



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Instituto de Biologia

MARIENE RIBEIRO AMORIM

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE INATA DE PBMCS HUMANAS FRENTE À
INFEÇÃO PELO VÍRUS OROPOUCHE**

**EVALUATION OF THE INNATE IMMUNE RESPONSE OF HUMAN PBMCS TO
OROPOUCHE VIRUS INFECTION**

Campinas-SP

2019

MARIENE RIBEIRO AMORIM

AValiação da Resposta Imune Inata de PBMCS Humanas Frente a
Infecção pelo Vírus Oropouche

EVALUATION OF THE INNATE IMMUNE RESPONSE OF HUMAN PBMCS TO
ORPOUCHE VIRUS INFECTION

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas como parte dos
requisitos exigidos para a obtenção do título de
Mestra em Genética e Biologia Molecular, na área
de Microbiologia.

Dissertation presented to the Institute of Biology at
the State University of Campinas, in partial
fulfillment of the requirements to obtain the degree
of Master's in Genetics and Molecular Biology in
the Microbiology area.

Orientador: Prof. Dr. José Luiz Proença Módena

Este trabalho corresponde à versão final da
dissertação defendida pela aluna Mariene
Ribeiro Amorim, e orientada pelo professor
José Luiz Proença Módena.

Campinas-SP

2019

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

Am68a Amorim, Mariene Ribeiro, 1992-
Avaliação da resposta imune inata de PBMCs humanas frente a infecção por vírus Oropouche / Mariene Ribeiro Amorim. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: José Luiz Proença Módena.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Oropouche orthobunyavirus*. 2. Leucócitos mononucleares. 3. Imunidade natural. I. Módena, José Luiz Proença, 1979-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Evaluation of the innate immune response of human PBMCs to Oropouche virus infection

Palavras-chave em inglês:

Oropouche orthobunyavirus

Leukocytes, Mononuclear

Natural immunity

Área de concentração: Microbiologia

Titulação: Mestra em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

José Luiz Proença Módena [Orientador]

Eurico de Arruda Neto

Rafael Elias Marques Pereira da Silva

Data de defesa: 12-04-2019

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

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

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-8516-0155>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/3881030329301647>

COMISSÃO EXAMINADORA

José Luiz Proença Módena

Eurico de Arruda Neto

Rafael Elias Marques Pereira Silva

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

“Happiness can be found even in the darkest of times, if one only remembers to turn on the light”

J. K. Rowling

*Dedico esse trabalho ao meu pai João, por me dar
asas para voar, e a minha mãe Rosa, por não me
deixar cair.*

AGRADECIMENTOS

Desde criança sempre acreditei que todas as pessoas poderiam ser amigas e ajudar umas às outras, e que ser gentil é o melhor caminho para ser feliz. Dessa forma, gostaria de agradecer primeiramente à minha família, ao meu pai e minha mãe por me apoiarem desde os meus primeiros passos, e aos meus irmãos, minhas primas, tios e avós por dividirem comigo as felicidades e angústias durante esse processo. Vocês são os melhores amigos. Gostaria também de agradecer aos meus amigos que sempre me apoiaram e acreditaram que eu conseguiria finalizar esse trabalho, em especial a Crislaine, Adriely, Katharina, Tássia, Tâmara, Pedro Zeni, Aline, Victória, Camila, Alberto, ao Paulo e a Tati, ao querido Patrick, e mais recentemente, às queridas meninas da República Hellmann's e dos companheiros da Casa Jabuticabeira em Barão Geraldo. Agradeço aos queridos amigos e professores da Universidade Tiradentes em Aracaju, Sergipe, pelos ensinamentos sobre Biomedicina. Também sou grata aos meus professores da Universidade Estadual da Carolina do Norte nos Estados Unidos, onde fui bem recebida no laboratório dos professores Dennis Brown e Raquel Hernandez, iniciando a minha jornada no mundo da virologia durante a minha graduação. Foi essa oportunidade única que me direcionou ao professor José Luiz, a quem sou muito grata por ter me recebido e confiado a mim tarefas importantes, e dessa forma, fazer parte da família LEVE. Foi na Unicamp, com os meus amigos de bancada, que a minha fé na amizade e na gentileza se fortaleceu ainda mais. Sendo assim, agradeço a cada um deles, Daniel, Pierina, Karina, Aline, Gabe, Sté, Júlia, Manu e Débora, pelo companheirismo e pela forte parceria. Também gostaria de agradecer aos alunos de IC do laboratório pela força, e a nossa técnica Ana Lúcia pela sua dedicação e por cuidar de todos nós como se fossem seus filhos. Ao querido pós-doutor Matheus pelos abraços tranquilizantes e por ser tão doce e gentil, e ao pós-doutor Guilherme por ter sido um querido amigo e orientador de bancada. Também agradeço à professora Dr^a Silvia Gatti por acreditar em mim e pelas oportunidades de aprendizado únicas sobre virologia e sobre a vida, e a minha co-orientadora a Dr^a Renata Sesti Costa pela paciência, pelos ensinamentos e por me ajudar a entender melhor sobre imunologia. Por fim, agradeço aos laboratórios colaboradores desse trabalho, o Laboratório de Imunoinflamação e o Laboratório de Neuroimunomodulação, ao Fundo de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão (FAEPEX) processo nº 208/17, pelo fomento da minha bolsa de mestrado. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº 2016/00194-8 pelo fomento dos consumíveis e de toda a estrutura necessária para a realização desse projeto. Sou muito grata a todos vocês!

RESUMO

Vírus Oropouche (OROV) são vírus emergentes transmitidos por artrópodes que têm demonstrado grande potencial de disseminação e eficiência na transmissão. Fatores que facilitam sua dispersão incluem aumento da mobilidade e expansão dos sistemas de transporte, expansão da densidade populacional, desmatamento de florestas e mudanças na vegetação onde circulam os vetores virais. Os principais sintomas apresentados pela febre do Oropouche são cefaleia, mialgia, artralgia e exantema. Existem ainda relatos de pacientes que apresentaram sintomas hemorrágicos, ou complicações neurológicas associados à detecção de OROV. A modulação da resposta de monócitos e células dendríticas no início das infecções virais são eventos chaves para a progressão da infecção e desenvolvimento de doenças agudas e manifestações clínicas. Dessa forma, foi analisado nesse trabalho a capacidade de replicação e persistência de OROV em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) humanas, e a modulação da resposta imune gerada por essas células *in vitro*. Foi observado aumento da expressão de interferons do tipo I do tipo II e aumento na expressão de genes induzidos por Interferon, importantes na resposta antiviral, associado à diminuição gradativa da detecção de RNA viral. Apesar de componentes da resposta imune inata aparentemente conterem a infecção *in vitro*, foi observado por meio de RNA PrimeFlow™ e citometria de fluxo que genoma viral ainda pode ser encontrado no interior de monócitos e linfócitos, em pequenas quantidades, indicando a possibilidade dessas células servirem como cavalo de troia em microambientes específicos. Além disso, como nesse estudo foram utilizadas PBMCs de doadores saudáveis, não é improvável que OROV possam se replicar nessas células em casos de algum tipo de imunodeficiência.

Palavras-chave: Oropouche vírus, PBMC, resposta imune inata.

ABSTRACT

Oropouche virus is an emergent virus transmitted by arthropods that have demonstrated high potential of dissemination and transmission efficiency. Factors that facilitate its dispersion include increasing mobility, expansion of transport systems, expansion of population density, deforestation and changes in the vegetation where vectors of the virus circulate. The OROV fever major symptoms are headache, myalgia, arthralgia and exanthema. Also, there are reports of patients that showed hemorrhagic symptoms or neurological complications associated to OROV detection. The immune response modulated by monocytes and dendritic cells at the early moments of viral infection are key events to the progression of the infection, and to the development of acute diseases and late clinical manifestations during viral infections. Thus, in this work, were analyzed the capacity of replication and persistence of OROV in human peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), and the modulation of the immune response of these cells *in vitro*. It was observed an increase in the expression of type I and II Interferons (IFN), increasing the expression of Interferon-stimulated genes, in addition to a decrease in viral RNA detection. Recognition through TLR3 signaling pathway may be important, acting during a moment of the viral genome replication. Even though components of the innate immune response apparently contain the infection *in vitro*, it was observed, using RNA Prime Flow and flow cytometry techniques, that viral genome is still been found inside monocytes and lymphocytes in small quantities indicating the possibility of these cells serving as a trojan horse in specific microenvironments. In addition, once the cells used in these experiments were obtained from healthy donors, it is not unlikely that OROV can replicate in these cells in cases of some type of immunodeficiency.

Keywords: Oropouche virus, PBMC, innate immune response

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Região genômica alvo utilizada para o desenho das sondas de RNA.....	25
Figura 2. Representação esquemática do ensaio de RNA PrimeFlow™	25
Figura 3. Avaliação dos sinais gerados pelas sondas para genoma e anti-genoma.....	31
Figura 4. Detecção de replicação produtiva de OROV em células Vero	32
Figura 5. Marcação de genoma e anti-genoma de OROV pela metodologia de RNA PrimeFlow demonstra a formação de fábricas virais em associação com o Complexo de Golgi em células Vero após 18 horas de infecção.....	33
Figura 6. Expressão de IFN- β , IFN- γ e IFIT-1 em sangue total de humanos infectado com OROV <i>in vitro</i>	34
Figura 7. Avaliação do modelo de infecção <i>ex vitro</i> de sangue total de humanos com OROV por citometria de fluxo, com marcação para RNA viral.....	35
Figura 8. Análise de morte celular e início de apoptose em células HLA-DR+	36
Figura 9. Análise de morte celular e início de apoptose em populações de linfócitos.....	36
Figura 10. Cinética de replicação de OROV em PBMCs humanas isoladas	37
Figura 11. Cinética de replicação de OROV em células Jurkat e THP-1.....	38
Figura 12. Microscopia confocal de células Jurkat e THP-1 para detecção de genoma e anti-genoma de OROV por RNA PrimeFlow™	39
Figura 13. Detecção de genoma de OROV em populações de linfócitos e monócitos de humanos	40
Figura 14. Linfócitos e monócitos com marcação para genoma de OROV	41
Figura 15. Marcação de genoma viral em células mortas	41
Figura 16. Aumento da expressão de interferons na infecção de PBMCs por OROV <i>in vitro</i>	42
Figura 17. Infecção de PBMCs humanas por OROV <i>in vitro</i> modula a expressão de proteínas citoplasmáticas de reconhecimento de PAMPs	43
Figura 18. Expressão de ISGs em PBMCs de humanos infectadas <i>in vitro</i>	44

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
1.1	Vírus Oropouche, um arbovírus emergente	12
1.2	A febre do Oropouche.....	13
1.3	Resposta imune inata frente a vírus de RNA	15
2	JUSTIFICATIVA.....	18
3	OBJETIVOS.....	19
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4.1	Ética.....	20
4.2	Vírus e células	20
4.3	Amostras de sangue de doadores saudáveis	21
4.4	Cultura primária de PBMCs humanas.....	21
4.5	Infecção e cinética de replicação em linhagens celulares (Vero, Jurkat e THP-1).....	22
4.6	Infecção e cinética replicação de OROV em sangue total	22
4.7	Infecção e cinética de replicação de OROV em PBMCs	22
4.8	Quantificação viral por RT-qPCR.....	23
4.9	Titulação viral por ensaio de formação de foco infeccioso.....	23
4.10	Análise da viabilidade celular	24
4.11	Ensaio de RNA PrimeFlow™ para detecção de genoma e antígeno de OROV por citometria de fluxo.....	24
4.12	Ensaio de RNA PrimeFlow™ para detecção de genoma e antígeno de OROV por imunofluorescência.....	26
4.13	Análise da expressão de genes da resposta imune por qPCR SYBR Green	28
4.14	Análise dos resultados	29
5	RESULTADOS	30
5.1	Detecção de infecção viral produtiva de OROV a nível <i>single-cell</i> por citometria de fluxo por RNA PrimeFlow™	30
5.2	OROV não infecta leucócitos humanos usando um modelo de infecção <i>ex vivo</i> com sangue total	34
5.3	Monócitos e linfócitos humanos são susceptíveis, mas pouco permissivos, a infecção por OROV	37
5.4	Detecção de RNA viral em PBMCs a nível <i>single-cell</i>	39
5.5	Células de PBMCs respondem a infecção por OROV <i>in vitro</i> , induzindo a expressão de genes da resposta imune inata.....	42
6	DISCUSSÃO.....	45
7	CONCLUSÕES.....	51

8	ATIVIDADES COMPLEMENTARES	52
9	PUBLICAÇÕES NO PERÍODO	54
10	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55
11	ANEXOS.....	60
	11.1 Termo de bioética.....	60
	11.2 Declaração de direitos autorais.....	65

1 INTRODUÇÃO

1.1 Vírus Oropouche, um arbovírus emergente

As infecções causadas por vírus são um grande problema para a saúde pública global, levando à morte milhões de pessoas todos os anos. Entre as infecções virais aquelas causadas por arbovírus (vírus transmitidos por artrópodes) são importantes principalmente devido a emergência em países tropicais. Vírus emergentes são agentes novos ou já conhecidos associados a uma doença não descrita, ou pouco prevalente em uma determinada região geográfica, que podem causar desde surtos a epidemias (BURRELL et al., 2017). Entre os vírus emergentes de grande importância para a saúde pública mundial, os arbovírus da Dengue, da Encefalite Japonesa, da Doença do Oeste do Nilo, da Febre Chikungunya e da Febre Zika, sendo eles *Dengue virus* (DENV), *Japanese encephalitis virus* (JEV), *West Nile virus* (WNV), *Chikungunya virus* (CHIKV) e *Zika virus* (ZIKV) respectivamente, causam doenças com altos índices de mortalidade e morbidade que, e por muito tempo foram negligenciadas. Atualmente, *Oropouche orthobunyavirus* (OROV) e *Mayaro virus* (MAYV) são os arbovírus americanos apontados como candidatos a causarem grandes epidemias abrangendo territórios além da região Amazônica (MAVALANKAR, SHASTRI, BANDYOPADHYAY, PARMAR, & RAMANI, 2008; TRAVASSOS DA ROSA ET AL., 2017).

OROV são arbovírus emergentes com grande potencial de disseminação e eficiência na transmissão (LIANG; GAO; GOULD, 2015; TRAVASSOS DA ROSA et al., 2017). Fatores que facilitam a dispersão de arbovírus incluem aumento da mobilidade e expansão dos sistemas de transporte, expansão da densidade populacional, e, principalmente, desmatamento de florestas e mudanças na vegetação onde circulam os vetores virais. Um estudo realizado no Peru demonstrou a associação de surtos de OROV em áreas próximas a regiões que sofreram desmatamento, mostrando a relação entre a disseminação viral e interferências antropológicas (BASTOS et al., 2012; ROMERO-ALVAREZ; ESCOBAR, 2017, 2018). Desse modo, é importante apontar os dois ciclos de circulação de OROV. A princípio, o ciclo silvestre, onde animais como preguiças, primatas não-humanos, roedores e algumas aves são considerados potenciais reservatórios, e onde as espécies de mosquito *Coquillettidia venezuelensis* e *Aedes serratus* têm sido sugeridas como possíveis vetores. O ciclo pode se tornar urbano (*spillover*) devido aos fatores citados anteriormente, ocasionando

surtos da doença em humanos. No ciclo urbano, a mosca hematófaga *Culicoides paraensis* é o vetor de transmissão mais descrito (ROMERO-ALVAREZ; ESCOBAR, 2018).

Membro da família *Peribunyaviridae*, gênero *Orthobunyavirus*, *Oropouche orthobunyavirus* são vírus envelopados cujo genoma é formado por três segmentos de RNA de polaridade negativa. O segmento maior (L) codifica a RNA polimerase RNA dependente (RpRd), responsável pela transcrição e replicação do genoma viral. O segmento médio (M) codifica uma poliproteína que dá origem às glicoproteínas de envelope Gc e Gn, e uma proteína não estrutural NSm. Já o segmento menor (S) codifica abundantemente as proteínas do nucleocapsídeo, importantes no processo de montagem e proteção das fitas de RNA contra degradação (ELLIOTT, 2014). Detalhes ultraestruturais e do ciclo viral em células humanas ainda são escassos, porém foi demonstrado que a entrada dos vírus nas células susceptíveis depende de endocitose em vesículas recobertas de clatrina (SANTOS et al., 2008) e que a formação dos sítios de replicação viral ocorrem associação com o complexo de Golgi, num fenômeno dependente da maquinaria de ESCRT, essencial também para o brotamento de novas partículas para o meio extracelular (BARBOSA et al., 2018). Já foi observado também a capacidade de OROV em induzir apoptose em células HeLa infectadas *in vitro* após 24 horas de infecção, por meio da ativação de caspases 3 e 9, processo que envolve ativação mitocondrial e expressão de proteínas virais (OLSZANSKI et al., 2010).

1.2 A febre do Oropouche

Até a introdução dos vírus Zika e Chikungunya, a infecção por OROV era considerada a segunda arbovirose mais frequente do Brasil depois da Dengue. Já foram registrados mais de 30 surtos, somando mais de 500.000 casos na região Amazônica brasileira, Peru, Panamá, e Trindade e Tobago, desde quando foi notificado pela primeira vez em humanos, na década de 1960. As manifestações clínicas das infecções por arbovírus nem sempre são óbvias e costumam durar entre 1 a 2 semanas, quando são resolvidas espontaneamente. Em alguns casos, entretanto, podem ocorrer sintomas mais graves, causando também danos nos âmbitos econômico e social. Os principais sintomas apresentados pela febre do Oropouche são cefaleia, mialgia, artralgia e exantema. Apesar de casos de OROV recentemente relatados em regiões afastadas da região amazônica, como São Paulo e Bahia, o número exato de casos não é totalmente conhecido devido principalmente à grande similaridade dos sintomas da febre do Oropouche com aqueles de outras doenças de caráter

febril, assim como a falta de testes rápidos de diagnóstico (ROMERO-ALVAREZ & ESCOBAR, 2018; TRAVASSOS DA ROSA ET AL., 2017).

Além dos sintomas típicos, há relatos de complicações clínicas associadas à infecção por OROV, principalmente aquelas com caráter hemorrágico ou neurológico (BASTOS et al., 2012; ROMERO-ALVAREZ; ESCOBAR, 2018). Ainda que protegido por barreiras celulares complexas alguns vírus são capazes de alcançar o sistema nervoso central (SNC) causando morte neuronal e inflamação no cérebro, em um fenômeno que pode depender de eventos danosos associados à replicação viral e à ação do sistema imunológico do hospedeiro. A depender da região afetada, meninges ou cérebro, a condição patológica pode ser classificada como meningite ou encefalite, respectivamente. Se ambas as regiões são afetadas, tem-se um caso de meningoencefalite. Já foram descritos mais de 100 vírus capazes de alcançar o SNC e causar complicações neurológicas (DAHM et al., 2016; JACKSON, 2014; KOYUNCU; HOGUE; ENQUIST, 2013).

Os mecanismos de neuroinvasão são geralmente complexos e variam de acordo com o modelo animal da infecção. Esses mecanismos englobam desde a infecção de células endoteliais, com liberação de partículas virais em direção ao SNC, transcitose de partículas virais circulantes na corrente sanguínea por células endoteliais em direção ao SNC, até a ruptura das junções oclusivas pela ação de citocinas vasoativas, como o fator de necrose tumoral (TNF- α), ou por células sanguíneas infectadas circulantes que migram em direção ao SNC por entre as células endoteliais, num fenômeno conhecido como cavalo de Tróia (DENIZOT; NEAL; GASQUE, 2012; WANG et al., 2004). Outras vias de neuroinvasão envolvem o transporte retrógrado de partículas virais por neurônios periféricos ou cranianos, até atingir o SNC, ou mesmo o acesso direto de partículas virais pelo endotélio fenestrado no plexo coróide (PAPANERI, 2010; SCHÄFER et al., 2011).

As razões associadas com o desenvolvimento de complicações neurológicas em humanos decorrentes da infecção por OROV não são totalmente entendidas. Mas há, de fato, alguns estudos que relatam a detecção de genoma de OROV por RT-qPCR e sequenciamento em fluido cefalorraquidiano de pacientes com meningoencefalite, algumas vezes em associação com quadros de imunossupressão, como em pacientes infectados com os vírus da imunodeficiência humana (HIV) (BASTOS et al., 2012; VERNAL; MARTINI; FONSECA, 2019). Além disso, outros membros da família *Peribunyaviridae* causam complicações neurológicas frequentes em seres humanos, como os vírus La Crosse (LACV), sorogrupo encefalite da Califórnia e Jamestown Canyon (JACKSON, 2014). Entretanto, as vias de acesso ao SNC por OROV ainda não foram totalmente elucidadas, mas experimentos em

camundongos mostram que elas podem englobar o transporte retrógrado ascendente, como visto em modelo de animais neonatos (SANTOS et al., 2012), como o transporte por células imunes infectadas (células dendríticas e linfócitos), especulado em modelo de camundongo imunossuprimido, deficiente do fator de transcrição IRF-5 (PROENCA-MODENA et al., 2015)..

Por fim, a resposta imune eficiente do hospedeiro é importante frente a agentes que podem causar infecção no SNC, como LACV e ZIKV, e coinfeções ou patologias prévias que danifiquem a barreira hematoencefálica podem favorecer que os vírus alcancem o SNC, como WNV (BASTOS et al., 2012; DENIZOT; NEAL; GASQUE, 2012; SUTHAR; DIAMOND; GALE, 2013; TAYLOR; PETERSON, 2014).

1.3 Resposta imune inata frente a vírus de RNA

Ao alcançar um hospedeiro, os vírus, assim como outros patógenos, encontram barreiras que limitam ou mesmo impedem o estabelecimento da infecção. Após invasão, o principal fator limitante que impede a disseminação dos vírus no organismo é a formação de uma resposta generalista, que leva à produção de interferons (IFN), chamada corriqueiramente de resposta imune inata. Essa resposta depende do reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) por variadas famílias de proteínas que atuam como receptores de reconhecimento padrão (PRRs) (ELLIOTT; WEBER, 2009; HALLER; KOCHS; WEBER, 2006; HAMEL et al., 2015).

Os genomas de RNA dos arbovírus da família *Peribunyaviridae*, assim como outros vírus, são reconhecidos por receptores associados à membranas, que podem ser receptores do tipo Toll (TLR), como TLR3, TLR7 e TLR8, ou receptores citoplasmáticos como os receptores do tipo RIG (RLRs), como por exemplo o RIG-I (gene I induzido por ácido retinóico) e o MDA5 (gene 5 associado a diferenciação de melanoma) (ELLIOTT; WEBER, 2009; HALLER; KOCHS; WEBER, 2006; HAMEL et al., 2015). Após o reconhecimento do RNA exógeno, inicia-se uma cascata de sinalização a partir dos PRRs, resultando na ativação de fatores de transcrição como os fatores 3 e 7 de resposta ao interferon (IRF3 e IRF7) e NF- κ B, o que leva por sua vez a expressão de Interferon (IFN) do tipo I e III, que inclui IFN- α , IFN- β e IFN- λ . Os IFNs recém-sintetizados agem de maneira autócrina e parácrina pela ligação a receptores de membrana, o que ativa a via de sinalização JAK/STAT resultando na indução da expressão de centenas de genes induzidos por IFN (ISGs). A expressão desses genes leva a um estado antiviral capaz de restringir a replicação de diferentes

vírus tanto na célula infectada como nas células vizinhas, dando início também à modulação da resposta imune adaptativa (HALLER; KOCHS; WEBER, 2006).

Os PRRs são expressos pela maioria das células do corpo humano, porém as células dendríticas (DCs) e fagócitos expressam essas proteínas em maior quantidade e variedade, sendo, portanto, essenciais no reconhecimento e combate a vírus. Eventos precoces durante uma infecção por arbovírus, como a resposta mediada pelas DCs, são determinantes para os eventos posteriores e o resultado clínico da infecção (SUTHAR; DIAMOND; GALE, 2013). As DCs são células altamente capacitadas em reconhecer PAMPs, devido à alta expressão de uma variedade de moléculas de reconhecimento, como os TLRs, RLRs e os sensores de DNA no citosol. Além disso são essenciais no combate às infecções virais devido a elevada produção de IFN tipo I, IFN- α e IFN- β , por células dendríticas plasmocitóides (pDCs) (ABBAS; SHARPE, 2005; MELLMAN, 2013).

Após uma avaliação do transcriptoma de DCs provenientes de três doadores naturalmente infectados por ZIKV e de DCs derivadas de monócitos e infectadas *in vitro*, foi possível observar que ZIKV, da linhagem asiática, modulam a resposta imune mediada por essas células, diminuindo a expressão de genes de IFN tipo I, TLRs, NF- κ B e CD80 (SUN et al., 2018). Em um outro estudo realizado com ZIKV, foi demonstrado a capacidade do vírus infectar monócitos do sangue periférico, influenciando no posterior desenvolvimento de resposta anti-inflamatória ou pró-inflamatória (FOO et al., 2017).

Além disso, o desbalanço de células apresentadoras de antígenos no início da infecção por membros da ordem *Bunyavirales*, por características genéticas ou ambientais, pode contribuir para defeitos na maturação e diferenciação de linfócitos B, levando ao desenvolvimento de complicações clínicas tardias (SONG et al., 2018). Assim, o estudo da infecção de OROV em células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) pode nos trazer informações importantes sobre a patogênese desses vírus, principalmente no que diz respeito a vias que são ativadas no início da infecção e a possível utilização de células circulantes como fontes de infecção do SNC, pelo mecanismo de disseminação por cavalo de Tróia. Hoje, sabe-se que produção de IFN tipo I associado à ativação de IRF7 e IRF3, via sinalização pela proteína estimuladora 1 do IFN- β (MAVS) ativada por RNA helicases, é de grande importância no controle da infecção por OROV em camundongos. Sabe-se também que a ausência de MAVS, IRF7, IRF3 e da resposta mediada por IFN, facilita a infecção de DCs nesses animais (PROENCA-MODENA et al., 2015).

A persistência viral em leucócitos do sangue periférico pode fazer dessas células verdadeiros reservatórios virais, com o potencial de carregar vírus para diferentes sítios

anatômicos em momentos específicos, como ocorre durante casos de encefalite causados por HIV, inclusive em casos de infecção viral não produtiva. Portanto, muitos estudos têm sido desenvolvidos para investigar os mecanismos envolvidos com a replicação e persistência viral em PBMCs e a sua associação com complicações tardias, como observado para WNV e, mais recentemente, ZIKV (DAHME et al., 2016; DIAMOND; FARZAN, 2013; FOO et al., 2017; MINER; DIAMOND; PROGRAMS, 2017; PROENCA-MODENA et al., 2018).

Em seres humanos foi observada a presença de proteínas virais de OROV associadas a células imunológicas do sangue periférico, em esfregaços obtidos de pacientes naturalmente infectados em momento de pico febril e durante episódios de recorrência (LUNA et al., 2017), sugerindo que algumas dessas células poderiam estar sendo infectadas por OROV na fase aguda da doença ou durante a recuperação. Assim, acreditamos que o entendimento dos efeitos da replicação e da persistência de OROV em células do sistema imunológico humano, e da resposta imune inata frente a esse vírus, é crucial para o entendimento da sua patogênese.

2 JUSTIFICATIVA

OROV são vírus emergentes com grande impacto em nosso país. A modulação da resposta de monócitos e células dendríticas no início da infecção são eventos chaves para a progressão da infecção e desenvolvimento de doenças agudas e manifestações clínicas tardias. Além disso, as rotas de infecção do SNC podem incluir infecção de células do sangue periférico, as quais poderiam atuar como veículo de disseminação viral para diferentes sítios anatômicos. Dessa forma, esse trabalho buscou avaliar a capacidade de replicação e persistência de OROV em PBMCs humanas, além de caracterizar a modulação da resposta imune gerada por essas células *in vitro*, principalmente decorrentes da expressão de componentes chaves da resposta imune inata, como IFN tipo 1, ISGs, PRRs e proteínas sinalizadoras. Para tanto, foram obtidas amostras de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de doadores saudáveis as quais foram infectadas *in vitro*. Essas células foram utilizadas para ensaios de hibridização de RNA e citometria de fluxo para determinar quais células são infectadas por meio de uma metodologia recente de detecção de RNA viral denominada RNA PrimeFlow™ (*RNA-Flow*). Esse processo combina hibridização *in situ* de sondas específicas e a tecnologia de *branched DNA* (bDNA), gerando amplificação do sinal e uma detecção mais específica. Desse modo, a presente dissertação é um estudo exploratório que pode abrir novas linhas de investigação sobre a patogênese de OROV em humanos.

3 OBJETIVOS

O presente estudo teve como objetivo determinar o papel da replicação e persistência de OROV em células mononucleares do sangue periférico humano (PBMCs) e a consequência desse fenômeno para a patogênese e evolução clínica da doença. Para atingir esse objetivo, foi necessário:

- Padronizar a metodologia de RNA PrimeFlow™ em células de linhagem susceptível e permissiva como as células Vero, para o desenvolvimento de um método de detecção de infecção produtiva por OROV, e rastreamento a nível *single-cell*.
- Determinar a capacidade de OROV de infectar células de PBMC de doadores saudáveis, a partir de infecções *in vitro*.
- Determinar a capacidade de OROV de infectar células de linhagens imortalizadas de linfócitos T, Jurkat, e monócitos, THP-1.
- Caracterizar quais células dentre as PBMCs são produtivamente infectadas por OROV a partir de infecções *in vitro* usando a metodologia de RNA PrimeFlow™ com as sondas para detecção de genoma e anti-genoma padronizadas.
- Determinar o efeito da infecção por OROV em PBMCs em relação à expressão de genes da resposta imune inata *in vitro*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Ética

A presente pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual de Campinas sob o número CAAE 89082718.5.0000.5404 (em anexo).

4.2 Vírus e células

A presente pesquisa foi desenvolvida usando OROV BeAn19991, gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Luiz Tadeu Morais Figueiredo, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo.

Foram utilizadas as seguintes linhagens celulares: Vero ATCC CCL81 (células de rins de macaco-verde africano), C6/36 ATCC CRL 1660 (células de mosquito *Aedes albopictus*). Para a produção dos estoques virais, foram utilizadas células de macaco-verde africano (Vero), células THP-1 ATCC TIB-202 (células monócitos de humanos) e Jurkat ATCC TIB-152 (células de linfócitos de humanos).

As células C6/36 foram cultivadas em meio Leibovitz (SIGMA-ALDRICH), com 1% Penicilina-estreptomicina (10000UI/mL penicilina e 200 mM de estreptomicina) (SIGMA-ALDRICH) e incubadas a 28°C. Já as células Vero CCL81 foram cultivadas em meio MEM (*Earle's Minimum Essential Medium*) (SIGMA-ALDRICH) enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Vitrocell), 1% Penicilina/estreptomicina (10000UI/mL penicilina e 200 mM de estreptomicina) (SIGMA-ALDRICH) (SIGMA-ALDRICH), incubadas a 37°C em atmosfera de 5% CO₂. Por fim, as células THP-1 e Jurkat foram cultivadas em meio RPMI 1640 (SIGMA-ALDRICH) suplementado com 10% de SFB e 1% penicilina/estreptomicina, incubadas a 37°C com 5% de CO₂.

Para obtenção dos estoques mãe de OROV, 500 µL do estoque viral de passagem 4 obtido do Prof. Tadeu Figueiredo, o equivalente a aproximadamente 5×10^5 unidades formadoras de foco (UFF), foram inoculados em garrafas de 25cm³ com células C6/36 em 3mL de meio Leibovitz com 1% Penicilina/estreptomicina até o aparecimento de efeito citopático (ECP), 84 horas pós infecção, aproximadamente. Em seguida, todo conteúdo da garrafa foi coletado, distribuídos em criotubos, rapidamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C. Para a utilização do estoque, cada criotubo foi descongelado e centrifugado a 10.000 x g por 5 minutos para clarificação.

Esse estoque mãe foi utilizado para obtenção dos estoques de uso de OROV, os quais foram obtidos a partir da infecção em células Vero em meio MEM sem soro. Para tanto,

1 mL do estoque mãe foi utilizado para infecção de uma garrafa de cultura de 175 cm², contendo monocamada de células em aproximadamente 80% de confluência, contendo 15 mL de meio sem soro. O conteúdo foi coletado após aparecimento de ECP, aproximadamente 24 a 30 horas depois da infecção. Todos os experimentos realizados a seguir foram feitos usando o estoque de uso de OROV, tanto para os experimentos de infecção em células Vero, como durante as infecções em THP-1, Jurkat e PBMCs, sempre em condições sem SFB.

4.3 Amostras de sangue de doadores saudáveis

Doadores saudáveis que concordaram em participar do estudo e que assinaram termos de consentimento, foram recrutados para o Laboratório de Estudos de Vírus Emergentes (LEVE), do Instituto de Biologia da Unicamp, onde foi feita a coleta de 9 mL de sangue periférico em tubo com heparina, após garroteamento e punção venosa. Foram coletadas amostras de indivíduos com idade entre 18 e 30 anos. Não foram incluídos no estudo indivíduos que tiveram doença de caráter febril nos últimos dois meses, ou que estivessem fazendo uso de medicamentos antimicrobianos ou anti-inflamatórios.

4.4 Cultura primária de PBMCs humanas

Amostras coletadas de doadores saudáveis foram submetidas ao gradiente de Ficoll-Paque (GE Healthcare) 1.077 g/ml, para obtenção de PBMCs segundo o protocolo do fabricante, com algumas modificações. Sangue total foi diluído com meio RPMI 1640 (SIGMA), livre de soro, na proporção 1:1. Em seguida, o sangue diluído foi adicionado cuidadosamente a tubos Falcon (NEST) contendo Ficoll-Paque na proporção 1:1 de Ficoll para o volume inicial de sangue total, de modo que a amostra diluída ficasse sob o Ficoll. Os tubos foram centrifugados por 35 minutos a 300 x g em temperatura ambiente. Após a centrifugação, foi coletada a camada referente às PBMCs que foi adicionada a um novo tubo. As células foram lavadas duas vezes com PBS 1x, com centrifugações a 400 x g, por 10 minutos em temperatura ambiente, e em seguida foram ressuscendidas em meio RPMI 1640 suplementado com 1% de Penicilina/estreptomicina (SIGMA-ALDRICH). As células viáveis em suspensão foram contadas com Azul de Tripán 0.4% (SIGMA) na proporção 1:10, em câmara de Neubauer, e cultivadas em placas de poliestireno com meio RPMI descrito acima, a 37 °C, 5% CO₂.

4.5 Infecção e cinética de replicação em linhagens celulares (Vero, Jurkat e THP-1)

Para caracterizar a cinética de replicação de OROV em células Vero, Jurkat e THP-1, aproximadamente 2×10^5 células/mL em placas de seis poços foram infectadas com diferentes MOIs de 0,1, 1 e 10, seguido de centrifugação a $200 \times g$, a 32°C por 10 minutos (DOHERTY; SWIGGARD, 2000). Essas células foram incubadas por 2 a 4 horas a 37°C com 5% CO_2 e lavadas duas vezes com PBS1x, após centrifugação a 400 rpm por 5 minutos. As células foram então mantidas nos respectivos meios de cultura a 37°C com 5% CO_2 e as coletas de células e sobrenadantes foram realizadas nos tempos de 0, 6, 12, 24 e 48 horas pós infecção. Os sobrenadantes foram rapidamente congelados em nitrogênio líquido, enquanto as células foram ressuspensas em TRIzol e armazenadas a -80°C , para extração de RNA.

4.6 Infecção e cinética replicação de OROV em sangue total

Esse ensaio foi realizado para tentar mimetizar, ao menos parcialmente, as condições em que ocorrem a infecção por OROV em humanos. O sangue total coletado foi diluído em uma proporção de 1:1 em meio de cultura RPMI 1640 com L-glutamina (CORNING), 1% Penicilina/estreptomicina e 1% mM piruvato, em tubos Falcon de 50 mL. As amostras foram infectadas com MOI (do Inglês *Multiplicity of Infection*) entre 0.1 e 0.3, não sendo possível determinar o valor exato. Também foram feitos os controles não infectados de cada doador, contendo apenas o sangue diluído e o veículo do vírus, ou seja, sobrenadante de células não infectadas. Os tubos foram incubados a 37°C sob agitação intermitente de $400 \times g$ (BOWEN et al., 2017). As coletas de 1 mL dessa mistura para quantificação de OROV por RT-qPCR foram realizadas após os tempos 0, 2, 4, 12, 24, 36, 48, 60 e 72 horas pós infecção.

4.7 Infecção e cinética de replicação de OROV em PBMCs

PBMCs obtidas como descrito anteriormente foram semeadas em placas de poliestireno de 12 poços, com 2×10^5 células por poço, contendo meio RPMI 1640 (SIGMA) e 1% Penicilina/estreptomicina. Essas células foram então infectadas com diferentes MOIs, de 0,1, 1 a 10. Após duas horas de infecção, as placas foram centrifugadas a $400 \times g$ por 5 minutos. O meio contendo vírus foi retirado e as células foram lavadas com PBS 1x e centrifugadas novamente a $400 \times g$ por 5 minutos, desprezando o sobrenadante. Em seguida, foi adicionado meio RPMI 1640 (SIGMA) com 1% Penicilina/estreptomicina (10000UI/mL penicilina e 200 mM de estreptomicina) (SIGMA-ALDRICH), e incubadas a 37°C , 5% CO_2 . Foram coletados os sobrenadantes e células nos tempos 0, 6, 12, 24 e 48 horas pós-infecção.

As células foram coletadas em 300 uL de Trizol® (Invitrogen) e armazenadas a -80°C. Já os sobrenadantes foram aliqüotados em microtubos, rapidamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados a -80°C.

4.8 Quantificação viral por RT-qPCR

Para quantificação de genoma viral pós infecção de sangue total, foi realizado extração de RNA com o *QIAamp RNA blood Mini Kit* (QIAGEN). Já para a extração de RNA de PBMCs, e das demais linhagens celulares infectadas, foi utilizado TRIZOL® (Invitrogen), seguido do acréscimo de clorofórmio (SIGMA). A fase aquosa (superior) foi então utilizada para a purificação do RNA utilizando *PureLink™ RNA Mini Kit* (Invitrogen) seguindo as orientações do fabricante. Para extração de RNA dos sobrenadantes das culturas, foi utilizado *PureLink™ Viral RNA/DNA Mini Kit* (Invitrogen), segundo as indicações do fabricante.

Para a detecção molecular de OROV foi utilizado *TaqMan® Fast Virus 1-Step Master Mix* (Applied Biosystems), utilizando os oligonucleotídeos e sondas específicos (SIGMA- ALDRICH). Em resumo, utilizou-se 2 µL do RNA, 1 µL de cada iniciador, 0.5 µL de sonda, 3 µL do Mix de enzima e tampão. A reação de transcriptase reversa foi realizada a 50°C por 5 minutos mais 95°C por 20 segundos, a amplificação do produto ocorreu em 45 ciclos de desnaturação a 95°C por 5 segundos e o anelamento-extensão a 60°C por 30 segundos. As sequências de oligonucleotídeos utilizadas para OROV foram *forward* 5'-TACCCA GATGCGATCACCAA-3'; *reverse* 5'-TTGCGTCACCATCATTCCAA-3'; sonda 5'-/FAM/ TGCCTTTGGCTGAGGTAAAGGGCTG/36-TAMSp/-3' (PROENCA-MODENA et al., 2015).

4.9 Titulação viral por ensaio de formação de foco infeccioso

Para avaliar a quantidade de partículas virais infecciosas produzidas nos ensaios foram realizados ensaios de formação de foco infeccioso (UFF). Para tanto, foram utilizadas células Vero em placas de 96 poços. Foram feitas diluições de 10⁻¹ a 10⁻⁸ dos sobrenadantes coletados nas cinéticas, e de cada diluição foi retirada uma alíquota de 100 uL e adicionada à monocamada de células. Foram feitas triplicatas das diluições de cada tempo das cinéticas. As placas foram incubadas a 37° e 5% CO₂ por duas horas. Em seguida, foram adicionados 125 uL por poço de meio semissólido constituído por MEM 2x, carboxymetilcelulose 1,5% (CMC), SFB 4% e Penicilina/estreptomicina 2%. Após a adição do meio semissólido aos poços obteve-se uma concentração final de MEM 1x, CMC 0.75%, Penicilina/estreptomicina 1% e SFB 2%. A placas foram novamente incubadas a 37°C, 5% CO₂, por 36 horas. Após esse

período, as placas foram fixadas, acrescentando 70 μL de paraformaldeído (SIGMA-MERK) 1% em cada poço, e incubadas a 4°C até o momento da revelação.

Para revelação dos focos, o meio semissólido foi retirado e os poços foram lavados com PBS 1x, duas vezes. Foi preparado tampão de permeabilização 1x contendo PBS 1x, BSA 0.1% (SIGMA) e Triton X-100 0,1% (SIGMA-MERK). As placas foram lavadas com tampão de permeabilização 1x três vezes antes da adição de 50 μL de anticorpo primário policlonal anti-OROV (ATCC) na proporção 1:1000. As placas foram então mantidas sob agitação intermitente por 2 horas, em temperatura ambiente. Em seguida foram novamente lavadas com tampão de permeabilização 1x, e foram acrescentados 50 μL do anticorpo secundário anti IgG de camundongo conjugado com peroxidase (SIGMA-ALDRICH) na proporção 1:2000. A leitura foi realizada pela presença de focos de coloração azul após revelação com o substrato para peroxidase TrueBlue (KPL), seguindo instruções do fabricante.

Em todas as placas foram incluídos poços para o controle negativo das cinéticas, os quais não contêm vírus, para o controle do ensaio com apenas anticorpo secundário e poços para o controle de células.

4.10 Análise da viabilidade celular

PBMCs obtidas pós infecção do sangue total foram utilizadas para marcação para Anexina V (BioLegend) e Iodeto de propídio (PI) (BioLegend), com intuito de avaliar início de apoptose e morte celular, respectivamente. Foram adicionados 4 μL de Anexina V e 2 μL de PI à suspensão de 4×10^6 células/mL, as quais foram incubadas no escuro a 4°C durante 30 minutos. As células foram lavadas com tampão de citometria (PBS 1x com 2% SFB), sendo descartado o sobrenadante, e o *pellet* ressuscitado em 100 μL do volume residual. Em seguida, para a marcação das células, foram utilizados 4 μL dos anticorpos de superfície HLA-DR PerCp, CD11c APC, CD3 Alexa Fluor 700, CD3 V500, CD19 Alexa Fluor 700, CD8 APC-Cy7, CD20 APC, CD14 PerCp-Cy5.5, CD16 PE (BD Horizon). As células foram incubadas 20 minutos no escuro, a 4°C. Por fim, foram acrescentados mais 200 μL de tampão. Foi utilizado o citômetro BD FACSVerser para a aquisição.

4.11 Ensaio de RNA PrimeFlow™ para detecção de genoma e antígeno de OROV por citometria de fluxo

A fim de encontrar uma ferramenta que permitisse a detecção de infecção viral produtiva e persistente de OROV, foi padronizada a metodologia de hibridização de sondas de RNA, utilizando os reagentes e protocolo de *RNA PrimeFlow Assay™* (Invitrogen), na qual

são utilizadas sondas de RNA para identificação de seqüências de RNA específicas, seguido de cadeias de hibridizações que culminam na amplificação de um sinal de fluorescência. A região do genoma viral escolhida para o desenho das sondas foi a do segmento L, o mais extenso. Foi solicitada à empresa responsável, associada a venda do kit, a produção de sondas para hibridização com genoma e anti-genoma virais (Figura 1).

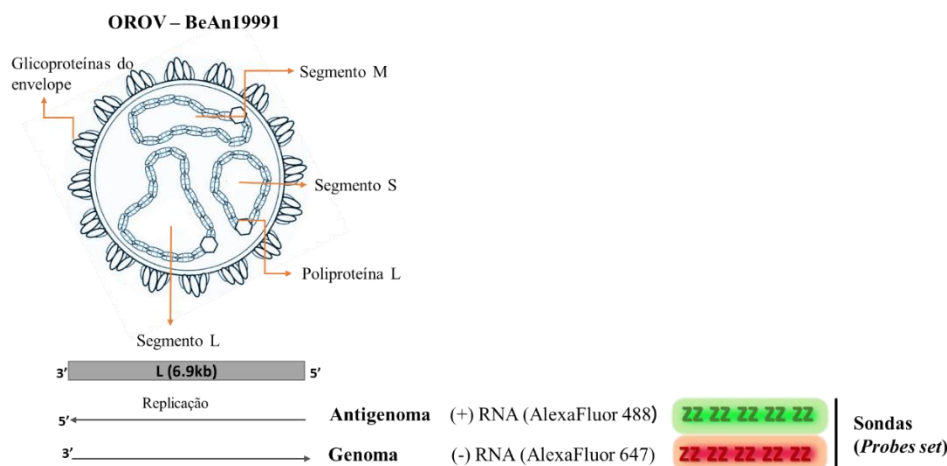


Figura 1. Região genômica alvo utilizada para o desenho das sondas de RNA. OROV possuem genoma de RNA senso negativo tri segmentado. Entre os segmentos (L, M e S), o segmento L é o mais extenso, possuindo cerca de 6.9 kb. Foram desenhadas sondas de RNA com alvos nos sentidos senso e anti-senso, a fim de identificar tanto genoma quanto anti-genoma virais. As sondas para o genoma estão relacionadas à marcação com Alexa Fluor 647, enquanto as sondas para o anti-genoma estão relacionadas à marcação com Alexa Fluor 488.

A validação do ensaio foi feita pós infecção em células Vero com MOIs 1 e 10, durante os tempos de 0, 2, 6, 12, 24 e 48 horas pós infecção, como descrito anteriormente. Após coleta, as células foram tripsinizadas, lavadas 2 vezes com PBS 1x e submetidas ao protocolo do fabricante, basicamente dividido em quatro etapas: I - fixação e permeabilização; II – hibridização das sondas; III – pré-amplificação e, IV- amplificação do sinal (Figura 2). As células foram então adquiridas no citômetro BD FACSVersé.

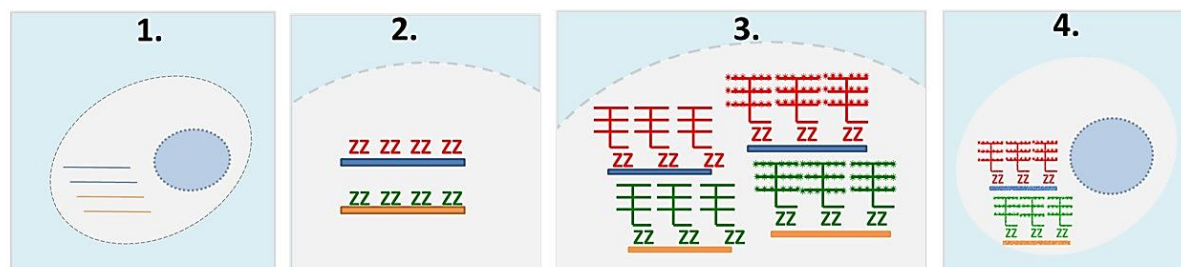


Figura 2. Representação esquemática do ensaio de RNA PrimeFlow. Para detecção de genoma e anti-genoma de OROV foram elaboradas as sondas (-)RNA-AF647 e (+)RNA-AF488 respectivamente. Após fixação e permeabilização das amostras de células (1), as sondas são adicionadas para hibridização (2). Em seguida, ocorre o processo de pré-amplificação, onde as moléculas pré-amplificadoras hibridizam especificamente em uma região alvo das sondas. Logo após são adicionados os amplificadores específicos, que hibridizam com regiões alvo dos pré-amplificadores e, por fim, são acrescentadas as sondas fluorescentes (3), as quais amplificam os sinais detectados nos canais AF647/APC e AF488/FITC. Por fim, as células estão prontas para serem adquiridas no citômetro (4).

de sangue total e infecção de PBMCs isoladas, utilizando MOI=1 e 3 em tempos que variaram de 0, 12 a 24 horas pós infecção. Nesses ensaios, antes da etapa de hibridização, as células foram marcadas com anticorpos de superfície. Foram preparados coquetéis com os anticorpos CD14 FITIC, HLA-DR APC-H7, CD3 V500, CD19 PE CF594 (BD Biosciences). As células foram incubadas com os anticorpos de superfície durante 30 minutos, a 4°C e no escuro. Após a marcação, foram realizadas duas lavagens com tampão de citometria, a 500 x g, por 5 minutos. Em seguida, as células foram submetidas ao protocolo de hibridização das sondas, de acordo com o fabricante. A leitura foi feita em BD FACSVerse (BD Biosciences) do Instituto de Biologia da Unicamp.

4.12 Ensaio de RNA PrimeFlow™ para detecção de genoma e antígeno de OROV por imunofluorescência

O método de RNA PrimeFlow™ foi adaptado a fim de ser aplicado em ensaios de imunofluorescência. A adaptação foi realizada de duas maneiras: a) realização do ensaio com as células em micro tubos ($2-4 \times 10^6$ células), de acordo com o fabricante, porém incluindo uma etapa de marcação com anticorpos secundários descritos a seguir, sendo estas, ao final do processo, adicionadas a lamínulas tratadas com polilisina; b) cultivo de células aderidas à lamínulas em placas de 24 poços contendo uma lamínula por poço, as quais foram submetidas a um protocolo do RNA PrimeFlow™ adaptado. Foi utilizado anticorpo policlonal anti-OROV de fluido ascítico (ATCC) para marcação de proteínas virais. Em alguns ensaios também foram incluídos anticorpo anti-TNG46, proteína presente no complexo de Golgi. Os anticorpos secundários utilizados foram IgG anti-camundongo conjugado com Alexa Fluor 594, IgG anti-ovelha conjugado com Alexa Fluor 647 e IgG anti-ovelha conjugado com Alexa Fluor 594.

Na segunda versão (b), foi necessário adaptar todos os volumes do protocolo original. Resumidamente:

1. As lamínulas foram lavadas com PBS 1x. Em seguida foi realizada a marcação com anticorpo primário anti-OROV (ATCC) diluído 1:50, sendo as lamínulas incubadas a 4°C por 1 hora.
2. As lamínulas foram lavadas com PBS 1x, e foram adicionados 20 µL do tampão fixador 1. Em seguida as lamínulas foram incubadas novamente a 4°C por 1 hora. Após a incubação, o excesso de tampão foi retirado.
3. Foram realizadas três lavagens com 20 µL de tampão de permeabilização.

4. Foram adicionados 20 μL de anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa Fluor 594, diluído 1:1000 em tampão de permeabilização. As lamínulas foram incubadas a 4°C por 30 minutos.
5. As lamínulas foram lavadas 2x com 50 μL de tampão de lavagem (*Wash Buffer*), retirando o excesso. Em seguida, foram adicionados 50 μL de tampão de lavagem contendo inibidor de RNase 1:100 a cada lamínula e estas foram incubadas *overnight*.
6. Foram cuidadosamente descartados 30 μL do tampão e adicionados 20 μL de solução contendo as sondas de RNA, diluídas 1:20 em tampão específico do *kit*. As lamínulas foram incubadas dentro de placa de 24 poços vedada com parafilme, em banho-maria a 40°C por 2 horas.
7. Foram realizadas cinco lavagens com 50 μL de tampão de lavagem. Foi retirado o excesso e, em seguida, foram adicionados 20 μL de tampão específico contendo as moléculas pré-amplificadoras juntamente com 20 μL de tampão de lavagem contendo inibidor de RNase. A placa foi incubada em banho-maria a 40°C, por uma hora e meia.
8. Foram realizadas cinco lavagens com 50 μL de tampão de lavagem. Foi retirado o excesso e, em seguida, foram adicionados 20 μL de tampão específico contendo as moléculas amplificadoras, juntamente com 20 μL de tampão de lavagem contendo inibidor de RNase. A placa foi incubada em banho-maria a 40°C, por uma hora e meia.
9. Foram realizadas cinco lavagens com 50 μL de tampão de lavagem. Foi retirado o excesso e, em seguida, foram adicionados 20 μL das sondas fluorescentes (*Label probes*) diluídas a 1:100 de tampão específico do *kit*.
10. Foram realizadas cinco lavagens com 50 μL de tampão de lavagem, retirado o excesso, sendo realizada uma etapa extra de lavagem com PBS 1x. Em seguida as lamínulas foram incubadas na geladeira, protegidas da luz.
11. Por fim, foram montadas lâminas de microscopia com solução de montagem contendo DAPI (Abcam ab104139ml20).

O protocolo (a) foi realizado com células Jurkat e THP-1 infectadas com OROV, MOI 1. O protocolo (b) foi feito com células Vero CCL81 também infectadas com OROV, MOI 1. As células foram analisadas 18 horas após a infecção. Foi utilizado o microscópio confocal da marca Leica, modelo TCS SP5 II, do laboratório de Biologia Celular do LaCTAD.

4.13 Análise da expressão de genes da resposta imune por qPCR SYBR Green

A partir das amostras de RNA das células das cinéticas com sangue total, foram produzidos cDNA (DNA complementar) onde foi feita análise da expressão de IFNB1, IFIT1 e IFNL1. Com o mesmo intuito de avaliar a expressão de genes importantes que atuam na resposta imune inata durante os momentos iniciais da infecção, e que poderiam estar envolvidos na resposta frente a OROV, também foi quantificada a expressão de RIG-I, MDA5, TRIF, MYD88, MAVS, IFNB1, IFNA total, IFNL1, IFIT1, IFITM3, MX1 (Tabela 1) a partir das amostras das cinéticas com PBMCs isoladas e infecção *in vitro* com MOI 10, utilizando qPCR pelo método SYBR Green (BIO RAD Taq™ Universal SYBR® Green Supermix). As amostras de RNA extraídas foram quantificadas em *NanoDrop One* (Thermo Fisher Scientific) e utilizadas para obtenção de cDNA com *kit High Capacity cDNA Reversion Transcription* (AppliedBiosystems), onde foram utilizados 10 µL da amostra de RNA obtida, seguindo recomendações do fabricante. Foi utilizado o termociclador *SimpliAmp* (Thermo Fisher Scientific) para realização do RT-PCR. Após quantificação das amostras de cDNA, estas foram diluídas 1:20 para se obter uma concentração de cDNA entre 90 e 100 ng/µL, segundo recomendações do fabricante. Para análise da expressão gênica, alíquotas de 2 µL de cada amostra diluída foram utilizadas para cada 5 µL de SYBR Green Mix (2x) e 3 µL de mix de oligonucleotídeos (Thermo Fisher Scientific) a 600 nM, totalizando 10 µL por reação, nas seguintes condições de ciclagem: 95°C por 3 minutos, 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, e anelamento-extensão a 60°C por 1 minuto. Foi utilizado GAPDH como controle endógeno.

Tabela 1 Oligonucleotídeos utilizados para qPCR, SYBER Green

Gene	Sequências	Referência
RIG-1	F: 5'-TGTGCTCCTACAGGTTGTGGA-3' R: 5'-CACTGGGATCTGATTCGCAAAA-3'	(SCHÖBEL; RÖSCH; HERKER, 2018)
MDA5	F: 5'-CCAAAGCTGAAGAACACAT-3' R: 5'-ATCTTCTCTGGTTGCATCT-3'	(SHAO et al., 2018)
TRIF	F: 5'-GGCCCATCACTTCCTAGCG-3' R: 5'-GAGAGATCCTGGCCTCAGTTT-3'	(HONG et al., 2015)
MAVS	F: 5'-GTCACCTCCTGCTGAGA-3' R: 5' TGCTCTGAATTCTCTCT-3'	(JACOBS et al., 2014)
IFNB1	F: 5'-GCTTGGATTCCCTACAAAGAAGCA-3' R: 5'-ATAGATGGTCAATGCGGCGTC-3'	(LI et al., 2016)
IFNA (total)	F: 5'-TCCATGAGVTGATBCAGCAGA-3' R: 5'-ATTTCTGCTCTGACAACCTCCC-3'	(HARPER et al., 2015)
IFNL1	F: 5'-CGCCTTGGAAGAGTCACTCA-3' R: 5'-GAAGCCTCAGGTCCCAATTC-3'	(WU et al., 2015)
IFIT1	F: 5'-GCGCTGGGTATGCGATCTC-3' R: 5'-CAGCCTGCCTTAGGGGAAG-3'	(SCHÖBEL; RÖSCH; HERKER, 2018)
IFITM3	F: 5' ATGTCGCTGGTCCCTGTTC-3' R: 5' GTCATGAGGATGCCAGAAT-3'	(ANAFU et al., 2013)
GAPDH	F: 5'- CCCATGTTTCGTCATGGGTGT -3' R: 5'- TGGTCATGAGTCCTTCCACGATA -3'	(MICKE et al., 2006)

4.14 Análise dos resultados

Foram utilizados os softwares *Flowjo*® V10 para analisar os dados gerados pelo citômetro e *GraphPad Prism*® 6 para elaboração dos gráficos e realização dos testes estatísticos. As diferenças entre as médias dos resultados obtidos foram determinadas por análise de variância *One-Way* ou *Two-Way* (ANOVA), seguido de teste Tukey ou Bonferroni, Dunn ou Dunnett, para comparações múltiplas. O valor de $p < 0,05$ foi estabelecido como nível mínimo de significância.

5 RESULTADOS

5.1 Detecção de infecção viral produtiva de OROV a nível *single-cell* por citometria de fluxo por RNA PrimeFlow™

A premissa desse estudo é que OROV poderiam replicar e ou persistir em células mononucleares do sangue periférico de humanos, o que pode resultar em fenômenos complexos, e, inclusive, afetar a formação de uma resposta imune adaptativa efetiva ou mesmo atuar em eventos que possam contribuir com a neuroinvasão por esses vírus. Desse modo, precisávamos de um método que permitisse identificar quais células do PBMC humano estariam produtiva ou persistentemente infectadas com OROV. Para tanto, decidimos utilizar uma metodologia conhecida como RNA PrimeFlow™, que permite a marcação simultânea fluorescente do genoma e anti-genoma viral, além de marcadores citoplasmáticos e de membrana presentes em diferentes tipos celulares.

Assim, a primeira etapa do estudo passou por escolher, desenhar e validar as sondas de RNA complementares ao genoma e anti-genoma de OROV. As regiões escolhidas para tanto pertenceram ao segmento L, o qual codifica a RNA polimerase viral. As sondas para (-)RNA (AlexaFluor 647) hibridizam em uma região de 6852pb do genoma de polaridade negativa, e as sondas (+)RNA (AlexaFluor 488) hibridizam em uma região de 6852pb, de fitas de polaridade positivas que constituem o anti-genoma viral. Como previamente demonstrado para a febre amarela (DOUAM et al., 2017), a utilização dessas sondas, conjugadas com dois tipos diferentes de fluorocromos, permitiram detectar ambos os sinais, para genoma e anti-genoma, em uma mesma amostra de células.

Nesse estudo, utilizamos, a princípio, células Vero CCL81, as quais são sabidamente susceptíveis e permissivas a infecção por OROV. Quando células Vero foram infectadas com uma MOI 1, 24 horas pós-infecção, foi possível detectar o genoma de OROV em aproximadamente 80% das células, enquanto aproximadamente 40% delas tinham detecção simultânea do anti-genoma viral e estavam, portanto, provavelmente produzindo vírus no momento da análise (Figura 3). Por fim, foi possível demonstrar que as sondas são específicas, pois não tivemos marcação de genoma com a sonda de anti-genoma e vice-versa, tampouco foi observado presença de sinal nos controles de células não infectadas (Figura 3).

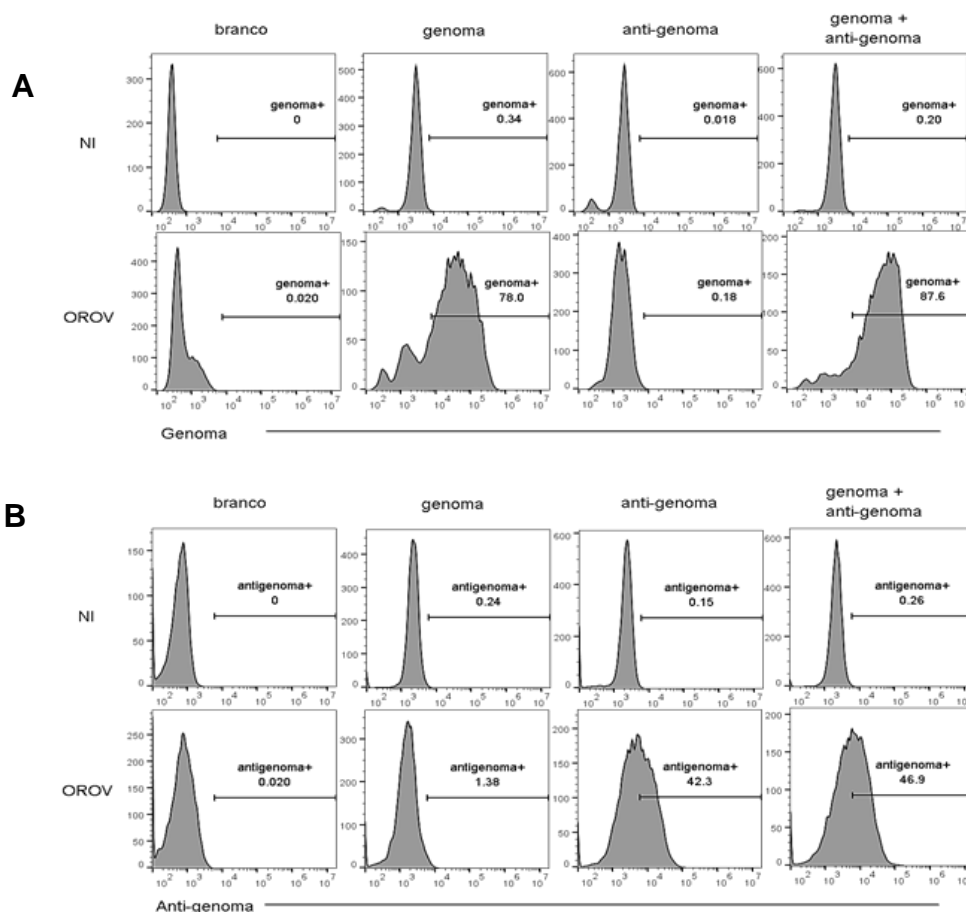


Figura 3. Avaliação dos sinais gerados pelas sondas para genoma e anti-genoma. Foram utilizadas células Vero infectadas com OROV, com MOI 1 para realização do ensaio. As sondas para OROV (-)RNA-AF647 (A) e (+)RNA-AF488 (B) foram testadas quanto à especificidade para apenas genoma e apenas anti-genoma, demonstrado por meio de histogramas. NI (células não infectadas); OROV (células infectadas).

Ainda com intuito de validar a metodologia de RNA PrimeFlow™ para detecção de células produtivamente infectadas com OROV, avaliou-se a cinética de detecção de genoma e anti-genoma de OROV em células Vero CCL81, em comparação com a detecção de genoma viral por RT-qPCR e a formação de partículas virais infectivas por ensaio de formação de foco infeccioso, sempre usando duas MOIs diferentes. Dessa forma, pode-se observar o aumento da detecção de genoma e anti-genoma virais em função do tempo de modo semelhante ao observado com os ensaios de foco infeccioso e RT-qPCR (Figura 4). Interessantemente, as duas diferentes MOI utilizadas não influenciaram significativamente a cinética de acúmulo de genoma, anti-genoma e vírus infecciosos, como demonstrado pelos três ensaios que foram realizados, RT-qPCR, ensaios de foco infeccioso e RNA PrimeFlow™.

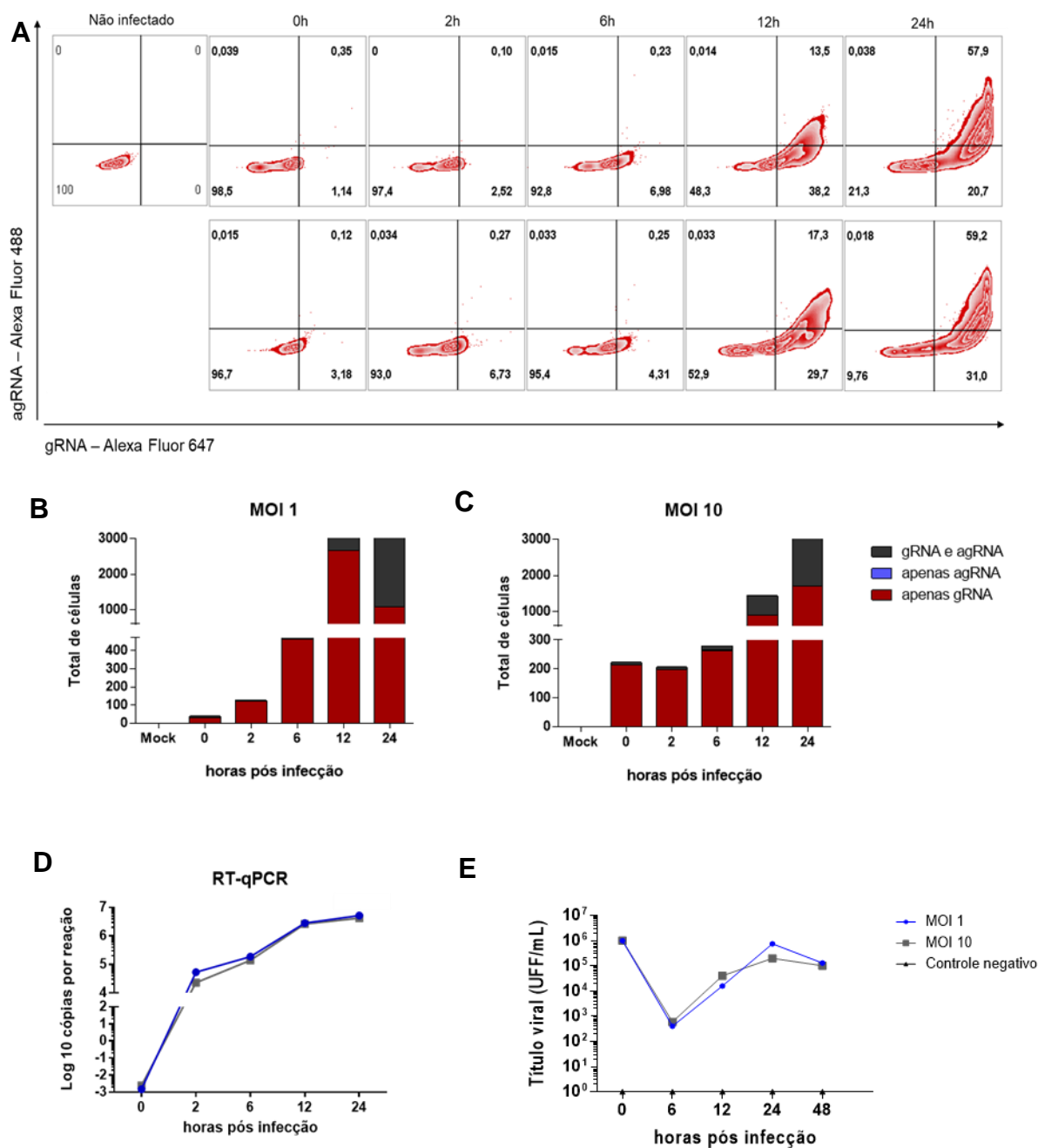


Figura 4 Detecção de replicação produtiva de OROV em células Vero. Células Vero foram infectadas com OROV com MOI 1 e 10. Foram coletadas células e sobrenadantes nos tempos 0, 2, 6, 12 e 24 horas pós-infecção. A) Análise da cinética de infecção de células Vero por citometria de fluxo. O não infectado representa as células não infectadas que não foram submetidas ao ensaio de RNA PrimeFlow™. Os gráficos foram gerados no FlowJo v10, e estão sendo mostrados nas figuras quadrantes com a porcentagem de detecção do genoma (gRNA) e anti-genoma (agRNA) de OROV. B) e C) resultados da citometria expressos em quantidade de eventos detectados ou total de células. D) RNA de células infectadas para a análise por RT-qPCR. E) Titulação por ensaio de foco infeccioso dos sobrenadantes. Não foi observada diferença estatística para os MOI 1 e 10.

Por fim, como última confirmação da especificidade das sondas para genoma e anti-genoma de OROV, analisou-se a capacidade dessas sondas de co-localizarem com as fábricas virais de OROV, as quais foram demonstradas em associação com o complexo de Golgi no tempo de 18 horas pós infecção (BARBOSA et al., 2018). Para tanto, infectamos células Vero CCL81 com OROV MOI 1 e, após 18 horas, marcamos essas células para genoma, anti-genoma e proteínas de OROV, além de marcação para TNG46, uma proteína presente no complexo de Golgi, adaptando o protocolo para leitura por microscopia confocal. Como observado na Figura 5, as marcações com as sondas de genoma e anti-genoma se colocaram com as fábricas virais 18 horas pós infecção em células Vero. Essas marcações ocorreram em grande parte nos mesmos locais onde apareceram as marcações para as proteínas virais usando um anticorpo policlonal anti-OROV (ATCC) e para o complexo de Golgi, após marcação com anticorpo monoclonal anti-TNG46. Desse modo, concluímos que a metodologia de RNA PrimeFlow™ é efetiva para detectar e caracterizar quais células são susceptíveis e/ou permissivas a infecção por OROV.

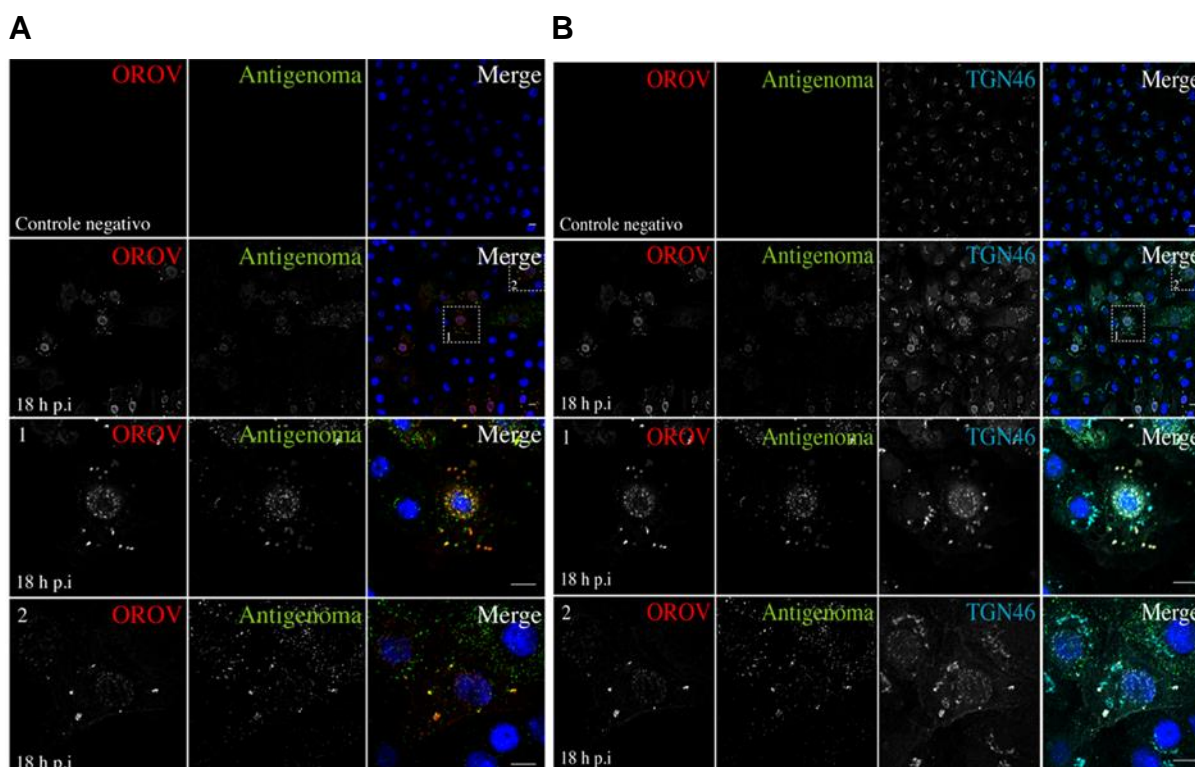


Figura 5. Marcação de genoma e anti-genoma de OROV pela metodologia de RNA PrimeFlow demonstra a formação de fábricas virais em associação com o Complexo de Golgi em células Vero após 18 horas de infecção. Células Vero foram cultivadas em lamínulas, infectadas com OROV, e fixadas após 18 horas de infecção. Foi realizado um protocolo adaptado de hibridização de RNA. A) Proteínas virais e anti-genoma foram marcados; B) proteínas virais e anti-genoma são mostrados juntamente com a proteína TGN46, em possíveis fábricas virais. Os núcleos celulares são visualizados em azul, corados com DAPI. As análises foram feitas por microscopia confocal. Escalas em 2 μ m, com aumento de 10 μ m nas imagens ampliadas.

5.2 OROV não infecta leucócitos humanos usando um modelo de infecção *ex vivo* com sangue total

Para caracterizar quais leucócitos humanos são susceptíveis e permissivos a infecção por OROV, resolveu-se caracterizar a cinética de replicação por qRT-PCR, a cinética de acúmulo de genoma e anti-genoma por RNA PrimeFlow™, a taxa de morte e a expressão de genes importantes na resposta antiviral em modelo de infecção de sangue total *ex vivo*, seguindo o que foi recentemente descrito para vírus Zika (FOO et al., 2017). Entretanto, a taxa de replicação viral nesse modelo foi muito baixa, o que dificultou qualquer tipo de análise e conclusão. A medida da produção de RNA viral por qRT-PCR mostrou uma diminuição gradativa da quantidade de cópias de RNA viral por mL de sangue a partir de 4 horas após a infecção (Figura 6A). Essa diminuição foi acompanhada da ativação de algum braço da resposta imune inata, levando a um aumento da expressão de produtos gênicos com atividade antiviral, como de IFIT-1 (Figura 6B), embora não tenha havido aumento significativo da expressão de IFN-β e IFN-γ em relação ao tempo 0 horas (Figuras 6C-D).

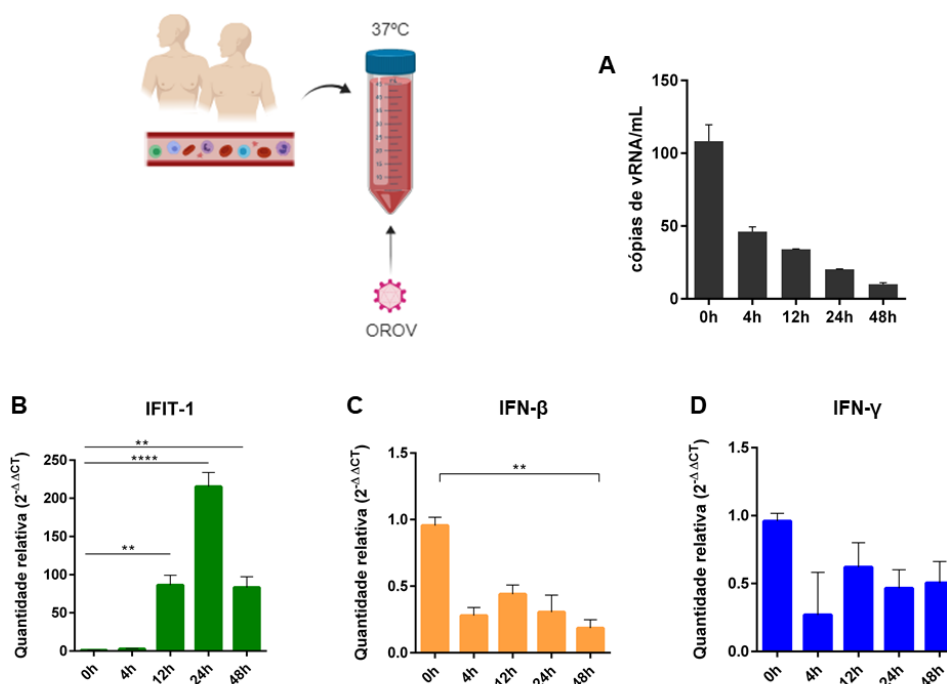


Figura 6 . Expressão de IFN-β, IFN-γ e IFIT-1 em sangue total de humanos infectado com OROV in vitro. Sangue total obtido de doador saudável foi infectado com OROV MOI entre 0,1 e 1 in vitro. Alíquotas foram coletadas nos tempos 0, 4, 12, 24 e 48 pós-infecção para extração de RNA total. Os dados representados são resultados de dois ensaios independentes, a partir do mesmo doador. (A) Quantificação de RNA viral por RT-qPCR; (B), (C) e (D) expressão de IFN-β, IFN-γ e IFIT-1, respectivamente, normalizados a partir da expressão de GAPDH. Para as comparações entre os tempos de cada grupo com o tempo 0 horas foi aplicado One-way ANOVA seguido de teste de Dunn, * p < 0.05.

Quando tentamos caracterizar quais leucócitos estavam infectados com OROV pela metodologia de RNA PrimeFlow™, não conseguimos identificar células infectadas por citometria de fluxo, 24 horas pós infecção, corroborando que a grande maioria dos leucócitos humanos não são susceptíveis e/ou permissivos a infecção por OROV quando o sangue total é infectado *ex vivo*. (Figura 7).

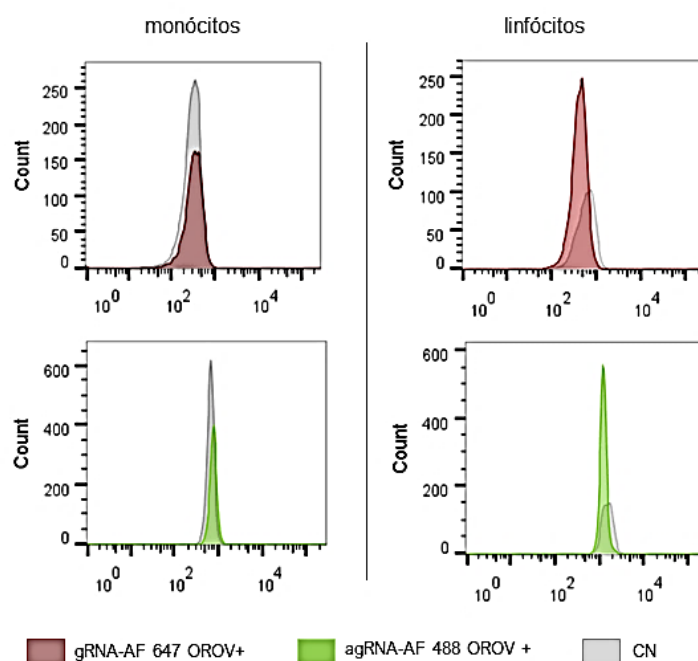


Figura 7. Avaliação do modelo de infecção *ex vivo* de sangue total de humanos com OROV por citometria de fluxo, com marcação para RNA viral. Sangue total obtido de doadores saudáveis foram infectados com OROV, MOI 1 (n=1). Após 24 horas de infecção as PBMCs foram separadas e submetidas ao ensaio de RNA Primeflow™. Os histogramas apresentam comparações entre os sinais para genoma (gRNA) e anti-genoma (agRNA) virais nas subpopulações (linfócitos e monócitos), em dois grupos distintos: infectado com OROV e controle negativo (CN).

Por fim, buscou-se caracterizar a morte celular nessas células, pois OROV é sabidamente um agente indutor de apoptose. Assim, a detecção de altas taxa de morte celular poderia funcionar como um indício indireto da infecção por OROV. Para isso, subpopulações de células, pós infecção do sangue total com OROV, foram submetidas a marcação com Anexina V e PI, a fim de verificar início de apoptose e morte celular, respectivamente (Figuras 8 e 9). Como esperado, e em concordância com os resultados obtidos por RNA PrimeFlow™ e qRT-PCR, e usando o modelo de infecção com sangue total *ex-vivo* descrito, a morte celular observada nos grupos de células infectadas e não infectadas não foi estatisticamente significativa. entre as células infectadas e não infectadas com OROV.

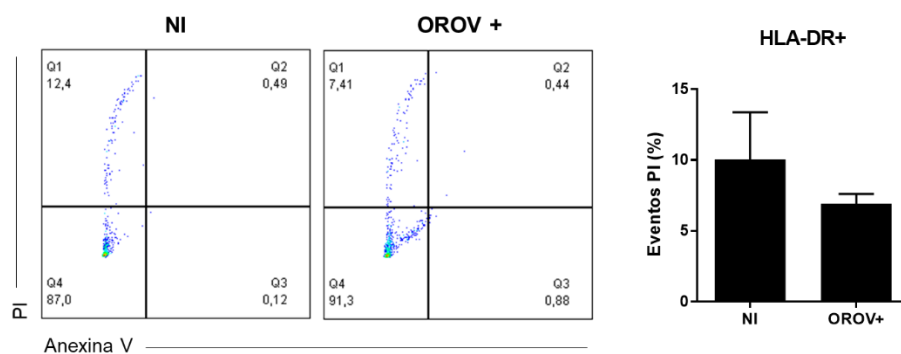


Figura 8. Análise de morte celular e início de apoptose em células HLA-DR+. Após 24 horas de infecção com OROV as PBMCs foram separadas, marcadas com anticorpos de superfície, com Anexina V e iodeto de propídio. A figura mostra a disposição das células nas análises por FlowJo, e gráficos em colunas que representam as médias e desvio padrão da porcentagem de células mortas. Os resultados foram obtidos a partir de dois experimentos independentes. NI (não infectado).

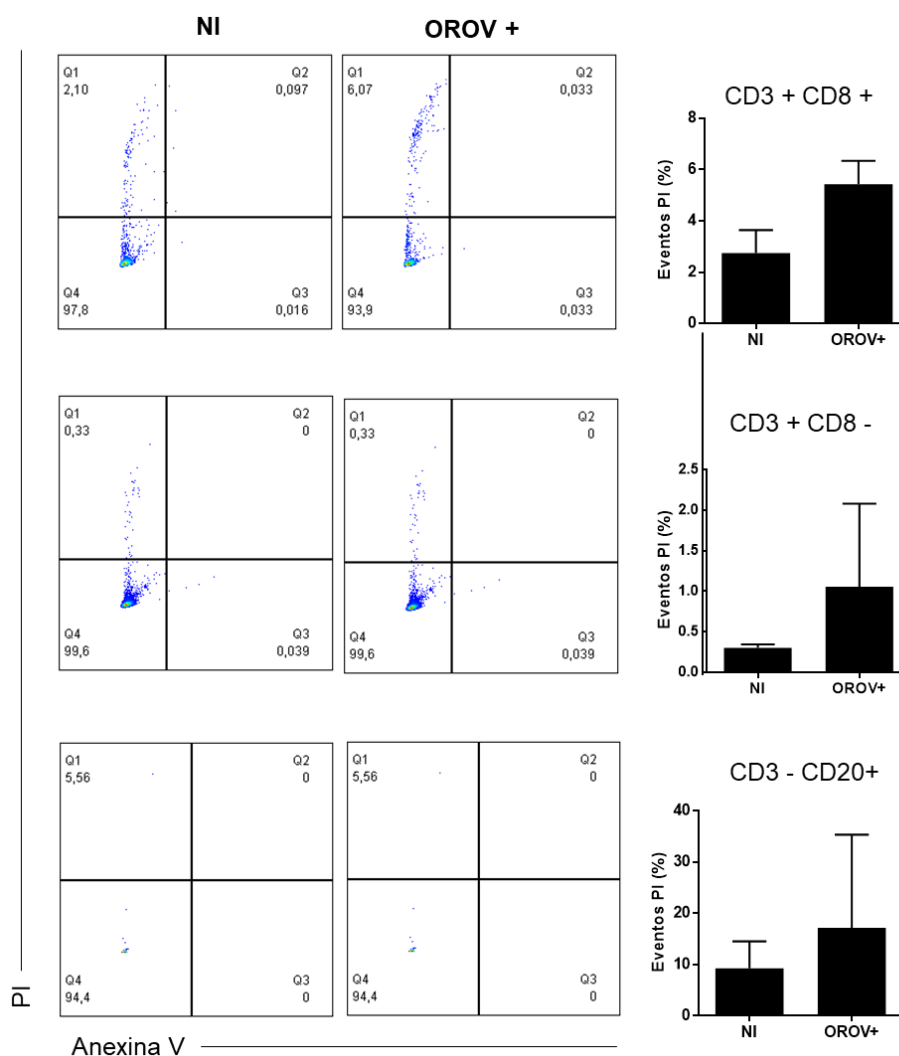


Figura 9. Análise de morte celular e início de apoptose em populações de linfócitos. Após 24 horas de infecção com OROV as PBMCs foram separadas, marcadas com anticorpos de superfície, com Anexina V e iodeto de propídio. A figura mostra a disposição das células nas análises por FlowJo e gráficos em colunas que representam as médias e desvio padrão da porcentagem de células mortas. Os resultados foram obtidos a partir de dois experimentos independentes. NI (não infectado).

5.3 Monócitos e linfócitos humanos são susceptíveis, mas pouco permissivos, a infecção por OROV

Como o sangue total pode ter componentes que possam eventualmente inibir a replicação de um determinado vírus, decidiu-se infectar PBMCs e linhagens celulares de monócitos e linfócitos com OROV *in vitro*. Primeiramente, analisamos a cinética de replicação de OROV pós infecção de PBMCs isoladas, com diferentes MOIs. Para isso foi coletado sangue total de doadores saudáveis e as PBMCs foram purificadas por Ficoll. Os resultados demonstraram que foi possível detectar quantidades significativas e relativamente estáveis de RNA viral por RT-qPCR no interior celular, ainda que não sejam detectadas altas quantidades de RNA viral, nem de partículas virais viáveis, no sobrenadante celular (Figura 10). Além disso, após 12 horas de infecção, não foi mais possível detectar partículas virais infecciosas no sobrenadante celular, independente da MOI utilizada. Assim, os resultados indicam que PBMCs são susceptíveis, com baixa produtividade de partículas virais viáveis,

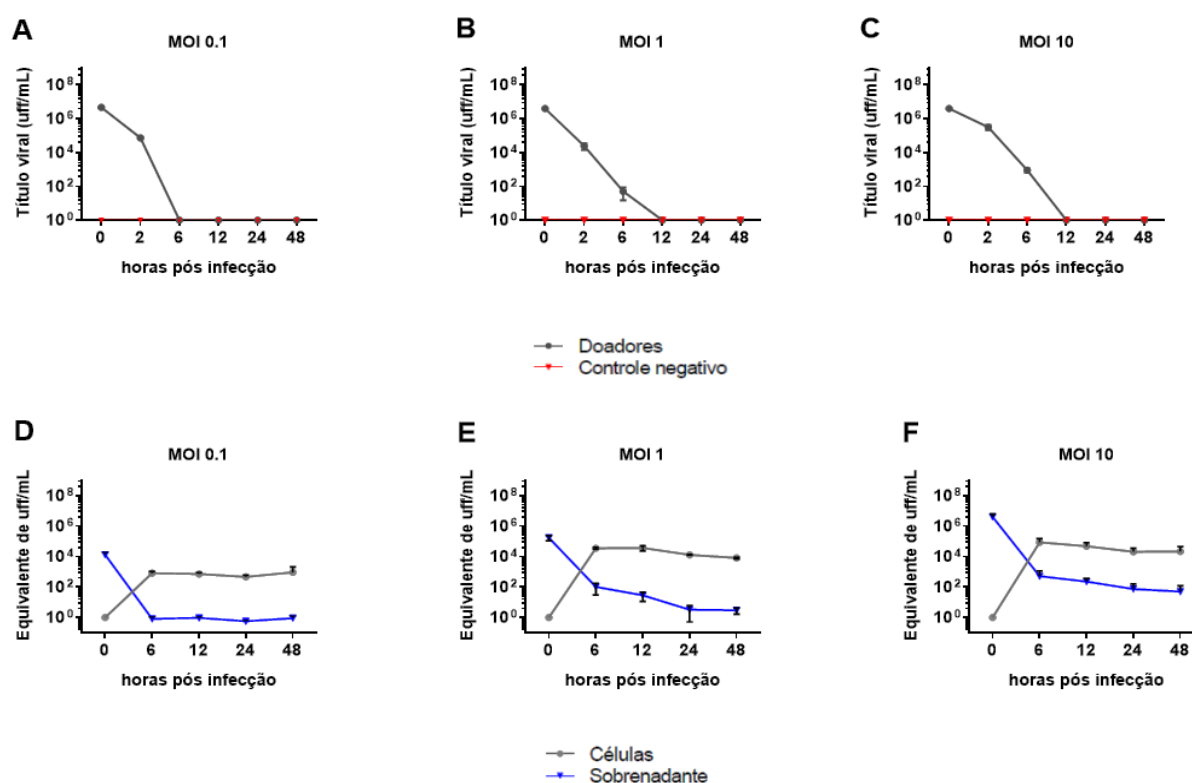


Figura 10. Cinética de replicação de OROV em PBMCs humanas isoladas. PBMCs foram obtidas a partir de sangue total de doadores saudáveis e infectadas com OROV *in vitro*. A), B) e C) correspondem à titulação viral por ensaio de foco infeccioso dos sobrenadantes da cultura de PBMCs em diferentes tempos, sendo o controle negativo referente ao sobrenadante de PBMCs não infectadas. D), E) e F) correspondem à quantificação de genoma viral por RT-qPCR expresso em equivalente de unidades formadoras de foco (uff) por mL, onde o limite de detecção é de 0,015 equivalentes de uff/mL. Foram utilizadas PBMCs de três doadores nos ensaios de MOI 1 e 10, e dois doadores nos ensaios de MOI 1. Todos os ensaios foram realizados em duplicatas

nas condições analisadas. Entretanto, a manutenção de RNA viral nessas células é um fator a ser considerado em estudos futuros, levando em consideração condições de imunossupressão.

Para confirmar que monócitos e linfócitos humanos são permissivos a replicação de OROV, resolvemos caracterizar a cinéticas de infecção de OROV em células de linhagem de linfócitos T (Jurkat) e de monócitos (THP-1). Em concordância com os dados obtidos com PBMCs, os resultados com Jurkat e THP-1 mostraram um aumento inicial do RNA viral no interior celular nas seis primeiras horas, que se mantem estável até 24 horas pós infecção (Figura 11). Como em PBMCs, não observamos um aumento na quantidade de RNA viral no meio extracelular, indicando a não liberação de partículas virais. Todavia, apesar da quantidade de RNA viral detectado nas células, não fomos capazes de detectar genoma e anti-genoma de OROV por microscopia confocal após 18 horas de infecção pela metodologia de RNA PrimeFlow™ (Figura 12), indicando um problema de hibridização com o RNA viral. Com esses resultados, demonstramos que linhagens de monócitos e linfócitos humanos são susceptíveis, porém com pouca produção de partículas virais viáveis.

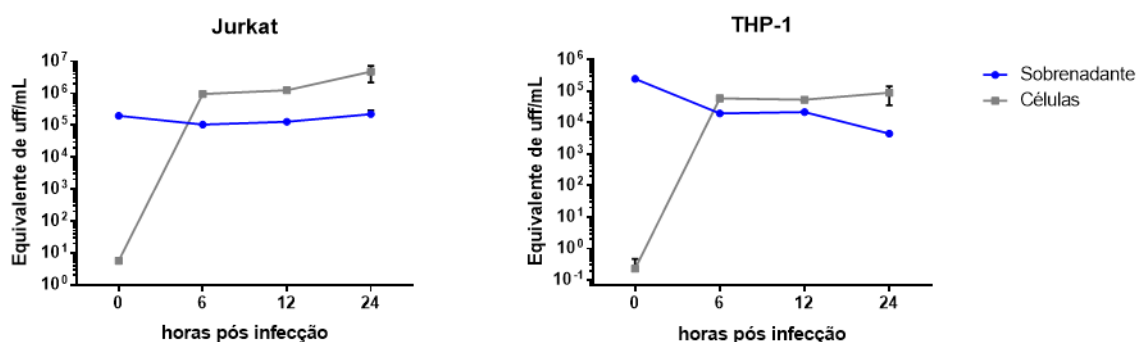


Figura 11. Cinética de replicação de OROV em células Jurkat e THP-1. Células Jurkat e THP-1 foram infectadas com OROV, MOI 1. Foram coletadas células e sobrenadantes nos tempos 0, 6, 12, 24 e 48 horas após a infecção para extração de RNA viral e análise por RT-qPCR. Os dados são mostrados em equivalentes de uff/mL. Todas as infecções foram realizadas em duplicata.

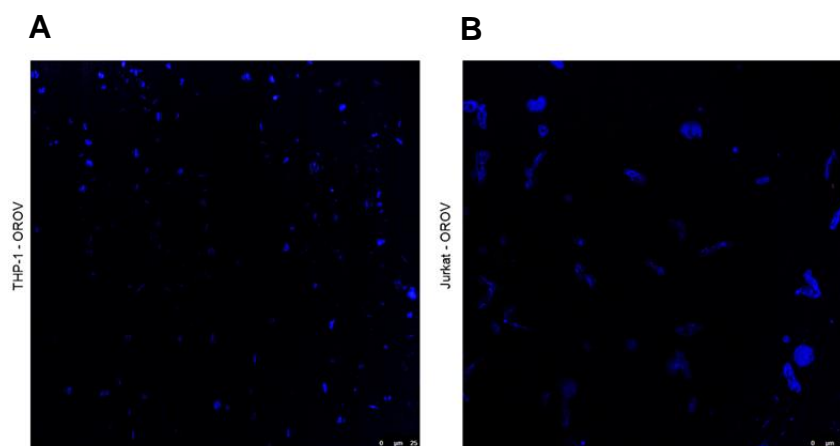


Figura 12. Microscopia confocal de células Jurkat e THP-1 para detecção de genoma e anti-genoma de OROV por RNA PrimeFlow. Linfócitos T (Jurkat) e monócitos de linhagem (THP-1) foram infectados com OROV MOI 1 e após 18 horas de infecção foram coletadas e submetidas ao protocolo de RNA PrimeFlow™ de acordo com o fabricante, para marcação de genoma e anti-genoma virais. Ao final do processo, as células foram depositadas sobre lamínulas tratadas com poli-lisina e após a secagem da lamínula, foram montadas as lâminas para microscopia com meio de montagem contendo DAPI. Escala em 10 µm.

5.4 Detecção de RNA viral em PBMCs a nível *single-cell*

Como foi possível detectar quantidades significativas e estáveis de RNA viral no interior de PBMCs, resolveu-se caracterizar quais células mononucleares presentes no sangue poderiam ser produtivamente infectadas com OROV. Além disso, a manutenção do genoma viral, mesmo que não produtivo, poderia representar uma possível fonte de infecção em um microambiente específico ou em um estado de imunossupressão. Assim, foi avaliada a presença de genoma e anti-genoma virais a nível *single-cell*, pelo ensaio de RNA PrimeFlow™, em diferentes células dos PBMCs infectadas *in vitro*, usando marcadores de superfície para identificação de diferentes subpopulações celulares. Primeiramente analisou-se a proporção de linfócitos e monócitos com genoma e anti-genoma nos seguintes tempos pós infecção: 0, 12 e 24 horas (Figura 13).

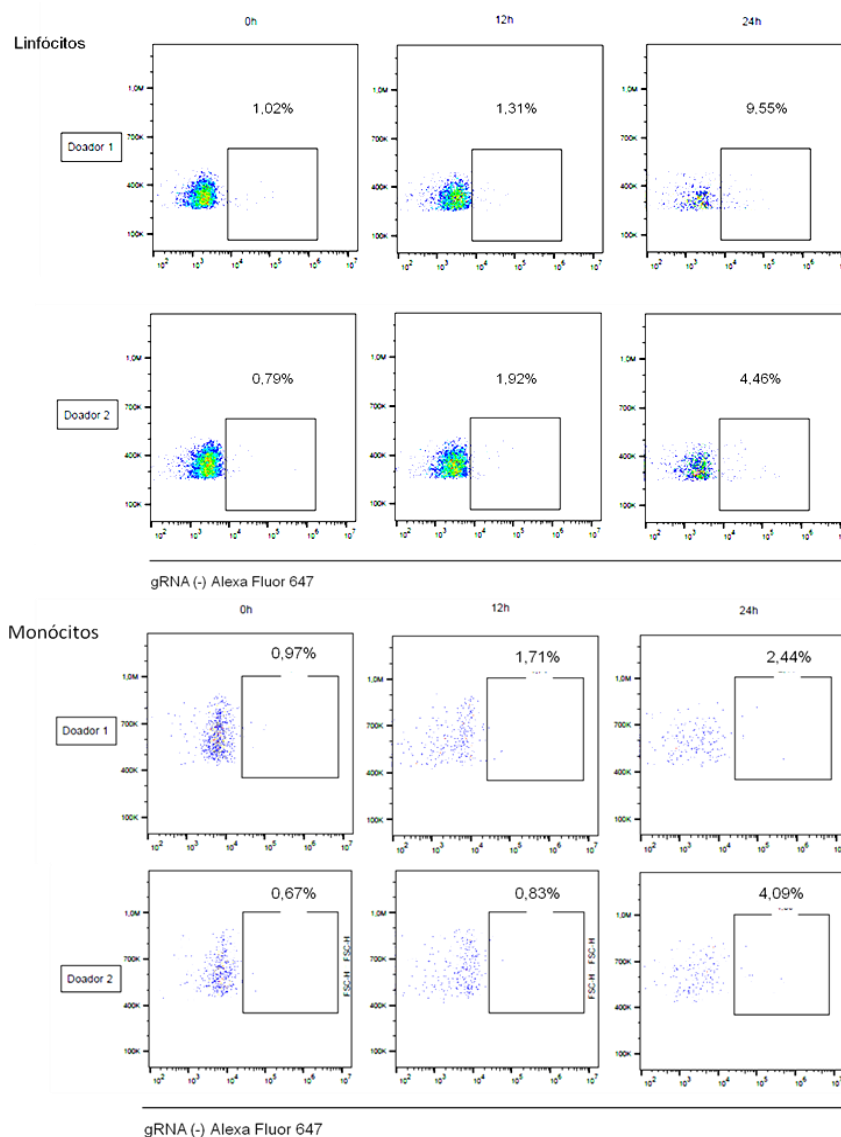


Figura 13. Detecção de genoma de OROV em populações de linfócitos e monócitos de humanos. PBMCs de doadores saudáveis ($n=2$) foram isoladas (4×10^6 células/mL) e infectadas com MOI 1. As células foram coletadas nos tempos 0, 12 e 24 horas, submetidas ao protocolo de marcação com anticorpos de superfície e, em seguida, foram submetidas ao protocolo de RNA PrimeFlow™. As subpopulações foram analisadas e separadas por linfócitos CD3+ (incluindo linfócitos T, T gama-delta e NK) e monócitos CD14+.

Na Figura 13 pode-se observar que há um pequeno aumento na porcentagem de células marcadas com a sonda para o genoma de OROV, ao decorrer do tempo, indicando que tanto linfócitos como monócitos são susceptíveis à infecção, porém com poucos indícios da produção de partículas virais viáveis nos ensaios realizados.

Na tentativa de caracterizar as populações de monócitos e linfócitos que podem carregar o genoma de OROV, foi possível caracterizar uma pequena porcentagem de linfócitos B (CD3-CD19+) positivas para OROV (Figura 14). A pequena quantidade de células positivas para o genoma de OROV dificultou qualquer tipo de análise em subpopulações de monócitos

ou de células dendríticas. Por fim, vimos que uma proporção acumulativa das células mortas, que chega a aproximadamente 5% das células em 24 horas pós infecção, possui genoma de OROV detectado por RNA PrimeFlow™ (Figura 15).

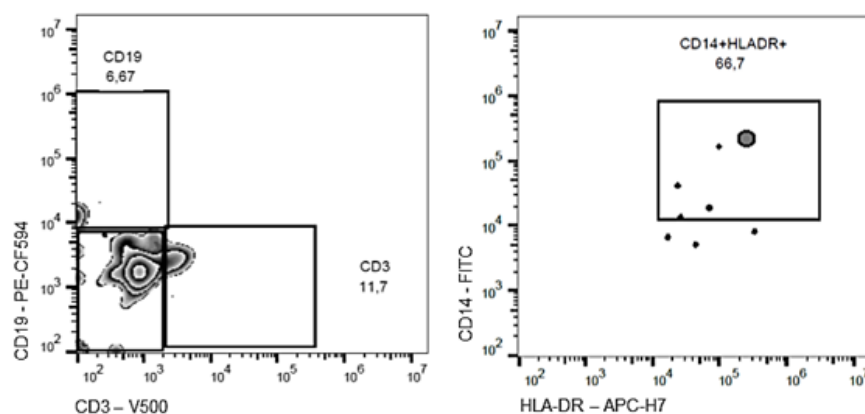


Figura 14. Linfócitos e monócitos com marcação para genoma de OROV. PBMCs obtidas de doadores saudáveis e infectadas in vitro com MOI 1 foram avaliadas por RNA PrimeFlow™ e citometria de fluxo. Dentro das proporções de células com marcação para genoma viral, foram identificadas apenas pequenas quantidades de células B, linfócitos T e monócitos.

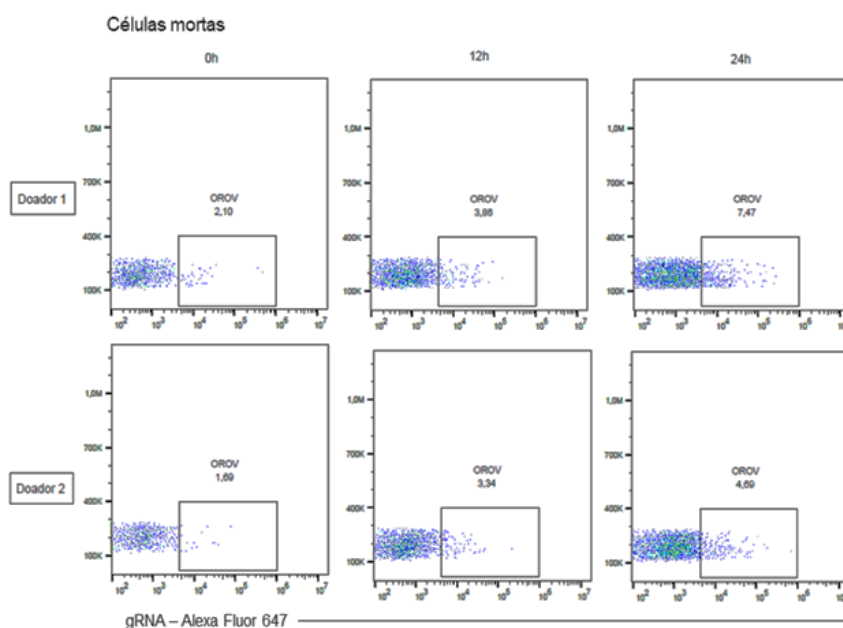


Figura 15 Marcação de genoma viral em células mortas. PBMCs de dois doadores saudáveis foram isoladas (4×10^6 células/mL) e infectadas com OROV in vitro com MOI 1. As células foram coletadas nos tempos 0, 12 e 24 horas, submetidas ao protocolo de marcação com anticorpos de superfície e, em seguida, foram submetidas ao protocolo de RNA PrimeFlow™. Marcação para genoma viral (gRNA) dentro do gate de células mortas.

5.5 Células de PBMCs respondem a infecção por OROV *in vitro*, induzindo a expressão de genes da resposta imune inata

A baixa produção de partículas virais de OROV em PBMCs nos modelos utilizados pode ser resultado do reconhecimento de PAMPs virais por PRRs, o que poderia desencadear uma resposta imune antiviral efetiva em controlar a replicação viral no interior dessas células. Sabemos que essa resposta passa, na maioria das vezes, pela produção de IFNs do tipo I e III. Desse modo, foi avaliada a expressão de IFN alpha, beta e lambda em PBMCs por qPCR em diferentes momentos após a infecção. Foi possível observar aumento da expressão de IFN- α e IFN- β , com diferença estatisticamente significativa quando comparado com o tempo 0 ($p < 0,05$) (Figura 16). Vale ressaltar que os iniciadores utilizados para IFN- α foram desenhados com base em regiões conservadas de 12 subtipos, e previamente testados e descritos na literatura (HARPER et al., 2015).

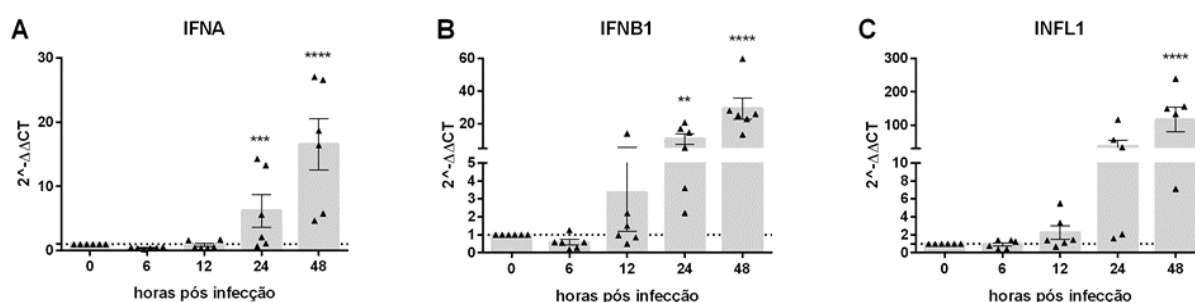


Figura 16. Aumento da expressão de interferons na infecção de PBMCs por OROV *in vitro*. PBMCs de três doadores foram isoladas e infectadas com MOI 10. As células foram coletadas nos tempos 0, 6, 12, 24 e 48 horas pós infecção para extração de RNA, produção de cDNA e qPCR. As figuras A), B), e C) representam as médias e erro padrão (SEM) dos resultados obtidos em seis experimentos independentes, normalizados a partir da expressão do GAPDH. Para as comparações entre os tempos com o tempo 0 horas foi aplicado Two-way ANOVA e teste de Dunnett. **** $P < 0.0001$ e ** $P < 0.005$.

Uma vez que um patógeno é reconhecido, a resposta mediada por citocinas como os IFNs do tipo I, promove a expressão de diversas proteínas as quais irão caracterizar um estado antiviral na célula e nas células vizinhas. Portanto, a expressão de proteínas das vias de reconhecimento de PAMPs foram acessadas, assim como a expressão de alguns genes estimulados por interferon (ISGs) (Figuras 17 e 18).

Nos resultados obtidos não foi observado aumento na expressão de RIG-I ou diminuição significativa ($p < 0,05$) da sua expressão 6 horas pós infecção em relação ao tempo 0. Também foi observada diminuição da expressão de MAVS, ou IPS-1, no tempo de 6 horas (Figura 17). Por outro lado, foi observado um aumento de aproximadamente 10x na expressão da proteína MDA5, 12 e 24 horas pós infecção ($p < 0,0001$), e aumento gradativo da expressão de TRIF ($p < 0,005$).

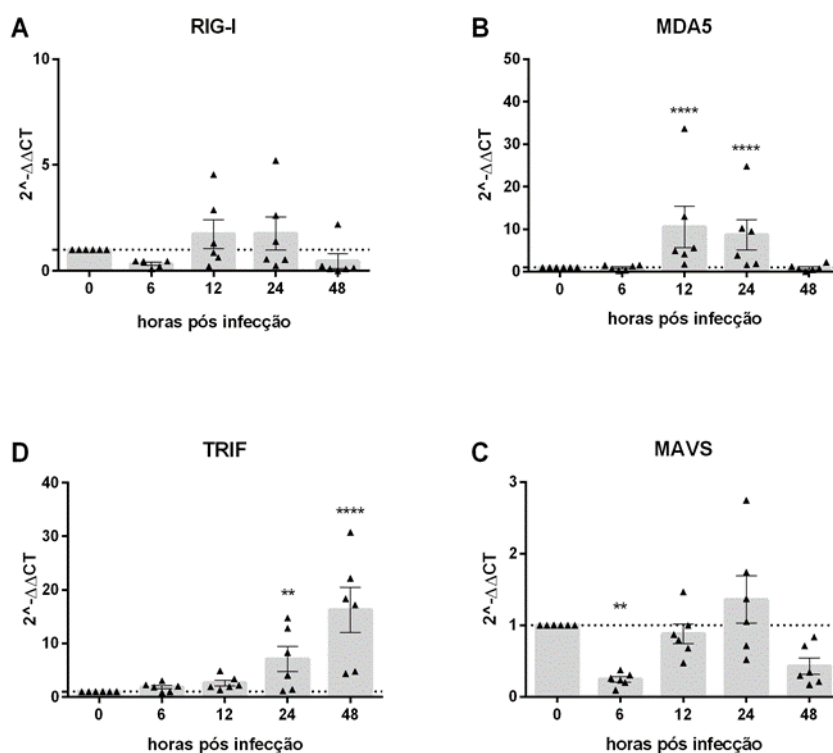


Figura 17. Infecção de PBMCs humanas por OROV *in vitro* modula a expressão de proteínas citoplasmáticas de reconhecimento de PAMPs. PBMCs foram isoladas e infectadas com OROV MOI 10. As células foram coletadas nos tempos 0, 6, 12, 24 e 48 horas pós infecção. As figuras A), B) e C) representam as médias e erro padrão (SEM) dos resultados obtidos em seis experimentos independentes, normalizados a partir da expressão do GAPDH. Para as comparações entre os tempos com o tempo 0 horas foi aplicado Two-way ANOVA e teste de Dunnett. **** $P < 0,0001$ e ** $P < 0,005$.

Entre os ISGs importantes na resposta imune antiviral foram investigados o Mx1, IFIT1 e IFIT3. Houve aumento da expressão da proteína Mx1 nos tempos 12 ($p < 0,005$) e 24 ($p < 0,0001$) horas pós infecção. Assim como já havia sido observado no modelo de infecção de sangue total, também foi observado aumento na expressão de IFIT1 nas condições de infecção *in vitro* em que as células foram submetidas, demonstrando que a ação das vias de IFN na ativação de ISGs está acontecendo. A expressão da proteína IFITM3, por outro lado, mostrou uma diminuição significativa na sua expressão ($p < 0,0001$) (Figura 18).

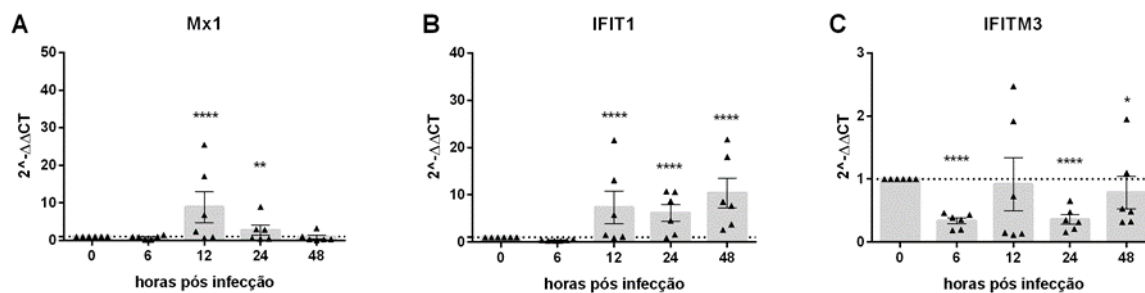


Figura 18. Expressão de ISGs em PBMCs de humanos infectadas in vitro. PBMCs foram isoladas e infectadas com OROV MOI 10. Foram coletados nos tempos 0, 6, 12, 24 e 48 horas pós infecção para extração de RNA das células, produção de cDNA e realização do qPCR. As figuras A, B e C representam as médias e erro padrão (SEM) dos resultados obtidos em seis experimentos independentes, normalizados a partir da expressão do GAPDH. Para as comparações entre os tempos com o tempo 0 horas foi aplicado Two-way ANOVA e teste de Dunnett. **** $P < 0.0001$ e ** $P < 0.005$.

6 DISCUSSÃO

Nesse trabalho pretendíamos caracterizar quais células mononucleares do sangue periférico poderiam ser infectadas por OROV e qual o efeito da infecção desses vírus em diferentes populações de leucócitos humanos. Entretanto essa tarefa foi particularmente desafiadora, afinal ficou demonstrado que OROV não foram capazes de infectar de maneira produtiva diferentes populações de leucócitos, ao contrário de outros arbovírus, como ZIKV e YFV, que são capazes de infectar eficientemente diferentes populações de monócitos e células dendríticas (DOUAM et al., 2017; VIELLE et al., 2018). Todos os experimentos foram conduzidos com culturas de PBMCs isoladas do sangue total de doadores saudáveis e os ensaios de detecção de genoma e anti-genoma foram realizados por hibridização *in situ* acoplado a metodologia de *branched* DNA, pelo ensaio denominado RNA PrimeFlow™, que amplifica o sinal e facilita a detecção dos alvos. A princípio, não foram detectados anti-genoma e partículas virais infectivas depois da infecção *ex-vivo* de sangue total periférico de doadores saudáveis.

A metodologia de RNA PrimeFlow™ foi desenvolvida para que os pesquisadores pudessem revelar a dinâmica de transcrição de RNA em associação com os padrões de produção de proteínas em uma única célula. Como já descrito para outros vírus, incluindo YFV e HIV (BAXTER et al., 2017; DOUAM et al., 2017), fomos capazes de padronizar e utilizar a metodologia para entender o acúmulo de genoma e anti-genoma de OROV em uma célula sabidamente susceptível e permissiva a infecção por esse vírus, como a célula Vero CCL81. Pudemos observar nessas células que a presença de genoma e anti-genoma viral se acumula na região do Complexo de Golgi em 18 horas pós-infecção, em associação com proteína TNG46, indicando que essa organela é parte importante dos sítios de multiplicação de OROV. Esse resultado vai ao encontro da literatura, pois antígenos proteicos de OROV também se acumulam no Complexo de Golgi após 18 horas pós-infecção em células HeLa (BARBOSA et al., 2018). Assim, concluímos que o RNA PrimeFlow™ é uma metodologia sensível, específica e que pode ser usada para caracterizar o perfil de populações de células susceptíveis e permissivas a OROV.

A associação dessa metodologia a citometria de fluxo nos mostrou que pequenas porcentagens de linfócitos e monócitos contêm genoma viral. Entretanto, não foi possível detectar de maneira confiável a presença de anti-genoma de OROV em PBMCs, indicando uma possível infecção não produtiva desses vírus nessas células. Além disso, devido a limitações associadas principalmente à quantidade de células, identificações precisas de quais subpopulações de leucócitos humanos podem ser infectados com OROV ficaram

comprometidas. Dessa forma, pretende-se realizar em estudos futuros, ensaios com um número maior de doadores e uma quantidade maior de células. Por fim, observamos um pequeno aumento na morte celular pós infecção com OROV, o que pode estar associado à capacidade de OROV em promover apoptose (OLSZANSKI et al., 2010). Além disso, os resultados obtidos indicam que as células mononucleares do sangue de humanos são capazes de gerar uma resposta eficiente para o controle da infecção por OROV.

Durante os primeiros momentos de infecção, alguns mecanismos intrínsecos das células são capazes de conter a replicação viral e induzir um estado antiviral na própria célula e em células vizinhas, principalmente devido à produção de citocinas como os IFNs (revisado em HALLER et al., 2006). No presente trabalho relatamos a produção de uma resposta imune mediada por IFNs em PBMCs humanas logo após o primeiro contato com OROV.

A produção de IFNs do tipo I em resposta a infecção por vírus da família *Peribunyaviridae* tem sido reportada como fatores importantes da resposta imune, inclusive frente à capacidade neuropatogênica de alguns desses vírus em modelo animal (PROENCA-MODENA et al., 2015; TAYLOR; PETERSON, 2014). Também já foi demonstrada a atividade antiviral de IFN- α quando utilizado como medida profilática *in vivo* e *in vitro* frente a OROV e Guaroa vírus (GROV), ambos do gênero *Orthobunyavirus* e que causam doença de caráter febril em humanos (LIVONESI et al., 2007).

Apesar de gerarem sinais muito similares durante infecções virais, IFNs do tipo I e III pertencem a diferentes famílias de citocinas, e sinalizam por vias diferentes de receptores celulares. Os IFNs do tipo I sinalizam por meio do complexo IFNAR1 e IFNAR2, presente na maioria das células nucleadas. Já os IFNs do tipo III ou IFN- λ , sinalizam pelo receptor heterodimérico composto por IFN λ R1 and IL-10R2 e têm expressão mais acentuada em células epiteliais, o que torna importante sua ação frente a infecções de células de barreiras como a hematoplacentaria e a hematoencefálica (revisado em HEMANN; GALE JR; SAVAN, 2017). IFN do tipo II, ou IFN- γ por sua vez, também é produzido em resposta a infecções virais, principalmente por células NK e ILC1 (*innate lymphoid type 1 cells*), e tem grande impacto sobre outras células imunes inatas, como macrófagos e DCs, melhorando em vários aspectos a apresentação de antígenos e contribuindo com a formação de memória imunológica (revisado em LEE & ASHKAR, 2018).

Alguns trabalhos têm mostrado a importância da produção de IFNs α e β frente à infecção por OROV em modelo animal (PROENCA-MODENA et al., 2015), porém são escassos os trabalhos que abordam a importância de IFN do tipo III frente a OROV. Nos resultados aqui apresentados, houve diminuição da detecção de genoma viral em amostras de

PBMCs humanas infectadas *in vitro* e aumento da expressão de IFN do tipo I e III mais acentuada após 12 horas de infecção. A expressão de IFNs do tipo I e III está associada ao reconhecimento de PAMPs virais e diferentes cascatas de sinalização até a ativação de fatores de transcrição específicos. Nesse trabalho, observamos aumento na expressão de ISGs e de algumas proteínas chaves associadas ao reconhecimento de PAMPs. A molécula adaptadora TRIF (*TIR domain-containing adaptor protein-inducing interferon β*) da via de reconhecimento por TLR 3, promove a ativação da quinase TBK-1 que conseqüentemente fosforila o fator de transcrição IRF3, o qual em seguida é translocado para o núcleo celular e promove a transcrição de IFN- β (revisado em HALLER et al., 2006). Também foi possível observar nesse estudo um aumento crescente da expressão de TRIF, à medida que houve aumento da expressão de IFN- β , demonstrando que também ocorre aumento da expressão dessa molécula como um ISG.

As proteínas de reconhecimento RLRs RIG-I e MDA5 localizadas no citoplasma também foram investigadas a partir da expressão de mRNA por qPCR. Ambas são RNA helicases, cuja expressão é induzida por IFNs, que reconhecem dsRNA e sinalizam via MAVS/IPS-1. Estudos apontam que geralmente essas duas proteínas reconhecem conformações diferentes de dsRNA. Enquanto RIG-I está associada ao reconhecimento de estruturas em *panhandle* e frações 5' trifosfato, o MDA5 está associado ao reconhecimento de estruturas longas de dsRNA e agregados de RNA (revisado em SCHLEE, 2013). Sendo assim, o aumento ou diminuição de sua expressão poderia ter resultados diferentes frente à patogênese viral. Porém, já foi demonstrado que alguns membros da família *Peribunyaviridae* possuem mecanismos de evasão ao reconhecimento via RIG-I (MARQ; KOLAKOSKY; GARCIN, 2010). Vale ressaltar que o OROV possui genoma tri segmentado de ssRNA que formam estruturas em *panhandle* (ELLIOTT, 2014). No presente trabalho, a expressão de RIG-I não se alterou nos momentos iniciais da infecção, assim como a expressão de MAVS. O MDA5, por outro lado, teve um aumento significativo 12 e 24 horas pós infecção.

Ainda não existem estudos que demonstrem mecanismos de evasão do OROV frente ao reconhecimento por RLRs, tampouco sobre a importância dessas proteínas no controle da patogênese do vírus. Foi observado que em modelo murino (animais *Mays*^{-/-}) a proteína adaptadora MAVS é importante na proteção frente à neuropatogênese por OROV. Todavia, são necessárias maiores investigações para elucidar a importância dessas vias em células de humanos. Além disso, a deleção de MAVs e IFNAR capacitou a replicação de OROV em células dendríticas e macrófagos derivados de medula óssea, indicando que

quadros de imunossupressão poderiam permitir uma replicação viral mais eficiente em PBMCs humanas (PROENCA-MODENA et al., 2015).

No presente estudo também foi avaliada a indução da expressão de ISGs. Entre as diversas proteínas produzidas frente às infecções virais, as GTPases dinamina Mx têm sido relatadas como agentes efetores antivirais de amplo espectro, que bloqueiam etapas iniciais da replicação viral. A proteína Mx1, por exemplo, tem sido reportada como agente protetor frente a Influenza A em humanos (revisado em Haller, Staeheli, Schwemmle, & Kochs, 2015), e no vírus Bunyamera (BUNV), um modelo para o estudo do gênero *Orthobunyavirus*, teve ação inibitória da poliproteína viral (revisado em Elliott & Weber, 2009). Nos resultados aqui apresentados houve aumento da expressão de Mx1 durante as primeiras 12 e 24 horas pós infecção. Uma vez que as proteínas Mx são produzidas de maneira dependente da via de sinalização de IFN (HALLER et al., 2015; HOLZINGER et al., 2007), é possível sugerir que os IFNs I e III expressos muito provavelmente estão sendo traduzidos e são funcionais no modelo de estudo de infecção de PBMCs *in vitro*.

Outro ISG importante aqui avaliado é o IFIT-1 (ISG56), o qual faz parte da família de proteínas induzidas por interferon com repetições de tetratricopeptídeos (IFIT), e cuja expressão é rapidamente induzida pós infecção viral e produção de IFNs do tipo 1, ou após o reconhecimento de PAMPs por PRRs e ativação de IRFs, como o IRF3, 5 e 7. Essa proteína exerce sua função antiviral inibindo processos importantes da tradução do mRNA viral, e reconhecendo e inibindo estruturas 5-ppp virais (DIAMOND; FARZAN, 2013). Aparentemente em modelo murino, essa proteína não possui atividade contra vírus de RNA de polaridade negativa (PINTO et al., 2015). Nos resultados aqui apresentados houve aumento da expressão de IFIT1 em PBMCs humanas, indicando que esse ISG possa ter papel para o controle desses vírus em humanos, diferente do que foi visto para camundongos (PINTO et al., 2015).

O IFITM3 por sua vez, faz parte da família de proteínas transmembrana induzidas por Interferon (IFITM) as quais são expressas de forma basal em uma grande diversidade de células em humanos. Estas também possuem atividade antiviral, entre outras funções biológicas, e podem ter sua expressão induzida por IFNs. Sua importância tem sido descrita principalmente frente à infecção por Influenza A e Reovirus em humanos e camundongos, atuando no momento da entrada do vírus na célula e formação do endossomo (ANAFU et al., 2013; DIAMOND; FARZAN, 2013). Apesar de não ter sido observado aumento da expressão desse gene no presente trabalho, estudos mostram que IFITM3 é um importante inibidor da replicação de outros peribunyavírus como LACV e vírus da febre do *Rift Valley fever*

phlebovirus (RVFV) (MUDHASANI et al., 2013). Portanto, outros estudos precisam ser conduzidos para mostrar a importância da atividade antiviral dessa proteína para o controle da replicação de OROV em PBMCs humanos.

Os resultados aqui apresentados mostram que a resposta imune mediada por IFNs pode restringir a infecção por OROV nas PBMCs humanas *in vitro*. Porém, é sabido que aproximadamente 60% dos pacientes naturalmente infectados podem ter quadros de recidiva. Também já foram relatados casos de acometimento neurológico por OROV, como em casos de meningoencefalite (BASTOS et al., 2012; TRAVASSOS DA ROSA et al., 2017). Embora os mecanismos de neuroinvasão por OROV em humanos não sejam totalmente entendidos, a apresentação de sintomas tardios indica que OROV podem persistir em algum sítio, numa parcela dos pacientes. Particularmente, a persistência viral em leucócitos traz impactos patogênicos importantes, incluindo a possibilidade de neuroinvasão por diferentes mecanismos, como aqueles dependentes de uma modulação inflamatória que afete a barreira hematoencefálica até aqueles que possibilitem a entrega de vírus no SNC por células migratórias infectadas, num mecanismo conhecido como cavalo de Tróia. Monócitos são amplamente descritos como cavalos de Tróia em infecções virais, como descrito para HIV, WNV e recentemente para ZIKV (DAHM et al., 2016; DIAMOND; FARZAN, 2013; FOO et al., 2017; MINER; DIAMOND; PROGRAMS, 2017; PROENCA-MODENA et al., 2018). Para OROV, estudos sugerem que esses vírus possam alcançar o SNC por transporte retrógrado ascendente a partir da infecção de terminações nervosas periféricas (SANTOS et al., 2012), ou pela via hematogênica, pela infecção de células dendríticas positivas para CD11c (PROENCA-MODENA et al., 2015). Assim, o estudo de quais células humanas podem carregar o genoma de OROV, mesmo que de maneira não produtiva, pode fornecer indícios de mecanismos associados com complicações clínicas. No presente estudo, conseguimos caracterizar que uma parte das células CD3-CD19+ possuem genoma de OROV no seu interior, além de outras populações de monócitos e linfócitos que não foram caracterizadas, até o momento.

Por fim, os resultados mostraram que pequenas porcentagens de PBMCs humanas infectadas com OROV *in vitro* podem carrear genoma viral, pelo menos até 24 horas pós infecção. Além disso, o padrão de infecção de células de linhagem corrobora com o que foi observado em cultura primária. As células, por sua vez, reconhecem os PAMPs virais e geram uma resposta imunológica. Ainda são necessários ensaios com tempos de infecção mais prolongados, principalmente com linfócitos T da linhagem Jurkat, e aprimoramentos na adaptação do protocolo de RNA PrimeFlow™ para análises dessas células por microscopia

confocal, para que possamos continuar investigando a presença de anti-genoma e partículas viáveis no sobrenadante da cultura em tempos mais tardios. Desse modo, conseguimos determinar que PBMCs humanas podem ser susceptíveis a infecção por OROV, porém com pouca produção de partículas virais viáveis em parte devido ao reconhecimento do genoma viral por PRRs com subsequente produção de interferon do tipo I e III, e da expressão dos genes induzidos por interferon. Entretanto, mesmo com essa resposta, uma parte dessas células mantém o genoma viral, levantando a possibilidade de estas servirem como fontes de vírus em microambientes específicos ou em caso de imunossupressão. Assim, é premente que se conduza estudos sobre a replicação de OROV em PBMCs humanas em condições de imunossupressão.

7 CONCLUSÕES

Diante dos resultados apresentados foi possível concluir que PBMCs humanas obtidas a partir de doadores saudáveis respondem à infecção por OROV, com aumento da expressão de IFNs do tipo I, que induzem a expressão de ISGs importantes na resposta antiviral nos primeiros momentos da infecção, incluindo moléculas sinalizadoras das vias de reconhecimento de TLR3 e RIG-I. Ademais, foi observado aumento da expressão de IFN do tipo III, que também pode culminar na expressão de ISGs, principalmente em células epiteliais. Apesar da resposta imune inata aparentemente conter a infecção *in vitro*, genoma viral ainda pode ser encontrado no interior de monócitos e linfócitos em pequenas quantidades, incluindo em células B. Entretanto, um número maior de células precisará ser analisado para identificar quais grupos de leucócitos podem ser infectados por OROV e manterem um ciclo viral produtivo.

8 ATIVIDADES COMPLEMENTARES

- **Desenho de oligonucleotídeos para detecção de OROV e outros vírus similares.** Realização de experimentos para padronizar uma metodologia de RT-qPCR que permita identificar OROV. Para isso, foram desenhados oligonucleotídeos e sondas para RT-qPCR que mostraram alta especificidade na detecção de OROV. Pretende-se testar a eficiência dos oligonucleotídeos obtidos frente a outros vírus do grupo Simbu dos *Orthobunyavirus*.
- **Padronização do ensaio de RNA PrimeFlow™ para o vírus Zika.** O ensaio será utilizado para avaliar PBMCs obtidas de pacientes naturalmente infectados por ZIKV durante o surto de 2015/2016 na região de Campinas.
- **Recebimento e processamento de amostras de pacientes obtidos pela Rede ZikaUnicamp.** Até o momento, já foram recebidas e analisadas mais de 700 amostras de pacientes com suspeita de arboviroses atendidos em unidades de saúde de Campinas. As amostras incluem sangue total, soro e urina, e são testadas para DENV, CHIKV e OROV, algumas são testadas para YFV por qRT-PCR. Também foram realizados testes sorológicos para IgG e IgM de DENV em amostras de soro.
- **Apresentação oral e de painel no XXVIII Congresso Brasileiro de Virologia e XIII Encontro de Virologia do Mercosul.** Foi apresentado o trabalho intitulado **LARGE-SCALE ANALYSIS OF IMMUNE MEDIATORS IN SERUM OF ZIKV-INFECTED PATIENTS FROM CAMPINAS-SP**. Este trabalho foi eleito melhor apresentação oral da sessão humanas e saúde pública.
- **Organização do I e II Curso de Verão de Imunologia da Unicamp.** Com a participação também como palestrante e tutoria nas aulas práticas no Laboratório de Estudos de Vírus Emergentes (LEVE).
- **Programa de Estágio Docente (PED).** Atuação como PED C, com realização de atividades de apoio à docência parcial na disciplina de Microbiologia BM382, no Instituto de Biologia da Unicamp.
- **Participação como monitora no programa UPA – Unicamp de Portas Abertas.** Onde ajudou na organização dos *stands* e monitoria na ala de Microbiologia.
- **Apresentação oral e de painel no XXIX Congresso Brasileiro de Virologia e XII Encontro de Virologia do Mercosul, e apresentação de painel no GB Meeting.** Com

apresentação de trabalho intitulado **SINGLE-CELL IDENTIFICATION OF OROPOUCHE VIRUS INFECTION BY RNA PRIMEFLOW.**

9 PUBLICAÇÕES NO PERÍODO

As atividades complementares permitiram com que eu participasse da elaboração de três artigos científicos, um já publicado no JID, um aceito para a publicação também no JID e um publicado na *Frontiers in Microbiology*. No primeiro, listado abaixo, descrevemos marcadores imunológicos associados com o desenvolvimento de complicações clínicas por ZIKV. No segundo, identificamos diferentes epítomos para o vírus ZIKV, a partir antígenos imunogênicos de soro de pacientes naturalmente infectados. No terceiro, pude participar de um estudo na área de bacteriologia, onde realizei ensaios para a avaliação do perfil de citocinas inflamatórias. Em paralelo, estamos caracterizando a utilização de oligonucleotídeos para os orthobunyavírus do grupo Simbu em programas de vigilância epidemiológicas para arbovírus. Também pude participar de um estudo onde está sendo feita uma descrição dos aspectos clínicos e epidemiológicos associados com a detecção de arbovírus em pacientes com manifestações neurológicas em Campinas nos anos de 2016 e 2017.

1. Kam, YW; Leite, JA; Lum, FK; Tan, JLL; Lee, B; Judice, CC; De Toledo Teixeira, DA; Santos, RA; Vinolo, MA; Angerami, R; Resende, MR; Freitas, ARR; Amaral, E; Junior, RP; Costa, ML; Guida, JP; Arns, CW; Ferreira, LC; Rénia, L; Proença-Modena, JL; Ng, LFP; Costa, FTM and **Zika-Unicamp Network**. Specific biomarkers associated with neurological complications and congenital CNS abnormalities from Zika virus-infected patients in Brazil. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 216, p. 172-181, 2017.
2. Kam, YW; Leite, JA; Amrun, SN; Lum, FM; Yee, WX; Bakar, FA; Eng, KE; Lye, DC; Yee-Sin Leo, Chia-Yin Chong, Milanez, GP; Proença-Modena, JL; Rénia, L; Costa, FTM; Ng, LFP; **Zika-Unicamp Network**. ZIKV-specific NS1 epitopes as serological markers of acute Zika virus infection. *The Journal of Infectious Diseases*, 2019.
3. Milanez, GP; Werle, CH; **Amorim, MR**; Ribeiro, RA; Tibo, LHS; Roque-Barreira, MC; Oliveira, AF; Brocchi, M. HU-Lacking Mutants of Salmonella enterica Enteritidis Are Highly Attenuated and Can Induce Protection in Murine Model of Infection. *Frontiers in Microbiology*, v.9, p. 1-10.

10 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A. K.; SHARPE, A. H. Dendritic cells give and take away. **Nature Immunology**, v. 6, n. 3, p. 227–228, 2005.
- ANAFU, A. A. et al. Interferon-inducible transmembrane protein 3 (IFITM3) restricts reovirus cell entry. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 24, p. 17261–17271, 2013.
- BARBOSA, N. S. et al. ESCRT machinery components are required for Orthobunyavirus particle production in Golgi compartments. **PLOS Pathogens**, v. 14, n. 5, p. 1–21, 2018.
- BASTOS, M. D. S. et al. Short report: Identification of oropouche Orthobunyavirus in the cerebrospinal fluid of three patients in the Amazonas, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, n. 4, p. 732–735, 2012.
- BAXTER, A. E. et al. Multiparametric characterization of rare HIV- infected cells using an RNA-flow FISH technique. **Nature Protocols**, v. 12, n. 10, p. 2029–2049, 2017.
- BOWEN, J. R. et al. Zika Virus Antagonizes Type I Interferon Responses during Infection of Human Dendritic Cells. **PLOS Pathogens**, v. 13, n. 2, p. 1–30, 2017.
- BURRELL, C. J. et al. **Emerging Virus Diseases**. 5. ed. [s.l.] Elsevier, 2017.
- DAHM, T. et al. Neuroinvasion and Inflammation in Viral Central Nervous System Infections. **Mediators of Inflammation**, v. 2016, p. 1–16, 2016.
- DENIZOT, M.; NEAL, J. W.; GASQUE, P. Encephalitis due to emerging viruses: CNS innate immunity and potential therapeutic targets. **Journal of Infection**, v. 65, n. 1, p. 1–16, 2012.
- DIAMOND, M. S.; FARZAN, M. The broad-spectrum antiviral functions of IFIT and IFITM proteins. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 1, p. 46–57, 2013.
- DOHERTY, U. N. A. O.; SWIGGARD, W. J. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Spinoculation Enhances Infection through Virus Binding. **Journal of Virology**, v. 74, n. 21, p. 10074–10080, 2000.
- DOUAM, F. et al. Single-cell tracking of flavivirus RNA uncovers species-specific interactions with the immune system dictating disease outcome. **Nature Communications**, v. 8, p. 1–17, 2017.
- ELLIOTT, R. M. Orthobunyaviruses: recent genetic and structural insights. **Nature reviews. Microbiology**, v. 12, n. 10, p. 673–685, 2014.
- ELLIOTT, R. M.; WEBER, F. Bunyaviruses and the type I interferon system. **Viruses**, v. 1, n. 3, p. 1003–1021, 2009.

- FOO, S.-S. et al. Asian Zika virus strains target CD14⁺ blood monocytes and induce M2-skewed immunosuppression during pregnancy. **Nature Microbiology**, v. 2, p. 1558–1570, 2017.
- HALLER, O. et al. Mx GTPases: dynamin-like antiviral machines of innate immunity. **Trends in Microbiology**, v. 23, n. 3, p. 154–163, 2015.
- HALLER, O.; KOCHS, G.; WEBER, F. The interferon response circuit: Induction and suppression by pathogenic viruses. **Virology**, v. 344, n. 1, p. 119–130, 2006.
- HAMEL, R. et al. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. **Journal of virology**, v. 89, n. 17, p. 8880–96, 2015.
- HARPER, M. S. et al. Interferon- α Subtypes in an Ex Vivo Model of Acute HIV-1 Infection: Expression, Potency and Effector Mechanisms. **PLOS Pathogens**, v. 11, n. 11, p. 1–24, 2015.
- HEMANN, E. A.; GALE JR, M.; SAVAN, R. Interferon Lambda Genetics and Biology in Regulation of Viral Control. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. 1707, p. 1–12, 2017.
- HOLZINGER, D. et al. Induction of MxA Gene Expression by Influenza A Virus Requires Type I or Type III Interferon Signaling. **Journal of Virology**, v. 81, n. 14, p. 7776–7785, 2007.
- HONG, Y. et al. Innate immune evasion by hepatitis B virus-mediated downregulation of TRIF. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 463, n. 4, p. 719–725, 2015.
- JACKSON, A. C. **VIRAL MENINGITIS AND ENCEPHALITIS**. First Edit ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2014. v. 2
- JACOBS, J. L. et al. Regulation of mitochondrial antiviral signaling (MAVS) expression and signaling by the mitochondria-associated endoplasmic reticulum membrane (MAM) protein Gp78. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, n. 3, p. 1604–1616, 2014.
- KAM, Y.-W. et al. Specific biomarkers associated with neurological complications and congenital CNS abnormalities from Zika virus-infected patients in Brazil. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 216, n. 2, p. 172–181, 2017.
- KOYUNCU, O. O.; HOGUE, I. B.; ENQUIST, L. W. Review Virus Infections in the Nervous System. **Cell Host and Microbe**, v. 13, n. 4, p. 379–393, 2013.
- LEE, A. J.; ASHKAR, A. A. The Dual Nature of Type I and Type II Interferons. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. 2061, p. 1–10, 2018.
- LI, K. et al. Activation of cyclic adenosine monophosphate pathway increases the sensitivity of cancer cells to the oncolytic Virus M1. **Molecular Therapy**, v. 24, n. 1, p. 156–165,

2016.

- LIANG, G.; GAO, X.; GOULD, E. A. Factors responsible for the emergence of arboviruses; strategies, challenges and limitations for their control. **Emerging Microbes and Infections**, v. 4, n. 3, p. 1–5, 2015.
- LIVONESI, M. C. et al. In vitro and in vivo studies of the Interferon-alpha action on distinct Orthobunyavirus. **Antiviral Research**, v. 75, p. 121–128, 2007.
- LUNA, L. K. DE S. et al. Oropouche Virus Is Detected in Peripheral Blood Leukocytes From Patients. **Journal of Medical Virology**, v. 89, p. 1108–1111, 2017.
- MARQ, J.; KOLAKOFSKY, D.; GARCIN, D. Unpaired 5 ppp-Nucleotides , as Found in Arenavirus Double-stranded RNA Panhandles , Are Not Recognized by RIG-I. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 24, p. 18208–18216, 2010.
- MAVALANKAR, D. et al. Increased mortality rate associated with chikungunya epidemic, Ahmedabad, India. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 3, p. 412–415, 2008.
- MAVIAN, C. et al. Emergence of recombinant Mayaro virus strains from the Amazon basin. **Scientific Reports**, v. 7, n. 8718, p. 1–11, 2017.
- MELLMAN, I. Dendritic cells: master regulators of the immune response. **Cancer Immunology Research**, v. 1, n. 3, p. 145–149, 2013.
- MICKE, P. et al. Biobanking of fresh frozen tissue: RNA is stable in nonfixed surgical specimens. **Laboratory Investigation**, v. 86, p. 202–211, 2006.
- MINER, J. J.; DIAMOND, M. S.; PROGRAMS, I. Mechanisms of restriction of viral neuroinvasion at the blood- brain barrier. **Curr Opin Immunol**, v. 38, p. 18–23, 2017.
- MUDHASANI, R. et al. IFITM-2 and IFITM-3 but Not IFITM-1 Restrict Rift Valley Fever Virus. **Journal of Virological Methods**, v. 87, n. 15, p. 8451–8464, 2013.
- OLSZANSKI, G. et al. Apoptosis induced by Oropouche virus infection in HeLa cells is dependent on virus protein expression. **Virus Research**, v. 149, p. 56–63, 2010.
- PAPANERI, A. The cell biology of rabies virus: using stealth to reach the brain. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 1, p. 51–61, 2010.
- PINTO, A. K. et al. Human and Murine IFIT1 Proteins Do Not Restrict Infection of Negative-Sense RNA Viruses of the Orthomyxoviridae, Bunyaviridae, and Filoviridae Families. **Journal of Virology**, v. 89, n. 18, p. 9465–9476, 2015.
- PROENCA-MODENA, J. L. et al. Oropouche virus infection and pathogenesis are restricted by MAVS, IRF-3, IRF-7, and type I interferon signaling pathways in nonmyeloid cells. **Journal of virology**, v. 89, n. 9, p. 4720–37, 2015.
- PROENCA-MODENA, J. L. et al. Zika virus: lessons learned in Brazil. **Microbes and**

- Infection**, p. 1–9, 2018.
- ROMERO-ALVAREZ, D.; ESCOBAR, L. E. Vegetation loss and the 2016 Oropouche fever outbreak in Peru. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 4, p. 292–298, 2017.
- ROMERO-ALVAREZ, D.; ESCOBAR, L. E. Oropouche fever, an emergent disease from the Americas. **Microbes and Infection**, v. 20, n. 3, p. 135–146, 2018.
- SANTOS, R. I. et al. Experimental infection of suckling mice by subcutaneous inoculation with Oropouche virus. **Virus Research**, v. 170, n. 1–2, p. 25–33, 2012.
- SANTOS, R. I. M. et al. Oropouche virus entry into HeLa cells involves clathrin and requires endosomal acidification ζ . **Virus Research**, v. 138, p. 139–143, 2008.
- SCHÄFER, A. et al. The Role of the Blood-Brain Barrier during Venezuelan Equine Encephalitis Virus Infection. **Journal of Virology**, v. 85, n. 20, p. 10682–10690, 2011.
- SCHLEE, M. Immunobiology Master sensors of pathogenic RNA – RIG-I like receptors. **Immunobiology**, v. 218, n. 11, p. 1322–1335, 2013.
- SCHÖBEL, A.; RÖSCH, K.; HERKER, E. Functional innate immunity restricts Hepatitis C Virus infection in induced pluripotent stem cell-derived hepatocytes. **Scientific Reports**, v. 8, n. 3893, p. 1–12, 2018.
- SHAO, W. et al. Double-stranded RNA innate immune response activation from long-term adeno-associated virus vector transduction. **JCI Insight**, v. 3, n. 12, p. 1–15, 2018.
- SONG, P. et al. Deficient humoral responses and disrupted B-cell immunity are associated with fatal SFTSV infection. **Nature Communications**, v. 9, n. 3328, p. 1–15, 2018.
- SUN, X. et al. Transcriptional changes during naturally-acquired Zika Virus infection render dendritic cells highly conducive to viral replication. **Cell Reports**, v. 21, n. 12, p. 3471–3482, 2018.
- SUTHAR, M. S.; DIAMOND, M. S.; GALE, M. West Nile virus infection and immunity. **Nature Reviews Microbiology**, v. 11, n. 2, p. 115–28, 2013.
- TAYLOR, K. G.; PETERSON, K. E. Innate immune response to La Crosse virus infection. **Journal of Neurovirology**, v. 20, n. 2, p. 150–156, 2014.
- TRAVASSOS DA ROSA, J. F. et al. Oropouche virus: Clinical, epidemiological, and molecular aspects of a neglected orthobunyavirus. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, n. 5, p. 1019–1030, 2017.
- VERNAL, S.; MARTINI, C. C. R.; FONSECA, B. A. L. Oropouche Virus–Associated Aseptic Meningoencephalitis, Southeastern Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 25, n. 2, p. 380–382, 2019.
- VIELLE, N. J. et al. Silent infection of human dendritic cells by African and Asian strains of

Zika virus. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–12, 2018.

WANG, T. et al. Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. **Nature Medicine**, v. 10, n. 12, p. 1366–1373, 2004.

WU, W. et al. RIG-I and TLR3 are both required for maximum interferon induction by influenza virus in human lung alveolar epithelial cells. **Virology**, v. 482, p. 181–188, 2015.

11 ANEXOS

11.1 Termo de bioética



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Ativação de subtipos de células mononucleares do sangue periférico, com ênfase nas células dendríticas, durante a infecção pelos vírus Zika e Oropouche

Pesquisador: MARIENE RIBEIRO AMORIM

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 89082718.5.0000.5404

Instituição Proponente: Instituto de Biologia - Unicamp

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

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.845.037

Apresentação do Projeto:

Eventos precoces durante uma infecção viral por arbovírus como a resposta mediada pelas células dendríticas e monócitos, são determinantes para a eliciação de uma resposta imune adaptativa efetiva e os consequentes resultados clínicos. O presente projeto objetiva analisar os perfis de células mononucleares de sangue periférico (PBMCs) humano após infecção pelos vírus Zika (ZIKV) e Oropouche (OROV), com ênfase na ativação de células dendríticas convencionais (cDCs) e plasmocitóides (pDCs), bem como a replicação viral nessas células. Para isso, serão utilizadas amostras de pacientes naturalmente infectados, obtidas com o auxílio da rede de vigilância de arboviroses montada pela Unicamp, RedeZikaUNICAMP a partir de 2016, num projeto já aprovado pela CEP (CAAE: 56793516.0.0000.5404). Também analisaremos o efeito da infecção in vitro por ZIKV e OROV em PBMCs de doadores saudáveis, a fim de avaliar a ativação de células dendríticas derivadas de monócitos (moDCs) e a produção de citocinas ao longo da infecção por esses vírus.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar a ativação de cDCs, pDCs e moDCs no processo infeccioso por ZIKV e OROV e a importância dessas células na evolução clínica.

Objetivo Secundário:

Determinar a capacidade de OROV e ZIKV de se replicar em outras células imunológicas do grupo

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



Continuação do Parecer: 2.845.037

das PBMCs a partir de infecções in vitro usando a metodologia de Primeflow e avaliar a ativação e a produção de citocinas e quimiocinas em moDCs infectadas com OROV e ZIKV in vitro.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

RICOS: exames clínicos, e provoca uma leve dor no local da punção venosa, não apresentando riscos previsíveis ao doador. Você não deve participar deste estudo se teve doença de caráter febril nos últimos dois meses, ou se faz uso no momento medicamentos antimicrobianos ou anti-inflamatórios.

Benefícios: Não haverão benefícios diretos. Porém, sua colaboração irá ajudar na geração de dados que o beneficiará indiretamente, uma vez que serão gerados dados importantes para a saúde pública, e que irão ajudar a entender as doenças causadas por esses vírus.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O presente trabalho trata-se de um subprojeto do Projeto Jovem Pesquisador do Professor José Luiz P. Módena, intitulado Patogênese e neurovirulência de vírus emergentes no Brasil. Objetiva-se analisar a ativação de células mononucleares do sangue periférico (PBMCs), com ênfase nas células dendríticas (DCs), pelos vírus Zika (ZIKV) e Oropouche (OROV), bem como a replicação viral nessas células. A princípio, serão avaliadas células de amostras de sangue total de pacientes naturalmente infectados por ZIKV, com o auxílio da rede de vigilância de arboviroses montada pela Unicamp, RedeZikaUNICAMP. Também será feito um estudo in vitro com PBMCs infectadas com ZIKV e OROV, e a diferenciação in vitro de células dendríticas derivadas de monócitos (moDCs) obtidos de doadores voluntários saudáveis, a fim de avaliar a resposta imune dessas células à infecção por OROV e por uma linhagem de ZIKV brasileira.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

1. Folha de rosto: adequado;
2. Vínculo institucional: adequado;
3. Projeto original: adequado;
4. Orçamento: adequado;
5. Cronograma: adequado;

Para adequar pendências do parecer 2.756.142 :

- CartaResposta.pdf 16/08/2018 : refere que as alterações foram realizadas e apresenta algumas respostas.
- biorrepositorio.pdf 16/08/2018 : adequado.

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



Continuação do Parecer: 2.845.037

- CartaAutorizacao.pdf 16/08/2018 : anuência para utilização de 75 amostras coletadas em outro projeto (CAAE: 56793516.0.0000.5404).
- ProjetoDetalhadoCEP.pdf 16/08/2018 : projeto com destaque nas alterações.
- TCLEdoadoressaudaveis.pdf 16/08/2018 : Adequado.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Em consideração ao parecer anterior Número do Parecer: 2.756.142 de 05 de Julho de 2018, pesquisador :

- Apresenta regulamentação do biorrepositório.
- Adequa TCLE.
- CartaAutorizacao.pdf 16/08/2018 : anuência para utilização de 75 amostras coletadas em outro projeto (CAAE: 56793516.0.0000.5404).
- Apresenta alterações com destaque no projeto completo.

CONCLUSÃO: projeto aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

- O participante da pesquisa deve receber uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (quando aplicável).
- O participante da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (quando aplicável).
- O pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado. Se o pesquisador considerar a descontinuação do estudo, esta deve ser justificada e somente ser realizada após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou. O pesquisador deve aguardar o parecer do CEP quanto à descontinuação, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao participante ou quando constatar a superioridade de uma estratégia diagnóstica ou terapêutica oferecida a um dos grupos da pesquisa, isto é, somente em caso de necessidade de ação imediata com intuito de proteger os participantes.
- O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo. É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.
- Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas e aguardando a

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



Continuação do Parecer: 2.845.037

aprovação do CEP para continuidade da pesquisa.

- Em caso de projetos do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma, junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial.

- Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, inicialmente seis meses após a data deste parecer de aprovação e ao término do estudo. -Lembramos que segundo a Resolução 466/2012, item XI.2 letra e, "cabe ao pesquisador apresentar dados solicitados pelo CEP ou pela CONEP a qualquer momento".

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

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1114271.pdf	16/08/2018 13:54:43		Aceito
Outros	CartaResposta.pdf	16/08/2018 13:13:10	MARIENE RIBEIRO AMORIM	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	biorepositorio.pdf	16/08/2018 13:12:34	MARIENE RIBEIRO AMORIM	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLEdoadoressaudaveis.pdf	16/08/2018 13:08:46	MARIENE RIBEIRO AMORIM	Aceito
Outros	CartaAutorizacao.pdf	16/08/2018 13:05:38	MARIENE RIBEIRO AMORIM	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetodetalhadoCEP.pdf	16/08/2018 13:04:13	MARIENE RIBEIRO AMORIM	Aceito
Outros	CartaparaCEP.pdf	13/06/2018 17:21:24	MARIENE RIBEIRO AMORIM	Aceito
Outros	AtestadoMatricula.pdf	09/06/2018 21:51:43	MARIENE RIBEIRO AMORIM	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto.pdf	08/06/2018 09:40:58	MARIENE RIBEIRO AMORIM	Aceito

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



Continuação do Parecer: 2.845.037

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINAS, 26 de Agosto de 2018

Assinado por:

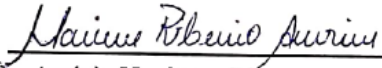
**Maria Fernanda Ribeiro Bittar
(Coordenador)**

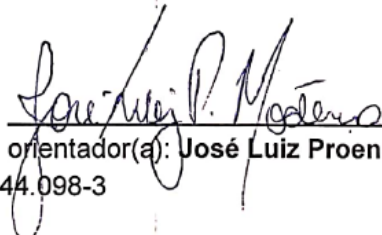
11.2 Declaração de direitos autorais

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE INATA DE PBMCS HUMANAS FRENTE A INFECÇÃO POR VÍRUS OROPOUCHE**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 12 de abril de 2019

Assinatura : 
Nome do(a) autor(a): **Mariene Ribeiro Amorim**
RG n.º 11.502.919-23

Assinatura : 
Nome do(a) orientador(a): **José Luiz Proença Módena**
RG n.º 32.744.098-3