagem/ raça:	Camundongo Knockout / Ifnar1tm1.1Ees x Tg(Cdh5-cre)7Mlia
No. de animais:	14
Idade/Peso:	4.00 Semanas / 20.00 Gramas
Sexo:	14 Machos
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, 02 de dezembro de 2019.


 Prof. Dr. Wagner José Fávaro
 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.

Declaração de que a tese não infringe os dispositivos da lei nº 9610/98, nem o direito autoral de qualquer editora

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 de IRF-5 em células endoteliais e da infecção do Sistema Nervoso Central na neuropatogênese do vírus Oropouche**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 01 de julho de 2024

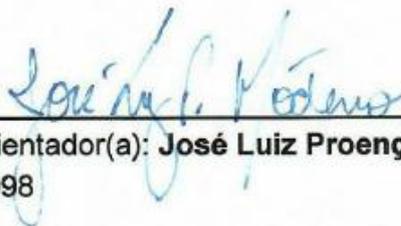
Assinatura : _____



Nome do(a) autor(a): **Pierina Lorencini Parise**

RG n.º 35542436/8

Assinatura : _____

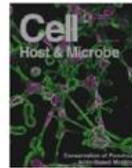


Nome do(a) orientador(a): **José Luiz Proença Módena**

RG n.º 32744098

Prof. Dr. JOSÉ LUIZ PROENÇA MÓDENA
Depto. de Genética, Evolução e Biogeografia
IB / Unicamp
Matr. 308101

Declaração de direitos autorais da editora.



Pathophysiology of chikungunya virus infection associated with fatal outcomes

Author:

William M. de Souza, Marcilio J. Fumagalli, Shirlene T.S. de Lima, Pierina L. Parise, Deyse C.M. Carvalho, Cristian Hernandez, Ronaldo de Jesus, Jeany Delafiori, Darlan S. Candido, Victor C. Carregari, Stefanie P. Muraro, Gabriela F. Souza et al.

Publication: Cell Host & Microbe

Publisher: Elsevier

Date: 10 April 2024

© 2024 The Author(s). Published by Elsevier Inc.

Creative Commons

This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons CC-BY](#) license, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

You are not required to obtain permission to reuse this article.

To request permission for a type of use not listed, please contact [Elsevier Global Rights Department](#).

Are you the [author](#) of this Elsevier journal article?