



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA**

MICHAEL EDWARD MILLER

**Ação reguladora de genes estimulados por Interferon
(ISGs) na infecção pelo vírus Oropouche (OROV)**

CAMPINAS-SP

2019

MICHAEL EDWARD MILLER

**Ação reguladora de genes estimulados por Interferon
(ISGs) na infecção pelo vírus Oropouche (OROV)**

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

ESTE ARQUIVO CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DEFENDIDA PELO
ALUNO MICHAEL EDWARD MILLER E
ORIENTADO PELA PROFA. DRA.
CLARICE WEIS ARNS.

Orientador: Profa. Dra. Clarice Weis Arns

Coorientador: Prof. Dr. José Luiz Proença Modena

CAMPINAS-SP

2019

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

M616a Miller, Michael Edward, 1980-
Ação reguladora de genes estimulados por Interferon (ISGs) na infecção pelo vírus Oropouche (OROV) / Michael Edward Miller. – Campinas, SP : [s.n.], 2019.

Orientador: Clarice Weis Ams.
Coorientador: José Luiz Proença Modena.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Fatores reguladores de interferon. 2. Imunidade. 3. Oropouche orthobunyavirus. 4. Citometria de fluxo. 5. Vetores genéticos. I. Ams, Clarice Weis, 1956-. II. Proença Modena, José Luiz, 1979-. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Regulatory action of Interferon-stimulated genes (ISGs) in Oropouche virus infection

Palavras-chave em inglês:

Interferon regulatory factors

Immunity

Oropouche orthobunyavirus

Flow cytometry

Genetic vectors

Área de concentração: Microbiologia

Titulação: Mestre em Genética e Biologia Molecular

Banca examinadora:

Clarice Weis Ams [Orientador]

Marcelo Lancelloti

Luís Antonio Peroni

Data de defesa: 31-07-2019

Programa de Pós-Graduação: Genética e Biologia Molecular

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

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-7353-3412>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/9700340500627311>

Campinas, 31 de julho de 2019

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. CLARICE WEIS ARNS

Prof. Dr. MARCELO LANCELLOTTI

Dr. LUIS ANTÔNIO PERONI

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

“Dedico este trabalho aos meus pais, a minha irmã e aos meus Mestres”

AGRADECIMENTOS

- À UNICAMP pela oportunidade acadêmica no programa de pós-graduação;
- Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular do IB/UNICAMP pela oportunidade de realização deste trabalho;
- Ao Instituto Pirbright – UK pela colaboração técnico e científico ao projeto;
- Ao CNPEM/LNBio pela oportunidade de colaborar e infraestrutura;
- À minha orientadora, Prof. Dra. Clarice Weis Arns, pelo acolhimento e oportunidade, pela confiança e liberdade em desenvolver minhas idéias e criatividade;
- Ao meu coorientador, Prof. Dr. José Luiz Proença Modena pelo acolhimento e oportunidade, por sua paciência e instruções (LEVE – IB/UNICAMP);
- Ao Prof. Dr. Paulo Anselmo Nunes Felipe, pelas inúmeras oportunidades e confiança, por seus ensinamentos e amizade;
- Ao meu Primeiro Mestre, Prof. Dr. Reinaldo Bolognini Orsi, pela inspiração, paciência, ensinamentos e amizade;
- Ao Dr. Marcio Chaim Bajgelman pela colaboração técnica científica e acolhimento no Laboratório de Vetores Virais (LVV - CNPEM/LNBio);
- À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo no 14/50696-4 que financiou a pesquisa;
- À Fundação de Desenvolvimento da UNICAMP (FUNCAMP) pela bolsa de estudos;
- Aos meus pais Maria Sebastiana Miller e John Edward Leon Miller pelo amor e apoio incondicional. Graças ao trabalho e dedicação de vocês, este momento se tornou possível. A minha irmã Chris por estar sempre presente. Amo vocês!
- Aos meus colegas do Laboratório de Virologia Animal (LVA), pelo aprendizado técnico, momentos de descontração e troca de experiências;
- À Dra. Soledad Palameta por seus ensinamentos e orientações, além da ajuda na realização de vários experimentos e principalmente pela paciência, amizade e carinho;
- À Jéssica M. Toscaro por seus ensinamentos, paciência e contribuições técnicas e científicas (LVV-CNPEM/LNBio);
- À Msc. Maria Eugênia Camargo por sua expertise em Citômetria de Fluxo (LVV-CNPEM/LNBio);
- À Msc. Mariene Ribeiro Amorim por sua paciência e contribuições técnicas e científicas que permitiram a conclusão desse projeto (LEVE – IB/UNICAMP);
- A todos que de alguma maneira, contribuíram para a realização deste trabalho.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Fundação de Desenvolvimento da Unicamp (FUNCAMP), por meio da concessão de bolsa de estudo.

Contamos também com o apoio estrutural e profissional especializado do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), Campinas – São Paulo.

Este trabalho também teve apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) na modalidade Auxílios Regulares à pesquisa (processo 14/50696-4) através do acordo de cooperação com o UK Research and Innovation (UKRI) - Biotechnology and Biological Sciences Research Council (BBSRC) e The Pirbright Institute.

As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade do(s) autor(es) e não necessariamente refletem a visão da FAPESP.

RESUMO

O sistema de interferon (IFN) é filogeneticamente antigo e desempenha papel essencial na resposta contra vírus, uma vez que ele é capaz de controlar a maioria das infecções virais, mesmo na ausência da imunidade adaptativa. Os fatores celulares que medeiam essa defesa são produtos de genes estimulados por Interferon (ISGs). Embora centenas de ISGs tenham sido identificados desde sua descoberta há mais de 25 anos, ainda não sabemos quais genes são essenciais para o controle de arbovírus emergentes brasileiros, como o vírus Oropouche (OROV). OROV é prevalente em toda região Amazônica, associado com quadros clínicos debilitantes, que podem variar desde quadros febris-exantemáticos até quadros graves, com acometimento neurológico. Assim, a compreensão das complexas interações entre OROV e seus hospedeiros serão cruciais para determinação dos fatores patogénéticos associados com o desenvolvimento de doenças graves, assim como para o desenvolvimento de estratégias de controle. Desse modo, analisamos o papel de 12 ISGs (IFIT1, IFITM1, IFIT2, IFITM2, IFIT3, IFITM3, IFIT5, ADAR, IRF1, LY6E, ISG20 e BST2) no controle da infecção por OROV a nível celular. Para isso, Citometria de Fluxo (FACS) foi aplicada para quantificar a taxa de infecção por OROV em células geneticamente modificadas que superexpressavam esses 12 ISGs. Para tanto, células de linhagem humana (HT1080) foram transduzidas com uma minibiblioteca de vetores lentivirais expressando ISGs e infectadas com OROV. Os dados demonstraram que alguns ISGs podem ser essenciais no controle do OROV, visto que a superexpressão desses genes diminuiu significativamente a taxa de infecção por esse vírus. Particularmente, LY6E apresentou resultados mais promissores, pois a inibição da infecção por OROV foi acompanhada do aumento significativo da expressão desse gene após transdução com o vetor lentiviral. Desta forma, esse estudo fornece a primeira evidência do papel de LY6E na restrição da replicação de OROV. Estudos mais aprofundados são necessários para entender o papel do produto desse gene e do polimorfismo inerente a ele no controle ou desenvolvimento de doença por esse importante arbovírus emergente brasileiro.

Palavras chave: ISGs; imunidade; Oropouche; Citometria de Fluxo; vetores lentivirais.

ABSTRACT

The interferon (IFN) system is phylogenetically ancient and plays an essential role in response against viruses as it is able to control most viral infections, even in the absence of adaptive immunity. The cellular factors that mediate this defense are Interferon-stimulated gene products (ISGs). Although hundreds of ISGs have been identified since their discovery over 25 years ago, it is still unknown which of these genes are essential in controlling Brazilian emerging arboviruses such as Oropouche virus (OROV). OROV is prevalent throughout the Amazon region and it is associated with debilitating clinical conditions which may range from its febrile exanthematic form to more severe conditions such as neurological impairment. Thus, understanding the complex interactions between OROV and its hosts will be crucial for determining pathogenetic factors associated with the development of serious diseases, as well as for the development of control strategies. Therefore, we analyzed the role of 12 ISGs (IFIT1, IFITM1, IFIT2, IFITM2, IFIT3, IFITM3, IFIT5, ADAR, IRF1, LY6E, ISG20 and BST2) in controlling OROV infection at the cellular level. To this end, the Flow Cytometry (FACS) technique was applied to quantify OROV infection rates in genetically modified cells overexpressing each of these 12 ISGs. Human lineage cells (HT1080) were then transduced with a mini library of lentiviral vectors expressing ISGs and infected with OROV. The results showed that some ISGs may be essential in controlling OROV infection, since overexpression of one of these genes significantly decreased infection by the virus. Particularly, LY6E showed more promising results, as inhibition of OROV infection was accompanied by significant increase in expression of this gene after transduction with the lentiviral vector. Hence, this study provides the first evidence on the role of LY6E in restricting OROV replication. Further studies are needed to better understand the role of the product of this gene and its inherent polymorphism on controlling the progression of disease resulted from this important emerging Brazilian arbovirus.

Keywords: ISGs; immunity; Oropouche; Flow Cytometry; lentiviral vectors.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Vias de indução celular na produção e sinalização a jusante de IFN α/β ...	19
Figura 2. IFNs Tipo I durante a infecção viral e estímulo dos ISGs	20
Figura 3. Inibição da replicação viral por ISGs	22
Figura 4. Figura esquemática dos <i>Orthobunyavirus</i>	29
Figura 5. Ciclo de replicação dos <i>Orthobunyavirus</i>	30
Figura 6. Delineamento experimental	35
Figura 7. Mapa do vetor	39
Figura 8. Detalhamento da localização das regiões de interesse para a caracterização do vetor lentiviral	41
Figura 9. Titulação das produções de lentivirus por FACS	42
Figura 10. Cinéticas de infecção e expressão de IFNs α/β frente ao OROV	51
Figura 11. Mapa de digestão para comprovação dos vetores	53
Figura 12. Percentual de células infetadas (% FITC) dentro da população de células transduzidas	55
Figura 13. RT-qPCR de células HT1080 infectadas com OROV e não transduzidas	56
Figura 14. RT-qPCR de células HT1080 transduzidas com lentivirus expressando ISGs humanos	57
Figura 15. RT-qPCR de células HT1080 transduzidas com lentivirus expressando ISGs humanos seguido de infecção com OROV	57
Quadro 1. Relação de vetores recebidos	39
Quadro 2. Títulos de lentivirus expressando ISGs	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação e características dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação das sequências alvo	41
Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados para detecção do OROV	47
Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados para qPCR, SYBER Green.	48
Tabela 4. Relação dos títulos de OROV produzidos nas passagens consecutivas a partir da alíquota inicial recebida de vírus em 4ª passagem	50

LISTA DE ABREVIATURAS

5'-pppRNA - 5' triphosphate double stranded RNA synthetic ligand for the retinoic acid-inducible protein I
amiRNA – microRNA artificial
ANOVA - Análise de variância
APCs - Células Apresentadoras de Antígenos
ATCC - American Type Culture Collection
BBSRC - Biotechnology and Biological Sciences Research Council
cDNA - DNA complementar
cGAS - GMP-AMP cíclico sintase (*Cyclic GMP-AMP synthase*)
CHIKV - Vírus Chicungunha
CIBIO - Comissão Interna de Biossegurança
CME - *Clathrin-Mediated Endocytosis*
CMV - *Cytomegalovirus Promoter*
CNPEM - Centro de Pesquisa em Energia e Materiais
CV – Controle de infecção / vírus
DAI - *DNA-dependent activator of Interferon-regulatory factors*
DC - Célula Dendrítica
DENV - Vírus da Dengue
DMEM - Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DNA - Ácido desoxirribonucleico (*Desoxyribonucleic acid*)
dsRNA - *double-stranded RNA*
EBOV - Vírus Ebola
eIF2 α - *Eukaryotic Initiation Factor 2*
ELISA - Ensaio de Imunoabsorção Enzimática
FACS - Separador Celular Ativado por Fluorescência
FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FFA – *Focus Formation Assay*
FFU - *Focus Forming Units*
FITC - *Fluorescein Isothiocyanate*
Fluc - *Firefly Luciferase Gene*
GAPDH - Gliceraldeído-3 Fosfato Desidrogenase
GAS - Genes Pró-Inflamatórios e Apoptóticos
h.p.i. - Horas Pós Infecção
HBV - Vírus da Hepatite B
HCV - Vírus da Hepatite C
HI - Teste de Inibição da Hemaglutinação
HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana
HTNV - Vírus Hantaan
HTS - Rastreamento de Alto Rendimento
i.p. - Intraperitoneal
IAV - Vírus da Influenza A
IFI16 - *Gamma-interferon-inducible protein 16*
IFITMs - *Interferon-Induced Transmembrane Proteins*
IFITs - *Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats*
IFN - *Interferon*
IFNAR - Receptor de Interferon Tipo I
IFNAR2 - Interferon Alpha and Beta Receptor Subunit 2

IFNGR - Receptor de Interferon Tipo II
IgM - Imunoglobulina M
IL - Interleucina
IRF - Fator Regulador do Interferon
ISGF3 - Complexo de Fator 3 do Gene Estimulador de Interferon
ISGs - Genes Estimulados por Interferon
ISREs - Promotores que Contém Elementos da Resposta Estimulada por Interferon
JAK - Enzima Janus Kinase
LACV - Vírus La Crosse
LB - Luria-Bertani
LEVE - Laboratório de Estudos de Vírus Emergentes
LNBio - Laboratório Nacional de Biociências
LVV - Laboratório de Vetores Virais
MAVS - Sinalização mitocondrial antiviral (*Mitochondrial anti-viral signaling protein*)
MDA-5 - Proteína associada à diferenciação do melanoma 5 (Melanoma differentiation associated protein 5)
Mga - *MAX Dimerization Protein MGA*
MHV-68 - *Murid gammaherpesvirus 68*
MOI - Multiplicidade de Infecção
mRNA - RNA mensageiro
NF- κ B - *Nuclear Factor Kappa-Light-Chain-Enhancer of Activated B Cell Protein Complex*
NK - Célula Natural Killer
NSs – *Non-Structural proteins*
OAS - Oligoadenilato sintetase 2'-5 '
ON - *Over Night*
ORFs - Fase de Leitura Aberta (Open Reading Frames)
OROF - Febre de Oropouche
OROV - Vírus Oropouche
p.i. - Pós Infecção
PAMPs - Padrões moleculares associados a patógenos (*Pathogen associated molecular patterns*)
PBS - Tampão fosfato salino (*Phosphate buffered saline*)
pCMV-gag-pol - *Group Antigen Polyprotein & Reverse Transcriptase Retroviral Protein Plasmid*
PCR - Reação em cadeia da polimerase (*Polimerase chain reaction*)
PE - *Phycoerythrin Channel*
PKR - *RNA-dependent protein kinase*
PRRs - Receptores de reconhecimento de padrões (*Pathogen recognition receptor*)
PWB - *Perm/Wash Buffer*
qPCR - PCR quantitativo em tempo real
RCUK - Research Councils UK
RdRp - RNA-polimerase-RNA-dependente
RFP - *Red Fluorescent Protein Gene*
RIG-I - Receptores do tipo RLR (*RIG-I-like receptor*)
RNA - Ácido Ribonucleico
RNAi - *RNA interference*
RNaseL – Proteína Ribonuclease L
RT-qPCR - Reação em cadeia da polimerase da transcrição reversa em tempo real
SARS - Vírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave

SEM - Erro Padrão da Amostra
SFB - Soro Fetal Bovino
shRNA - *Artificial short hairpin RNA*
SINV - Vírus Sindbis
siRNA - Small Interfering RNA
SIV - Vírus da Imunodeficiência Símia
SNC - Sistema Nervoso Central
ssRNA - *single-stranded RNA*
STAT - Sinal Transdutor e Fator de Transcrição
STING - Estimulador de genes para IFN (*Stimulator of interferon genes*)
TLR – Receptores do tipo Toll (*Toll-like receptor*)
TRIM5α - Proteína Tripartite Motif
VEEV - Vírus da Encefalite Equina Venezuelana
VSV - Vírus da Estomatite Vesicular
WNV - Vírus do Oeste do Nilo
YFV - Vírus da Febre Amarela
Zfx - *Zinc Finger Transcription Factor*

µg/mL - Microgramas por mililitro
µL - Microlitro
µM - Micromolar
C - Centígrados
FFU/mL - *Focus Forming Units* por mililitro
g - Aceleração da gravidade ($\cong 9,8\text{m/s}^2$)
Kb - Kilobase
mL – Mililitro
ng – Nano gramas
nM – Nano Molar
pH - Potencial de hidrogênio
rpm - Revoluções por Minuto

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. Resposta imune inata a infecções virais	18
1.2. Interferons Tipo I, II e III	18
1.3. Genes Estimulados Interferon (ISGs)	19
1.3.1. ISGs reguladores negativos de infecção	20
1.3.2. ISGs reguladores de proteínas virais, montagem e liberação de partículas	21
1.3.3. ISGs reguladores da tradução e transcrição	21
1.3.4. ISGs com atividade pró-viral	22
1.4. Análises prévias para identificar e caracterizar novos ISGs	23
1.5. Infecções por vírus de RNA	24
1.5.1. Biologia molecular e replicação dos vírus de RNA	25
1.6. Infecção por vírus da ordem <i>Bunyavirales</i>	26
1.7. O vírus Oropouche	27
1.7.1 Estrutura e replicação	28
1.7.2. Perfil clínico	30
1.7.3 Epidemiologia Molecular	31
1.7.4. Patogênese	31
1.7.5. Interação vírus-hospedeiro	32
2. JUSTIFICATIVA	33
3. OBJETIVOS	34
3.1. Objetivo Geral	34
3.2. Objetivos Específicos	34
4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	35
5. MATERIAIS E MÉTODOS	36
5.1. Linhagens celulares	36
5.1.1. Linhagem de células Vero e condições de cultura	36
5.1.2. Linhagem de células C6/36 e condições de cultura	36
5.1.3. Linhagem de células HEK-293T e condições de cultura	36
5.1.4. Linhagem de células HT1080 e condições de cultura	36
5.2. Produção de estoques do vírus Oropouche (OROV)	37
5.2.1. Infecção de células VERO com OROV para multiplicação do estoque	37

5.2.2. Infecção de células C6/36 com OROV para confecção de estoque com maior título viral	37
5.2.3. Titulação dos estoques de OROV	38
5.3. Construção e multiplicação dos vetores plasmidiais para a preparação de lentivirus expressando ISGs humanos	38
5.3.1. Vetor Lentiviral (pTRIP.CMV.IVSB.Fluc[ISG].ires.TagRFP)	38
5.3.2. Transformação de bactérias competentes	40
5.3.3. Extração de DNA plasmidial – midiprep	40
5.3.4. Caracterização dos vetores (pTRIP.CMV.IVSB.Fluc[ISG].ires.TagRFP) por restrição enzimática	40
5.3.5. Confirmação dos ISGs nos vetores lentivirais por sequenciamento	41
5.4. Produção de estoques dos vetores lentivirais	41
5.4.1. Transfecção com cloreto de cálcio	41
5.4.2. Titulação dos lentivirus em células HEK-293T	42
5.5. Abordagem experimental para avaliação funcional dos ISGs por FACS	43
5.5.1. Transdução dos vetores lentivirais e infecção com OROV	43
5.5.2. Coleta das células	43
5.5.3. Marcação das células com anticorpos primário e secundário	44
5.5.4. Análise do experimento por FACS	44
5.6. Análise da infecção por OROV e da expressão de genes da resposta imune inata em células HT1080	45
5.6.1. Cinética viral	45
5.6.2. Extração de RNA celular total	46
5.6.3. Preparo de cDNA por RT-PCR	46
5.6.4. Quantificação viral do OROV por RT-qPCR	46
5.6.5. Análise da expressão de genes da resposta imune por qPCR SYBR Green	47
5.7. Análise estatística	48
6. ASPECTOS ÉTICOS	49
7. RESULTADOS	50
7.1. Titulação dos estoques de OROV	50
7.2. Cinéticas de infecção e avaliação da expressão dos IFNs α/β frente ao OROV em células HT1080	50
7.3. Produção e caracterização dos vetores	52

7.3.1. Titulação por FACS dos estoques lentivirais produzidos	53
7.4. Avaliação da infecção por OROV em células que superexpressam ISGs humanos	54
7.5. Confirmação da expressão de ISGs nas células modificadas por lentivirus	55
8. DISCUSSÃO	58
9. CONCLUSÕES	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
ANEXOS	86

1. INTRODUÇÃO

1.1. Resposta imune inata a infecções virais

O sistema imune inato é responsável pela resposta imediata em resposta às infecções independentemente do antígeno. Receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) presentes na membrana plasmática, no endossomo e no citosol da célula hospedeira, detectam uma variedade de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs). Os principais PRRs caracterizados na resposta contra vírus são capazes de identificar ácidos nucleicos virais [1]. Receptores RIG-I e MDA-5 no citoplasma reconhecem o RNA viral de fita simples (ssRNA) e fita dupla (dsRNA), enquanto DNA viral é detectado por cGAS-STING, IFI16 e DAI [2]. No endossomo, os ácidos nucleicos são reconhecidos pelos receptores TLR3 (dsRNA), TLR7 (ssRNA) e TLR9 (dsDNA) [3]. Posteriormente à detecção desses ácidos nucleicos, cascatas de sinalização que acionam os fatores de transcrição IRF3, IRF5, IRF7 e NF- κ B são iniciadas e resultam na produção de citocinas pró-inflamatórias e Interferons (IFNs) do Tipo I e III [2] (Figura 1).

1.2. Interferons Tipo I, II e III

Os IFNs do Tipo I incluem IFN α (12 subtipos) e IFN β dentre outros, como os IFN ϵ , IFN κ e IFN ω , que após secretados funcionam de forma autócrina e parácrina ao ligarem-se ao receptor IFNAR expresso transitoriamente na maioria das células hospedeiras. A cascata de sinalização pela via JAK-STAT tem então início e as proteínas STAT1/STAT2 se ligam ao IRF9, formando o complexo ISGF3. Este liga-se então a promotores ISREs que ativam a transcrição de centenas de outros genes denominados Genes Estimulados por Interferon (ISGs) [2] (Figura 1). ISGs cumprem a função de restringir a patogênese viral em diferentes fases da sua replicação, o que desencadeia um “estado antiviral” imediato tanto nas células infectadas como nas não infectadas do hospedeiro.

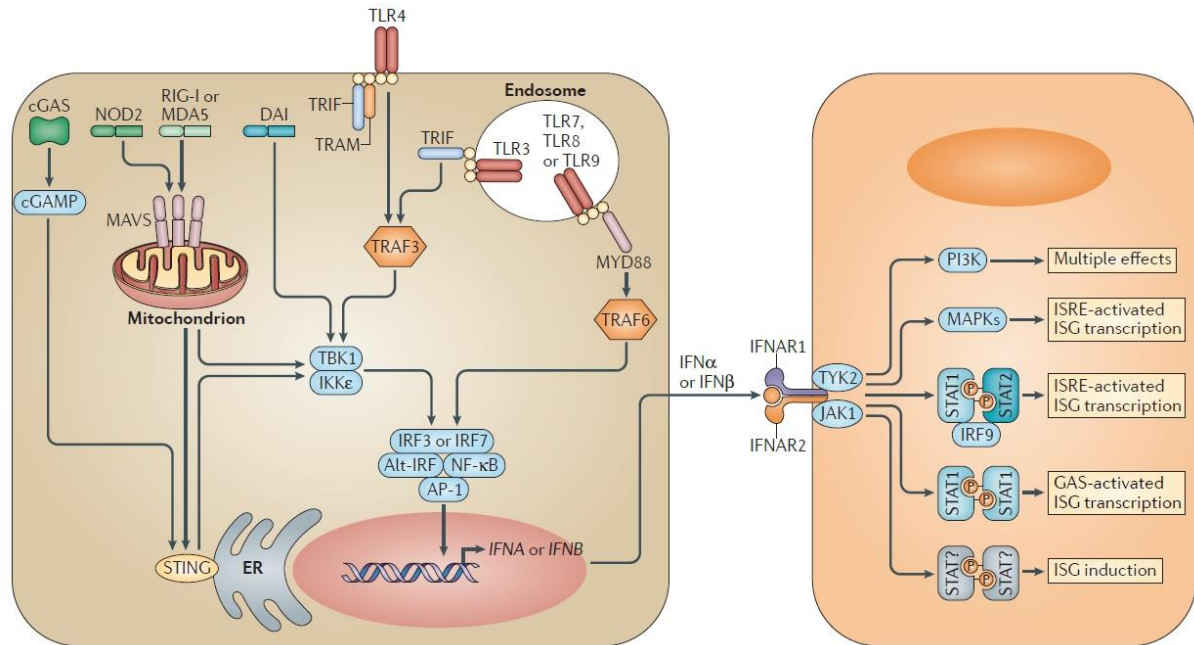


Figura 1. Vias de indução celular na produção e sinalização a jusante de IFN α/β . IFN produzido por células estimuladas podem atuar através de sinalização parácrina ou sinalização autócrina. Adaptado de: [1].

IFN Tipo II, consiste apenas do IFN γ , que não é transduzido por meio do reconhecimento direto de PAMPs, mas sim pela via da citocina pró-inflamatória IL-12. O IFN γ é secretado principalmente por neutrófilos, células NK e células T. Esse IFN sinaliza via o receptor IFNGR que inicia a via JAK-STAT e induz a transcrição de genes pró-inflamatórios e apoptóticos, os promotores GAS que também podem ser encontrados em meio aos ISGs induzidos por IFNs Tipo I [5].

IFNs Tipo III (IFN λ 1, IFN λ 2, IFN λ 3 e IFN λ 4), também são induzidos pela detecção de PAMPs [2, 4], podem estimular a indução de ISGs ativados por ISRE através do receptor de IFN λ , que porém, não é tão eficiente quanto IFNs do Tipo I. Além do mais, a expressão do receptor de IFN λ está limitada a células epiteliais e algumas células do sistema imunológico, o que limita a resposta a IFNs do Tipo III na maioria dos tecidos celulares [2, 4].

1.3. Genes Estimulados Por Interferon (ISGs)

In vitro, o número de ISGs estimulados é dependente da dose, duração, tipo de tratamento e linhagem celular (Figura 2). Levantamentos por *microarray* indicam que na sua maioria, células em cultura regulam positivamente cerca de 200 a 1000 ISGs,

sendo que os ISGs com maior potencial inibitório têm efeito contra uma ampla variedade de vírus [6]. No entanto, experimentos *in vivo* demonstram que a atividade antiviral é pouco influenciada por deleções de ISGs específicos [7], sugerindo que, de modo geral, os ISGs apresentam ação reguladora fraca a moderada e que trabalham de forma sinérgica para conter as infecções virais.

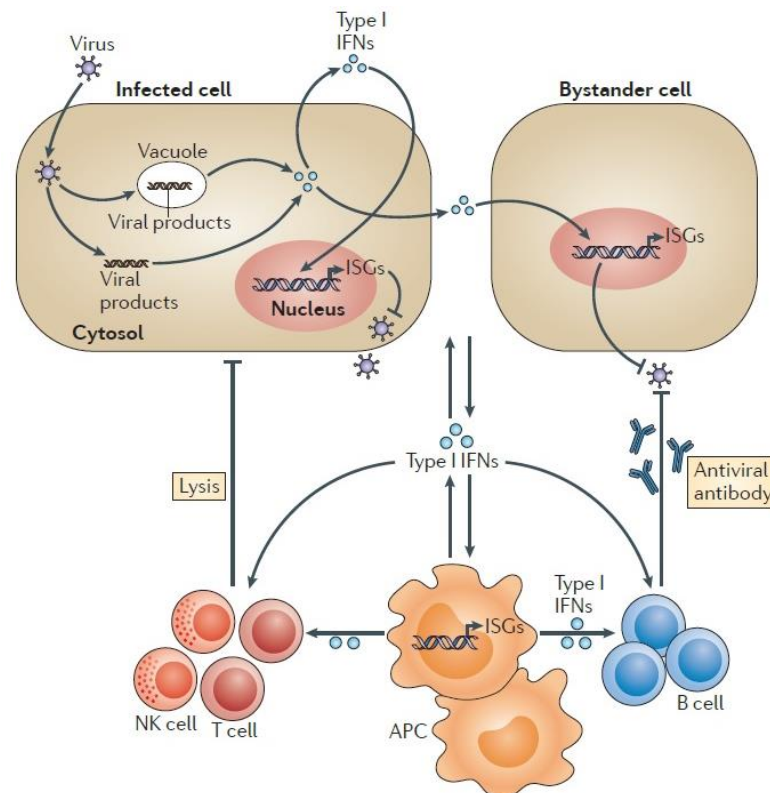


Figura 2. IFNs Tipo I durante a infecção viral e estímulo dos ISGs. Células infectadas dos vertebrados produzem IFNs Tipo I em resposta à infecção viral e / ou contato com produtos virais. O *feedback* de IFNs Tipo I nas células infectadas e adjacentes leva à indução de ISGs, responsáveis por bloquear o ciclo de replicação viral. IFNs Tipo I também são produzidos e atuam sobre células imunes inatas, incluindo células apresentadoras de antígenos (APCs) em resposta à infecção viral e seus produtos. IFNs Tipo I atuando em APCs podem aprimorar a função de apresentação de antígenos dessas células e também podem aprimorar a função antiviral de células imunes adaptativas, incluindo células B, T e células NK, que atuam para restringir a infecção viral através da produção de anticorpos (células B) e respostas citotóxicas (células T e NK). Adaptado de: [1].

1.3.1. ISGs reguladores negativos de infecção

Os primeiros ISGs antivirais descritos consistem na família de proteínas IFITMs associadas à inibição da entrada viral por meio da via endocítica e que se estende a

uma ampla variedade de vírus (ex. vírus da influenza A (IAV) e flavivírus) [8]. O receptor TRIM5 α liga-se às proteínas do capsídeo viral e estimulam o desnudamento [9]. A proteína Mx é reconhecida por sua atividade antiviral contra bunyavirus, orthomyxovirus, rabdovirus e togavirus [2, 10]. Essas proteínas identificam e sequestram nucleocapsídeos virais, o que leva ao impedimento do seu transporte aos sítios de amplificação do genoma viral. Não muito distante, o ISG ADAP2 demonstrou seu potencial em deter a entrada dos vírus da Dengue e da Estomatite Vesicular, ao alterar a captação endossômica, assim como o tráfico intracelular [11].

1.3.2. ISGs reguladores de proteínas virais, montagem e liberação de partículas

O ISG15 tem como função modificar a ubiquitina que conjuga proteínas virais e, portanto, tem efeito sobre inúmeras funções dessas proteínas [14-16]. O RSAD2 se associa ao retículo endoplasmático, o que corrompe a montagem das proteínas virais e na liberação de virions através da membrana plasmática [17]. Foi também evidenciado que o BST2 é capaz de prevenir a liberação de virions pela membrana plasmática [18].

1.3.3. ISGs reguladores da tradução e transcrição

Ao identificar dsRNA viral no citosol a OAS ativa a proteína RNaseL com a função de degradar ácido nucléico [12]. As proteínas APOBEC e ADAR mostraram-se capazes de editar o RNA viral, o que leva à desestruturação dos ácidos nucleicos e na admissão de mutações deletérias. Proteínas codificadas pelos genes IFITs impedem a tradução de RNA viral ao ligar-se ao complexo eIF3 e são capazes de identificar os motivos 5'-ppp do RNA viral ou mesmo a inexistência do grupo 2'-O de metilação que geralmente pode ser encontrado em RNA eucariótico. O que leva ao impedimento da tradução ao serem sequestradas [13]. A proteína PKR codificada por ISG tem importante relevância e uma das suas funções é de ligar-se ao RNA viral e impedir a tradução por meio da fosforilação do fator eIF2 α [12].

1.3.4. ISGs com atividade pró-viral

ISGs que promovem uma resposta imunomodulatória também são conhecidos. Experimentos de rastreio de alto rendimento (HTS) onde ISGs foram expressos de forma ectópica *in vitro*, indicaram que as proteínas ADAR, APOBEC3A, LY6E, MCOLN, IDO1 e FAM46C tem o potencial de regular positivamente a replicação dos vírus CHIKV, VEEV, WNV e YFV [19]. Em experimentos com WNV, o ASCC3 foi descrito como um ISG pró-viral ao demonstrar efeito atenuante dos sinais dependentes de IFN Tipo I [20]. A proteína SOCS é codificada em resposta ao IFN Tipo I e liga-se a resíduos de tirosina fosforilada dos receptores de IFN ou provenientes das proteínas JAK, o que vem a interromper a sinalização JAK-STAT [2]. O ISG USP18 é um regulador negativo expressivo da resposta por IFN Tipo I e liga-se ao IFNAR2 intracelular, o que altera a sua conformação e reduz expressivamente a afinidade de ligação do IFN α a esse receptor [21].

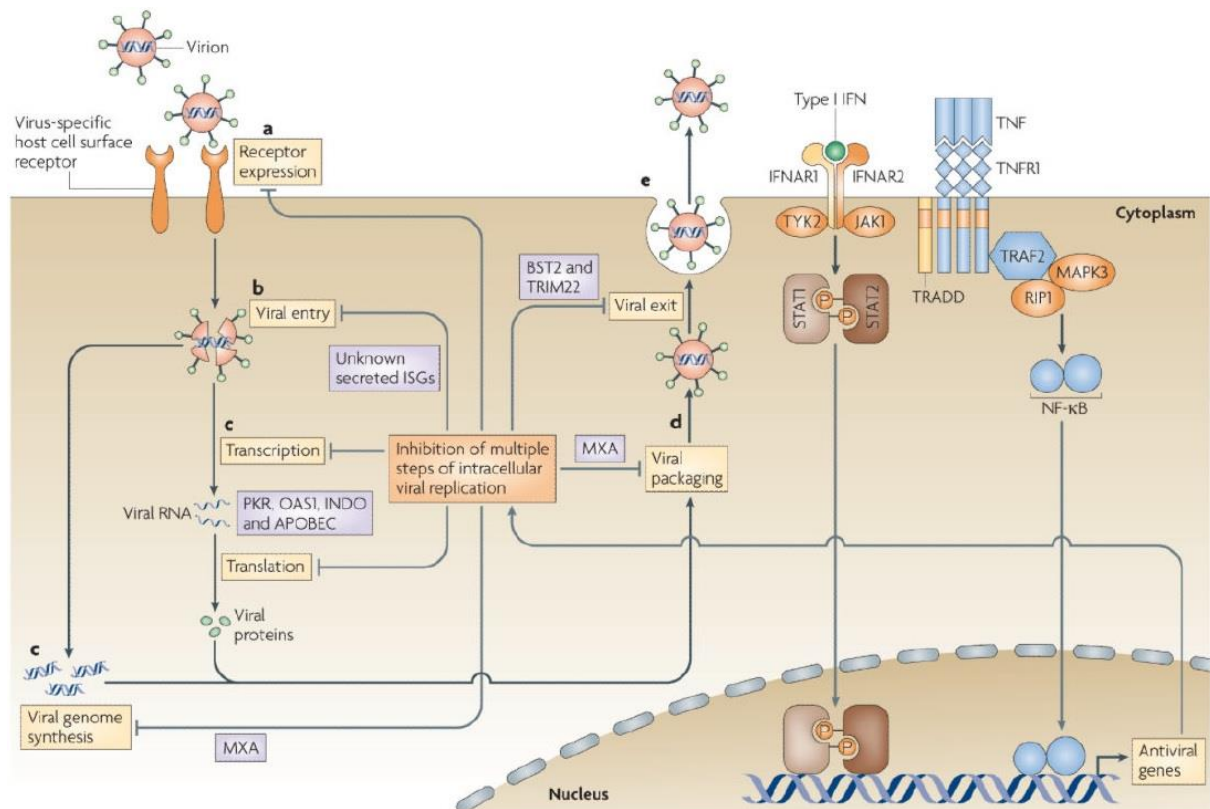


Figura 3. Inibição da replicação viral por ISGs. Os ISGs produzidos como parte da resposta de IFN são pleiotrópicos, redundantes e tem função variada. ISGs são capazes de inibir a replicação viral em quase todas as fases do seu ciclo replicativo e inclui: a) expressão do receptor, (b) entrada viral, (c) transcrição e síntese genômica, (d) empacotamento viral, (e) saída viral. Adaptado de: [28].

1.4. Análises prévias para identificar e caracterizar novos ISGs

As funções antivirais dos ISGs são desconhecidas em sua maioria. Estudos isolados identificaram alguns ISGs estratégicos envolvidos na restrição de alguns vírus. Por exemplo, uma análise de siRNA contra o vírus influenza A identificou o IFITM3 como um potente ISG antiviral, o que foi eventualmente confirmado ao restringir o WNV e o DENV [8]. A primeira análise da expressão ectópica em larga escala foi publicada em 2011, aonde uma biblioteca lentiviral expressando 380 ISGs humanos foi utilizada para determinar a restrição de seis vírus distintos (HCV, HIV, YFV, WNV, VEEV e CHIKV) [19]. Essa análise pode identificar ISGs que agem de forma ampla ou apenas para um vírus. Na sua maioria, os ISGs identificados demonstraram atividade antiviral moderada e atuavam como inibidores da tradução. A expressão simultânea de dois ISGs distintos, levaram a uma maior restrição da replicação de certos vírus [19], confirmando a suspeita de que a proteção por IFN requer o efeito sinérgico de múltiplos ISGs.

Um outro grupo desenvolveu uma análise em larga escala para identificar novos ISGs contra o WNV [22] ao silenciar genes alvos utilizando-se de uma biblioteca lentiviral de shRNA contra 245 ISGs humanos [22]. Essa abordagem permitiu a verificação do papel fisiológico de cada um dos ISGs no contexto de atividade antiviral. Essa abordagem pôde identificar potenciais ISGs que necessitavam de um complexo de fatores para atuarem de forma a restringir a infecção viral. O estudo identificou 30 ISGs com ação contra o WNV, desses, 9 tinham efeito antiviral até então desconhecidos.

Outros grupos também realizaram análises genômicas baseadas em siRNA a fim de identificar novos ISGs *in vitro* contra VSV, MHV-68 e HCV [23-25]. Uma plataforma de RNA de interferência *in vivo* foi desenvolvida, na qual camundongos foram infectados por uma biblioteca de vírus Sindbis (SINV) codificando microRNA sintético (amiRNAs) contra ORFs murino. Partículas virais codificando amiRNAs tendo como alvo genes inibitórios foram selecionados e os fatores de transcrição como Zfx e Mga identificados [26].

Recentemente, uma biblioteca de ISGs de primatas humanos e não humanos foi analisada contra onze retrovírus distintos [27]. Dos principais ISGs antivirais identificados, aproximadamente 60% tinham por alvo um único retrovírus, enquanto os restantes 40% tinham atividade ampla. Também foram identificados ISGs com

atividade específica em cada espécie de primata. Por exemplo, ANGTP1 humano, mas não o não humano, teve atividade inibitória durante a infecção por SIV. O IDO1, previamente identificado como pró-viral e TRIM56 demonstraram inibição da replicação retroviral [19].

1.5. Infecções por vírus de RNA

Altas taxas de morbidade e mortalidade estão associadas a doenças humanas causadas por vírus de RNA [29]. Tais vírus incluem o vírus da imunodeficiência humana (HIV), responsável por mais de 39 milhões de mortes desde a sua descoberta [30], o subtipo H1N1 do vírus Influenza A, que matou aproximadamente 50 milhões de pessoas em 1918 e leva a aproximadamente 500 mil mortes todos os anos [31, 32], e o vírus Ebola (EBOV), que condenou mais de 11 mil indivíduos entre 2013 e 2016 [33-36]. Outros vírus de significância clínica incluem os vírus das hepatites C (HCV), o vírus da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS), do Sarampo, da Dengue entre outros [37-41]. Dentre esses, estão mais de 350 vírus descritos na ordem *Bunyavirales*, conhecidos coletivamente como bunyavirus e que foram recentemente reclassificados em nove famílias: *Feraviridae*, *Fimoviridae*, *Hantaviridae*, *Jonviridae*, *Nairoviridae*, *Peribunyaviridae*, *Phasmaviridae*, *Phenuiviridae* e *Tospoviridae* [42]. Na sua maioria, os bunyavirus são transportados e transmitidos por artrópodes como carrapatos, flebotomíneos, mosquitos ou tripes, com exceção aos hantavírus, família *Hantaviridae*, que são geralmente transmitidos por meio de aerossóis provenientes de fezes de roedores. Muitos bunyavirus são causadores de doença grave em humanos, a exemplo dos orthobunavírus Hantaan (HTNV) e Sin Nombre (família *Hantaviridae*) ou vírus La Crosse (LACV) e Oropouche (OROV) (família *Peribunyaviridae*) [43].

Além de serem causadores de doenças em humanos, os vírus de RNA são também a causa de doenças com importância econômica em veterinária [44-46]. Em se tratando dos bunyavirus, é importante ressaltar que a emergência e reemergência desses vírus representam ameaças contínuas à saúde global, podendo ter maior potencial zoonótico que muitos outros vírus [47].

1.5.1. Biologia molecular e replicação dos vírus de RNA

Um vírus de RNA típico possui um genoma que desempenha papéis importantes tanto como repositório genético para a produção de proteínas virais, como protótipo para a replicação e montagem da progênie viral [48]. Os vírus de RNA podem ser de fita simples (ssRNA) ou fita dupla (dsRNA). Os vírus ssRNA podem ser subdivididos com base na orientação de seus genomas em (+ssRNA) e (-ssRNA), sendo que nos primeiros, o próprio genoma funciona como RNAm [49]. Por fim, alguns vírus possuem genoma de RNA que produzem intermediários de DNA durante seu ciclo de replicação e são, portanto, denominados de retrovírus; como o vírus HIV [50, 51].

Como todos os vírus, os de RNA possuem capsídeos que protegem o seu material genético da degradação no ambiente [52]. Enquanto os vírus de RNA de polaridade negativa possuem genomas recobertos por capsídeos helicoidais, os vírus com genoma +ssRNA geralmente estão associados com capsídeos icosaédricos [52]. No interior dessas partículas virais pode estar contido outros peptídeos e enzimas, geralmente essenciais para a replicação viral no interior de uma célula hospedeira. Por fim, muitos vírus de RNA estão envolvidos por um envelope lipídico oriundo da célula hospedeira, onde estão embebidas glicoproteínas virais que são essenciais para a entrada na célula hospedeira [53, 54]. A entrada dos vírus envelopados envolve a fusão de membranas, que pode se dar na membrana plasmática ou na membrana da vesícula endocítica, mas sempre dependente da ligação a um ou vários receptores celulares. A ligação dos vírus aos seus receptores faz com que muitos deles possuam afinidade especial por tipos específicos de células hospedeiras, o que é essencial na determinação do hospedeiro e do tropismo viral para os diferentes tipos celulares e tecidos em um mesmo hospedeiro [55-57]. Uma vez dentro da célula hospedeira, os vírus são desnudados, os RNAm são transcritos, as proteínas virais são traduzidas e novos genomas virais são replicados. A montagem, maturação e liberação culmina na produção de milhares de novas partículas virais, que podem infectar uma nova célula hospedeira ou ser disseminadas a um novo hospedeiro [58].

1.6. Infecção por vírus da ordem *Bunyvirales*

Após a infecção, o RNA genômico dos orthobunyavirus (ordem *Bunyvirales*) que carrega terminações 5' de trifosfato (5'-pppRNA) e sequências curtas de RNA de fita dupla (dsRNA) é detectado por helicases de RNA citoplasmáticas do hospedeiro, RIG-I [59-61]. Padrões de reconhecimento resultam na secreção de IFNs Tipo I, que modulam processos imunológicos responsáveis por desencadear um “estado antiviral” celular, o que impossibilita a infecção e replicação viral [62]. Os IFNs são reconhecidos por inibirem os bunyavirus tanto *in vitro* quanto *in vivo* [63-70] e de fato, essas citocinas possivelmente desempenham função fundamental na restrição da replicação e patogênese dos bunyavirus.

A importância dos IFNs Tipo I na restrição dos bunyavírus pode ser evidenciada em estudos com animais *knockouts*, uma vez que ao contrário das infecções assintomáticas de curta duração normalmente observadas em camundongos selvagens, as infecções em animais com deleções de genes chaves da via dos IFNs do Tipo I levam ao desenvolvimento de doenças graves, geralmente com caráter neurológico [71-76]. Por fim, o papel dos IFNs na resposta contra os bunyavírus pode ser também destacada pelo fato desses vírus produzirem proteínas com capacidade de interferir nessa resposta do hospedeiro. Proteínas não estruturais (NSs) presentes no genoma de muitos bunyavírus atuam como fortes antagonistas de IFNs [77-79]. Essas proteínas utilizam diversas estratégias a fim de inibir as respostas de IFNs [79, 80], que incluem desde a supressão da transcrição de mRNAs pelo hospedeiro [79, 81, 82], o bloqueio de PRRs [65, 83, 84] e a obstrução da sinalização por IFNAR, sequestrando STAT1 e STAT2 em corpos de inclusão [85].

A capacidade desses vírus em interferir na resposta dependente de IFN está diretamente relacionada com a capacidade desses vírus de causarem doenças em alguns hospedeiros. Assim, o entendimento dos papéis de cada um dos ISGs durante a infecção por OROV pode fornecer-nos indícios importantes do porquê algumas pessoas desenvolvem doenças graves após infecção por esse vírus, enquanto outras são assintomáticas ou desenvolvem sintomas moderados. Por fim, apenas alguns ISGs tiveram sua atividade anti-bunyaviral avaliada [90].

1.7. O vírus Oropouche

O vírus Oropouche (OROV) é um *Orthobunyavirus* transmitido por mosquito e causador de doença febril em humanos na América do Sul. Atualmente o vírus está classificado na ordem *Bunyavirales*, família *Peribunyaviridae* [91]. O OROV é endêmico no Brasil, onde todos os principais surtos da febre de Oropouche (OROF) foram relatados em cidades amazônicas. No entanto, o OROV foi registrado pela primeira vez em Trinidad e Tobago em 1955 aonde o vírus foi isolado do soro na fase aguda da doença de um trabalhador florestal febril, morador de uma aldeia chamada Vega de Oropouche, localizada próxima do rio Oropouche [93]. Curiosamente, nenhum outro caso foi registrado, porém pesquisas sorológicas encontraram anticorpos neutralizantes em 3/46 pessoas, 8/26 macacos-prego (*Cebus capucinus*) e 9/26 bugios (*Alouatta seniculus insularis*) indicando que o vírus se encontrava circulante. Em 1960, o vírus foi isolado novamente em Trinidad e Tobago de um criadouro de mosquitos *Mansonia venezuelensis* [93, 121] e no mesmo ano o vírus foi isolado pela primeira vez no Brasil de um bicho preguiça morto encontrado próximo a construção da rodovia Belém-Brasília. Um ano depois, em 1961, na cidade de Belém do Pará, 11 mil pessoas foram reportadas doentes no que se tornou o primeiro grande surto de febre de OROV (OROF) [118], sendo que o maior surto de OROF ocorrido até hoje aconteceu em 1980 no estado do Pará aonde 100 mil casos foram registrados [111, 117]. Entre 1978 e 1981, aproximadamente 220 mil casos de OROF foram relatados entre os estados do Amazonas, Amapá e Pará [93, 100, 104, 113, 118]. Em 1988, o vírus se alastrou-se para os estados do Maranhão e Goiás, onde aproximadamente 200 mil casos da doença foram registrados [131]. Logo, surtos de OROF foram sendo relatados ao longo do rio Amazonas, somando-se a mais de 30 surtos e uma estimativa de 500 mil casos entre 1961 e 1996 [111]. Em 1989 o primeiro surto OROF foi registrado fora do Brasil, desta vez no Panamá e em seguida no Peru em 1992. Atualmente a distribuição geográfica do OROV inclui Argentina, Brasil, Panamá e Peru. O vírus também pode estar circulando no Equador e na Bolívia de acordo com evidência sorológicas que também sugerem que primatas não-humanos na Colômbia também tenham tido contato com o patógeno [96, 97, 99, 103, 105, 108, 111, 112, 123, 128, 135].

Similaridades na sintomatologia da OROF com outras doenças virais endêmicas tais como a Dengue, Chikungunya e febre Mayaro, associadas a falta de

um método diferencial de vigilância, resulta na subnotificação da doença e, portanto, a epidemiologia exata do OROV na América Central e do Sul permanece pouco conhecida. É importante ressaltar que a construção da rodovia Belém - Brasília resultou na perda considerável de floresta preservada, assim como o primeiro relato de Trinidad e Tobago foi proveniente de uma área de floresta altamente impactada. Vasconcelos *et al.* descreve as mudanças ecológicas ocorridas no Brasil entre os anos 60 e 80 e relata a identificação de 187 vírus diferentes isolados entre 1954 e 1998 [132]. A febre de Oropouche é um típico exemplo de como o impacto humano no meio ambiente pode colaborar com a emergência e re-emergência de doenças zoonóticas. OROV circula em dois ciclos, o urbano que é transmitido entre populações humanas através da mosca hematófaga *Culicoides paraensis* [100, 113-115, 120] e o ciclo silvestre que envolve a preguiça (*Bradypus tridactylus*) e o sagui-de-tufo-preto (*Callithrix penicillata*), embora seus vetores permaneçam na sua maioria desconhecidos [110]. Surtos de OROF tipicamente ocorrem nas estações chuvosas, possivelmente devido à alta densidade de vetores [111]. Experimentos controlados e levantamentos epidemiológicos descrevem que os mosquitos *Aedes albopictus*, *Aedes scapularis*, *Aedes serratus*, *Culex fatigans*, *Culex quiquefaciatus*, *Coquilettidia venezuelensis* e *Psorophora ferox* são suscetíveis a Infecção por OROV [93, 117, 121, 117]. Anticorpos neutralizantes contra o OROV também foram detectados em aves domésticas e silvestres [113, 117, 121], levando à especulação de que as mesmas poderiam ser portadoras do vírus.

1.7.1 Estrutura e replicação

Embora de grande importância em saúde pública, ainda pouco se sabe sobre a biologia molecular do OROV. Na sua maioria, suposições são baseadas em experimentos com outros *Orthobunyavirus*, como por exemplo o *Bunyawera* (BUNV), protótipo da família e o vírus Lacrosse (LACV) [106]. Diferenças significantes na estrutura e mecanismos moleculares de vírus desse gênero são cada vez mais evidentes e é plausível que haja exceções quanto a essas presunções [101]. Assim como outros *Orthobunyavirus*, o OROV é munido de envelope com diâmetro de 80 a 120 nm que apresenta glicoproteínas de superfície inseridas na bicamada lipídica. Seu genoma é constituído de três segmentos de RNA de polaridade negativa, denominados de S (*small*), M (*medium*) e L (*large*) [102, 106, 136, 137] (Figura 4). O

segmento S codifica uma proteína estrutural do nucleocapsídeo N e em uma ORF alternativa, a proteína não estrutural NSs. O segmento M codifica uma poliproteína, da qual a clivagem origina as glicoproteínas de superfície Gn e Gc, respectivamente das regiões 5' e 3' do mRNA, assim como a proteína não estrutural NSm, localizada entre as Gn e Gc. O segmento L codifica a proteína que tem atividade de RNA-polimerase-RNA-dependente (RpRd), região que integra os nucleocapsídeos e realiza a transcrição e replicação do RNA genômico. [101, 102, 133, 137, 138].

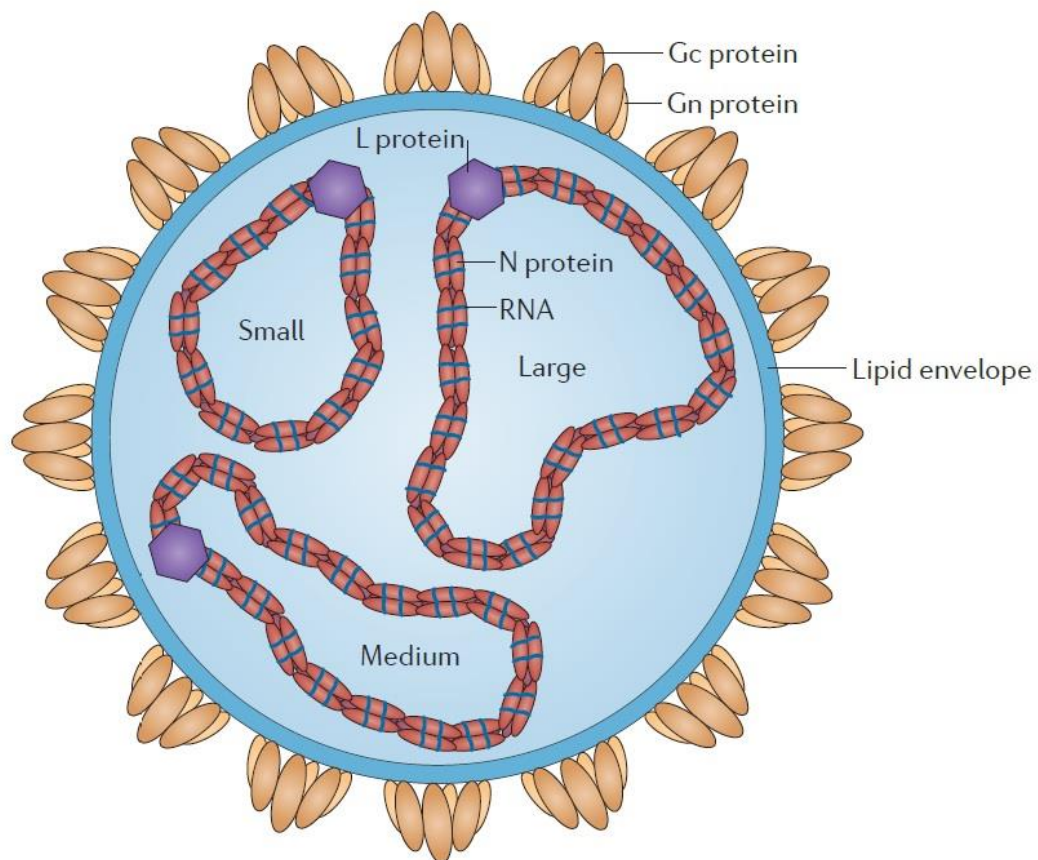


Figura 4. Figura esquemática dos *Orthobunyavirus*. Adaptado de: [101].

Os bunyavirus iniciam sua replicação ao ligarem-se à célula hospedeira por meio da interação das glicoproteínas virais com receptores de superfície celular ainda desconhecidos para o OROV. A entrada do vírus ocorre por endocitose mediada por clatrina, a qual sua acidificação repercute na fusão do envelope viral à membrana endossomal que desencadeia o desnudamento dos ribonucleocapsídeos [126]. Enquanto expostos ao citosol os ribonucleocapsídeos associados a RpRd leva à transcrição de mRNAs a partir do RNA genômico. Sua tradução origina nas proteínas

virais assim como de RNA(+) complementar, que são protótipos para a síntese dos genomas de novas partículas virais [101, 102, 137]. Proteínas virais traduzidas e o RNA genômico são montados em progênie e maturados no complexo de Golgi [137]. (Figura 5).

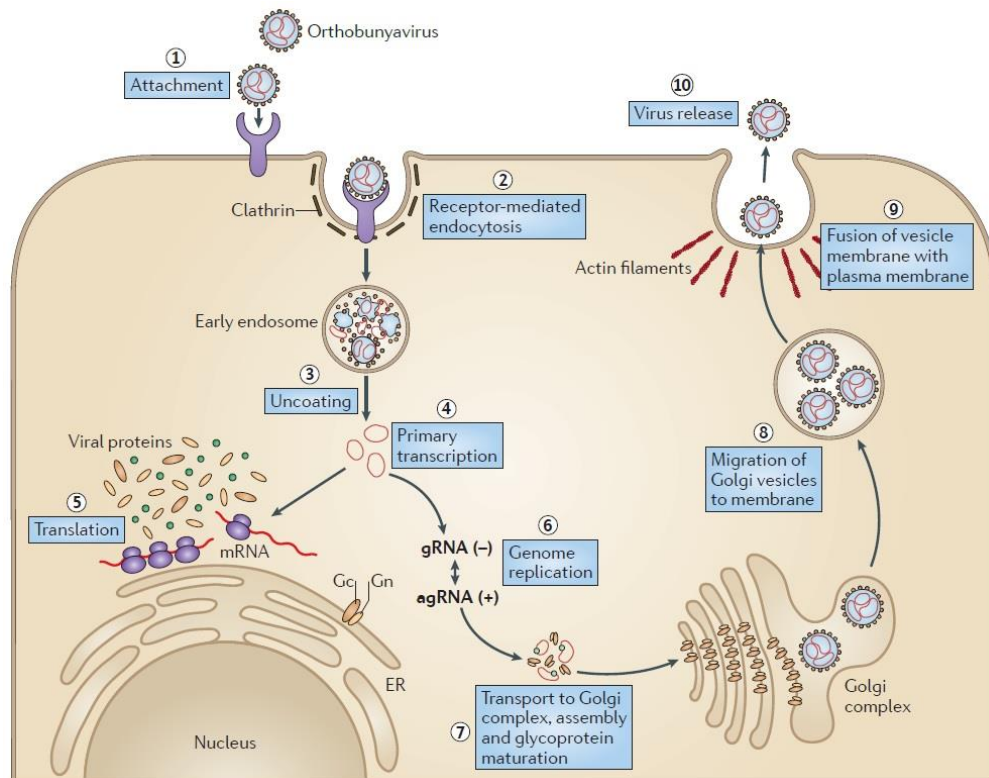


Figura 5. Ciclo de replicação dos *Orthobunyavirus*. Adaptado de: [101].

1.7.2. Perfil clínico

Sintomas da OROF incluem febre, dor de cabeça, mal-estar, mialgia, artralgia, fotofobia, dor retro ocular, náuseas, vômitos, tonturas, erupções cutâneas, encefalite e raramente meningite. O OROV não é considerado fatal em humanos e seu período de incubação varia entre 4 e 8 dias. Os sintomas geralmente podem durar de 2 a 7 dias, podendo prolongar-se por um mês. Recaídas nos sintomas são comuns e recidivas após 10 dias da fase aguda são relatados, porém tentativas de isolar o vírus nesse período são geralmente ineficazes [98, 113, 117].

Três testes diagnósticos são realizados em todos os pacientes febris e incluem o teste de inibição da hemaglutinação (HI), ELISA e fixação de complemento. [97, 98, 123, 131, 139]. Mais recentemente, um teste de imunofluorescência indireta (IF) para

o OROV foi desenvolvido [140]. Ensaios biológicos por meio de cobaias e infecção intracerebral também podem ser utilizados, porém são laboriosos para diagnósticos rotineiros [141]. Técnicas moleculares como a *nested* RT-PCR podem ser utilizadas no diagnóstico e são rápidas e eficientes [98,141], porém o *one-step* RT-PCR foi capaz de detectar RNA viral nos primeiros 5 dias da doença em 93.3% das amostras de pacientes, comparado a 26.6% por *nested* RT-PCR [142]. Naveca *et al.* testaram também com sucesso o diagnóstico para OROV através da técnica de *multiplexed one-step* RT-qPCR, que se demonstrou bastante eficaz e precisa [143].

1.7.3 Epidemiologia Molecular

As primeiras sequências do genoma do OROV foram publicadas há pouco menos de 20 anos [94, 95, 124 134]. A epidemiologia e variações genéticas de OROV vem então sendo estudadas e discutidas, porém, as informações são de modo geral baseadas unicamente em sequências parciais do seu genoma. A primeira análise filogenética do OROV foi realizada por Saeed *et al.* em 2000 [124] e foi baseada no ORF N de 28 isolados do vírus, sendo identificado que o mesmo se agrupa em três genótipos e confirmados em estudos posteriores [110, 107, 109, 130]. Vasconcelos *et al.* avaliaram em 2011 a evolução gênica e dispersão do OROV na América do Sul, utilizando-se de amostras de 1961 a 2009 que através das quais mapearam a rota de dispersão do vírus e identificaram um quarto genótipo inédito [129]. Em 2018 Nunes *et al.*, sequenciaram e caracterizaram as sequências codificantes completas (S-, M- e L-RNA) de 35 OROV isolados no Brasil. Foi possível classificar 20 cepas como genótipo I, dos estados do Pará e Maranhão, 9 como genótipo II dos estados do Pará e Rondônia, quatro foram classificadas como genótipo III do Acre, Maranhão, Minas Gerais e Rondônia, assim como dois genótipos IV do Estado do Amazonas. Não foram observados eventos de rearranjo nesses isolados de OROV [171].

1.7.4. Patogênese

Em 1961 o primeiro relato do OROV [93] indicou que camundongos e hamsters são do mesmo modo suscetíveis à infecção pelo vírus. Também foi demonstrado que camundongos adultos eram resistentes à infecção por via intraperitoneal (i.p.) quando comparados a animais jovens. Para melhor compreender a patogênese do OROV,

modelos baseados nos dois animais foram estabelecidos. A inoculação subcutânea do vírus em hamsters sírios adultos (*Mesocricetus auratus*) resultam em infecção sistêmica com sintomas análogos à infecção humana e aparecem cerca de 72 horas após a infecção (h.p.i). Utilizando-se de técnicas de imuno-histoquímica foi demonstrado que antígenos do OROV no fígado e sistema nervoso central (SNC) aos 4 dias pós infecção (p.i.) são indicativos de hepatite e danos ao SNC [122]. Em comparação ao observado em hamsters, Santos *et al.* demonstraram que em camundongos BALB/c neonatos o OROV pode ser detectado apenas no SNC e na medula espinhal em títulos elevados. A infecção nesses camundongos leva à morte em aproximadamente 10 dias p.i [126]. Embora a progressão da doença não seja tão exacerbada em humanos, o vírus tem sido similarmente isolado do SNC de pacientes e maior número de casos de meningite em humanos foi observado durante o surto de OROF em 1980 no Pará (22/292 pacientes) [98, 116].

1.7.5. Interação vírus-hospedeiro

A escassez de estudos de genética reversa para o OROV acaba limitando pesquisas moleculares mais avançadas. Como apontado anteriormente, Santos *et al.* demonstrou que o vírus infecta células HeLa através da via da CME [126]. Em 2010, foi revelado que o vírus causa apoptose em células HeLa e que o mesmo é decorrente da síntese de proteínas do OROV [172]. Recentemente, Proença-Modena e colaboradores demonstrou que o reconhecimento de RNA viral e a produção de IFN do tipo I são essenciais para a restrição de OROV em modelo murino, uma vez que camundongos *knockout* para IRF-3/IRF-7, MAVs e IFNAR são susceptíveis e rapidamente sucumbem a infecção por esse vírus. Entretanto, os ISGs que agem no controle da infecção por OROV ainda não foram caracterizados [119].

2. JUSTIFICATIVA

Diversos vírus da ordem *Bunyavirales* são conhecidos como causa de doença aguda que põe em risco a vida de humanos e animais. O sistema de interferon (IFN) é componente chave da imunidade inata e IFNs do tipo I são conhecidos por limitar a replicação dos bunyavirus tanto *in vitro* como *in vivo*. A sinalização de IFNs do tipo I resulta na regulação positiva de centenas de genes estimulados por IFN (ISGs), cuja ação conjunta gera um “estado antiviral”. Ainda que os IFNs são cruciais na limitação da replicação e patogênese do vírus Oropouche (OROV) e outros bunyavirus, o potencial dos diferentes ISGs em inibir a replicação de OROV não foi determinado.

IFNs são utilizados clinicamente no tratamento de inúmeras infecções. Entretanto, seus efeitos clínicos colaterais, a habilidade natural dos vírus em impedir sua atividade [92], assim como a investigação da atuação individual e sinérgica dos ISGs pode servir como modelo para o direcionamento terapêutico de sistemas celulares a fim de combater com eficiência as infecções virais, como OROV, para o qual não existe tratamento ou medida profilática disponível [144].

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Caracterizar o papel de 12 ISGs (IFIT1, IFITM1, IFIT2, IFITM2, IFIT3, IFITM3, IFIT5, ADAR, IRF1, LY6E, ISG20 e BST2) para o controle da infecção por OROV em células humanas.

3.2. Objetivos Específicos

1. Caracterizar a cinética de replicação e a produção de IFN α/β , de ISGs e de outras citocinas em células HT1080 após infecção com OROV.
2. Determinar as propriedades antivirais ou próvirais dos 12 ISGs após transdução de células HT1080 com uma minibiblioteca de vetores virais e infecção com OROV.
3. Avaliar a expressão de genes da imunidade inata durante a infecção por OROV em células HT1080 transduzidas com vetores virais.

4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

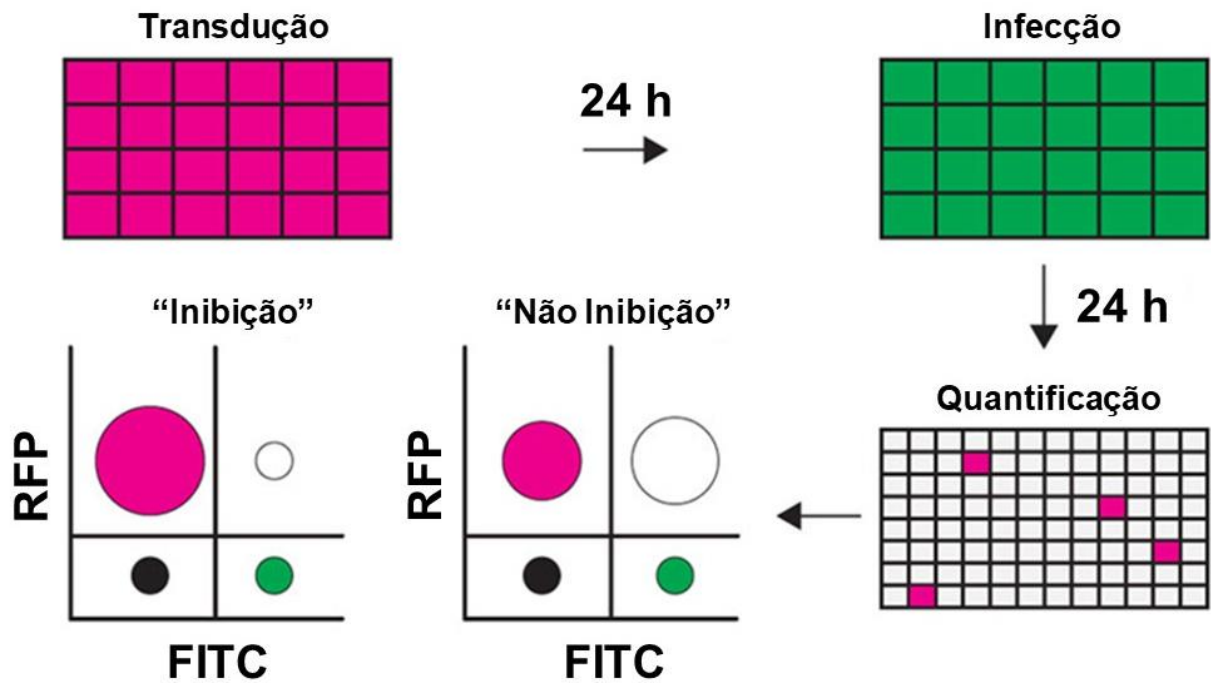


Figura 6. Esquema da triagem de superexpressão mostrando gráficos de FACS hipotéticos para genes inibitórios versus não inibitórios. A sobreposição de RFP (rosa) e FITC (verde) é representada como branca. Adaptado de: [19].

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Linhagens celulares

5.1.1. Linhagem de células Vero e condições de cultura

A linhagem Vero (ATCC®) é derivada de rim de primata não humano e foram cultivadas em meio DMEM alta glicose (Vitrocell®) com soro fetal bovino (SFB) (Vitrocell®) à 10% e mantidas em estufa úmida, a 37°C e 5% de CO₂.

5.1.2. Linhagem de células C6/36 e condições de cultura

A linhagem C6/36 (ATCC®) é derivada de tecido de larva do mosquito *Aedes albopictus*, foram cultivadas em meio Leibovitz (Vitrocell®) com soro fetal bovino (SFB) (Vitrocell®) à 10% e mantidas em estufa úmida, a 28°C e livres de CO₂.

5.1.3. Linhagem de células HEK-293T e condições de cultura

A linhagem HEK-293T (ATCC®) é derivada de rim embrionário humano, cresce de forma aderente e foram cultivadas em meio DMEM alta glicose (Vitrocell®) com soro fetal bovino (SFB) (Vitrocell®) à 10% a 37°C e 5% de CO₂ em estufa úmida.

5.1.4. Linhagem de células HT1080 e condições de cultura

A linhagem HT1080 (ATCC®) é uma célula de fibrosarcoma derivada de tecido conjuntivo humano, foram cultivadas em meio DMEM alta glicose (Vitrocell®) com soro fetal bovino (SFB) (Vitrocell®) à 10% e mantidas em estufa úmida, a 37°C e 5% de CO₂.

5.2. Produção de estoques do vírus Oropouche (OROV)

5.2.1. Infecção de células VERO com OROV para multiplicação do estoque

Uma alíquota de 1 mL de OROV (1.1×10^5 FFU/mL) do sorotipo BeAn 19991 produzido em células Vero foi gentilmente cedida pelo grupo do Laboratório de Estudos de Vírus Emergentes (LEVE) para a produção do estoque viral. Uma garrafa T75 (Wuxi NEST Biotechnology Co., Ltd) contendo células Vero previamente plaqueadas e com 80% de confluência foi infectada com OROV, diluída em 4 mL de meio DMEM contendo 3% SFB e incubado por 2 horas em câmara fria a 4°C sob movimentação em plataforma de balanço. Após adsorção, foram adicionados 6mL de meio de cultura contendo 3% SFB e as células foram incubadas em estufa úmida, a 37°C e 5% de CO₂ por 7 dias. O sobrenadante foi então coletado e 10 mL do mesmo foi transferido a uma garrafa T150 (Wuxi NEST Biotechnology Co., Ltd) contendo células Vero previamente plaqueadas e com 80% de confluência. As células infectadas foram incubadas por 2 horas em câmara fria a 4°C sob movimentação em plataforma de balanço. Transcorrido o tempo, foram adicionados mais 30 mL de meio de cultura contendo 3% SFB e as células foram incubadas em estufa úmida, a 37°C e 5% de CO₂ por 7 dias. O sobrenadante foi então coletado, 36 mL foram aliquotados em criotubos (Wuxi NEST Biotechnology Co., Ltd) de 1 mL e estocados em biofreezer à -80°C.

5.2.2. Infecção de células C6/36 com OROV para confecção de estoque com maior título viral

Os 4 mL de sobrenadante provenientes da segunda passagem em células Vero foram imediatamente utilizados para infectar as células C6/36 previamente plaqueadas em garrafa T25 (Wuxi NEST Biotechnology Co., Ltd) com 80% de confluência. A garrafa foi incubada por 2 horas em câmara fria à 4°C sob movimentação em plataforma de balanço e posteriormente recebeu 7mL de meio de cultura Leibovitz, acrescido de 3% SFB. As células em cultura foram então mantidas em estufa úmida, a 28°C e livres de CO₂ por 11 dias. O sobrenadante foi mais uma vez coletado e 10 mL do mesmo foi transferido imediatamente a uma garrafa T150 (Wuxi NEST Biotechnology Co., Ltd) contendo células C6/36 previamente plaqueadas

e com 80% de confluência. A garrafa contendo células infectadas foi incubada por 2 horas em câmara fria a 4°C sob movimentação em plataforma de balanço. Passado o tempo, foram adicionados mais 30 mL de meio de cultura contendo 3% de SFB e as células foram incubadas em estufa úmida, a 28°C e livres de CO₂ por 11 dias. O sobrenadante de 40 mL de volume foi então coletado e aliqotado em 1 mL por criotubo de 1.5mL (Wuxi NEST Biotechnology Co., Ltd). Essas alíquotas foram estocadas em biofreezer à -80°C juntamente com as anteriores para titulação por ensaio de formação de foco infeccioso (FFA).

5.2.3. Titulação dos estoques de OROV

As produções de OROV foram tituladas através do ensaio de formação de foco infeccioso (FFA) que emprega técnicas de imunocoloração [145]. Os resultados do ensaio são expressos como unidades formadoras de foco por mililitro, ou FFU/mL. As amostras de trabalho para a condução dos experimentos são produto da sétima passagem alternada e título de 1.35×10^7 FFU/mL.

5.3. Construção e multiplicação dos vetores plasmidiais para a preparação de lentivirus expressando ISGs humanos

5.3.1. Vetor Lentiviral (pTRIP.CMV.IVSB.Fluc[ISG].ires.TagRFP)

Vetores lentivirais bicistrônicos expressando uma pequena biblioteca de genes de interesse foram obtidos por meio do projeto temático FAPESP/BBSRC/RCUK de número (14/506964) em colaboração com o Instituto Pirbright no Reino Unido (ex. Luciferase – Fluc) (Figura 7). Este plasmídeo é usado para gerar estoques de lentivírus em conjunto com pCMV-gag-pol e pCMV.VSVg. As versões expressando ISGs foram geradas no Reino Unido por meio de um software de recombinação de plasmídeos (Gateway™ by Invitrogen™) ao excluir o ORF para Fluc e substituindo o ORF por ISGs caracterizados de interesse (Quadro 1). A sua propagação pode ser realizada em cepas de E. coli MDS42Rec (Scarab Genomics) ou DH5α resistentes a ampicilina (100 µg/mL) [19].

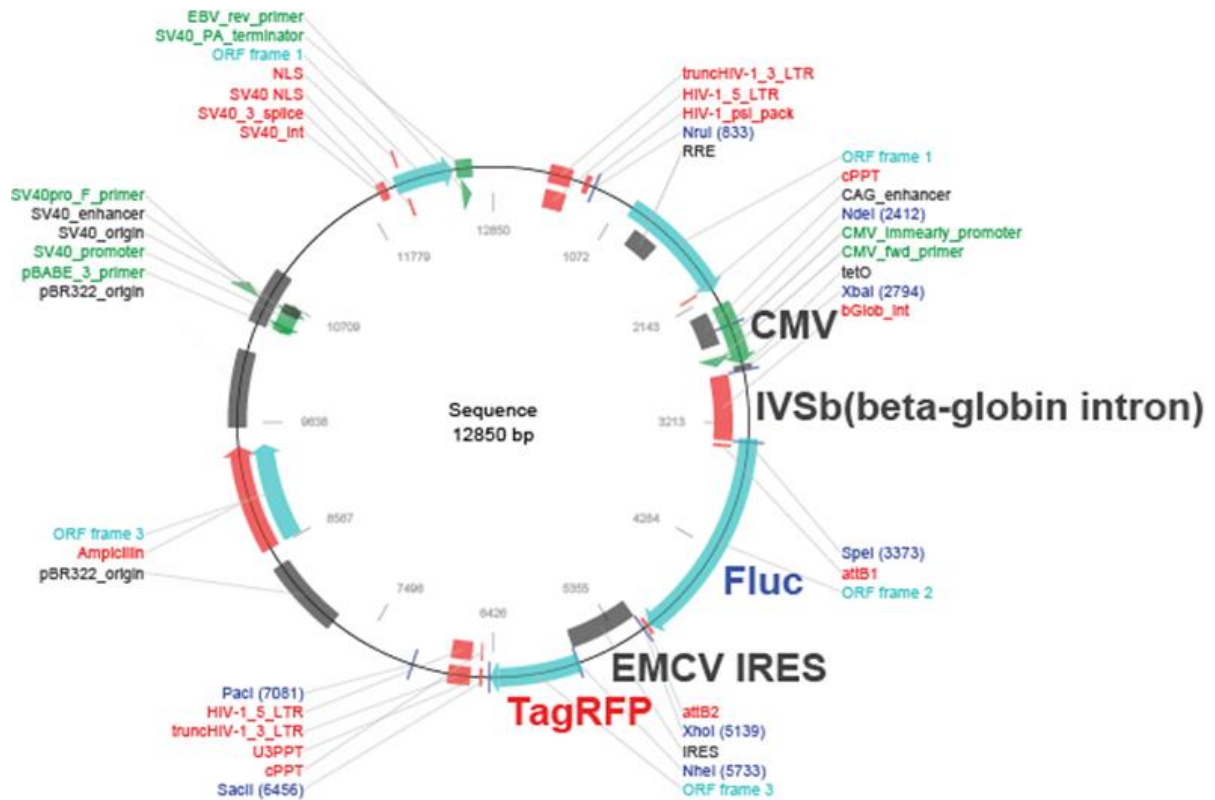


Figura 7. Mapa do vetor. O vetor pTRIP.CMV.IVSB.Fluc[ISG].ires.TagRFP tem origem no backbone plasmidial DEST pTRIP.CMV.IVSB.ires.TagRFP-DEST. O vetor de expressão em mamíferos gera resistência bacteriana à ampicilina quando transformadas. Foi produzido por John W. Schoggins et. al., e está descrito em [19].

Plasmídeos Expressando Genes Humanos	Plasmídeos Controle	Plasmídeos de Empacotamento
HSA-ISG-IFIT1	F-LUC (controle +)	HIV-gag-pol
HSA-ISG-IFIT2	HSA-IRF1 (controle -)	VSV-G
HSA-ISG-IFIT3	Vetor Vazio	
HSA-ISG-IFIT5		
HSA-ISG-IFITM1		
HSA-ISG-IFITM2		
HSA-ISG-IFITM3		
HSA-ISG-ADAR		
HSA-ISG-BST2		
HSA-ISG20		
HSA-ISG-LY6E		

Quadro 1. Relação de vetores recebidos. Projeto temático FAPESP/BBSRC/RCUK em colaboração com o Instituto Pirbright no Reino Unido.

5.3.2. Transformação de bactérias competentes

A transformação ocorreu por choque térmico submetendo cada uma das amostras de bactéria DH5 α (Invitrogen) competentes (de acordo com adaptação de [146] e plasmídeo a 42°C por 2 min, seguido de 1 minuto em gelo e incubadas em estufa por 16 horas a 37°C em placas de petri 90x15 mm descartáveis (Wuxi NEST Biotechnology Co., Ltd). As mesmas foram cultivadas no meio Luria-Bertani (LB) líquido e LB-ágar suplementados com o antibiótico ampicilina (concentração de 100 μ g/mL) para a seleção de colônias que carregam os plasmídeos desejados.

5.3.3. Extração de DNA plasmidial – midiprep

Após a transformação, uma colônia positiva por amostra foi selecionada, isolada e incubadas *overnight* em shaker à 37°C e 200 rpm. No dia seguinte o material foi submetido à extração de DNA plasmidial por meio do kit Nucleobond Xtra Midi (Macherey Nagel®), de acordo com as instruções do fabricante. O material extraído foi quantificado por espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific®) e armazenado à -20°C.

5.3.4. Caracterização dos vetores (pTRIP.CMV.IVSB.Fluc[ISG].ires.TagRFP) por restrição enzimática

O DNA plasmidial purificado com a construção pTRIP.CMV.IVSB.Fluc[ISG].ires.TagRFP codificando cada ISG foi submetido à reação de restrição enzimática e eletroforese em gel, para confirmação da presença dos insertos.

Todos os vetores apresentam a mesma construção e elementos essenciais que conduzem o cDNA viral e o transgene ao núcleo da célula e facilitam a sua expressão. A expressão é regulada pelo promotor CMV (383pb), flanqueado pelo sítio de restrição XbaI e SpeI (New England Biolabs, Inc. - NEB) localizado na região posterior ao promotor CMV. O vetor apresenta o sítio de restrição para a enzima XhoI (New England Biolabs, Inc. - NEB) entre a ligação do transgene e a região IRES, que permite a regulação da transcrição tanto do transgene inserido quanto do marcador fluorescente RFP pelo promotor interno (Figura 8).



Figura 8. Detalhamento da localização das regiões de interesse para a caracterização do vetor lentiviral. Adaptado de: [19].

5.3.5. Confirmação dos ISGs nos vetores lentivirais por sequenciamento

Oligonucleotídeos iniciadores para a sequência do Intron no sentido do [ISG] foram desenhados com base na análise da sequência dos nucleotídeos feita no GenBank® e consulta à literatura, de forma que amplificassem a região alvo (IVSβ[ISG]). Pares de primers também foram desenhados para alguns genes de maior interesse assim como para o marcador TagRFP no sentido do gene inserto segundo literatura original [19] para comprovação da integridade do material recebido (Tabela 1).

Sequência Amplificada	Sequências	Referência
IFITM1/3	F: 5' TCGCCTACTCCGTGAAGTCT 3' R: 5' TCATGAGGATGCCCAAGATC 3'	<i>in house</i>
IFITM2	F: 5' AGGAGCAGGAAGTGGCTATG 3' R: 5' GCAGAATGGTCATGAAGATG 3'	<i>in house</i>
IVSβ (1)	F: 5' CTGCTAACCATGTTTCATGCC 3'	<i>in house</i>
IVSβ (2)	R: 5' AAATTCTGGCTGGCGTGGAA 3'	<i>in house</i>
TagRFP	F: 5'-CATAGCTAGCATGGTGTCTAAGGGCGAAGAGCTG-3' R: 5'-CTAGCAAACCTGGGGCACAACTTAATTGACCGCG-3'	[19]

Tabela 1. Relação e características dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação das sequências alvo.

5.4. Produção de estoques dos vetores lentivirais

5.4.1. Transfecção com cloreto de cálcio

A produção dos vetores lentivirais foi realizada a partir de três plasmídeos: pTRIP.CMV.IVSB.Fluc[ISG].ires.TagRFP (o vetor de transferência que fornece o cDNA viral e transgene), HIV gag-pol (que codifica as proteínas estruturais de capsídeo do HIV-1) e VSV-G (que codifica glicoproteínas de envelope). Os vetores foram todos obtidos com suas construções prontas por meio do projeto temático

FAPESP/BBSRC/RCUK em colaboração com o Instituto Pirbright no Reino Unido e multiplicados *in loco*. A co-transfecção dos três plasmídeos foi feita por precipitação com cloreto de cálcio em células HEK-293T mantidas em meio DMEM alta glicose com 10% de SFB segundo protocolo adaptado de [147, 148]. Os sobrenadantes recolhidos após as transfecções foram aliquotados e armazenados em biofreezer à -80°.

5.4.2. Titulação dos lentivirus em células HEK-293T

Para cada vetor lentiviral, 5 μ L, 50 μ L e 500 μ L foram transduzidos em células HEK-293T plaqueadas no dia anterior na concentração de 10⁵ células por poço contendo 500 μ L de meio DMEM alta glicose + 10% SFB (Figura 9). O cálculo do título viral foi realizado por meio de planilha Excel (Microsoft®) a partir do percentual (%) de células transduzidas, número de células total por poço no momento da transdução e volume de suspensão viral.

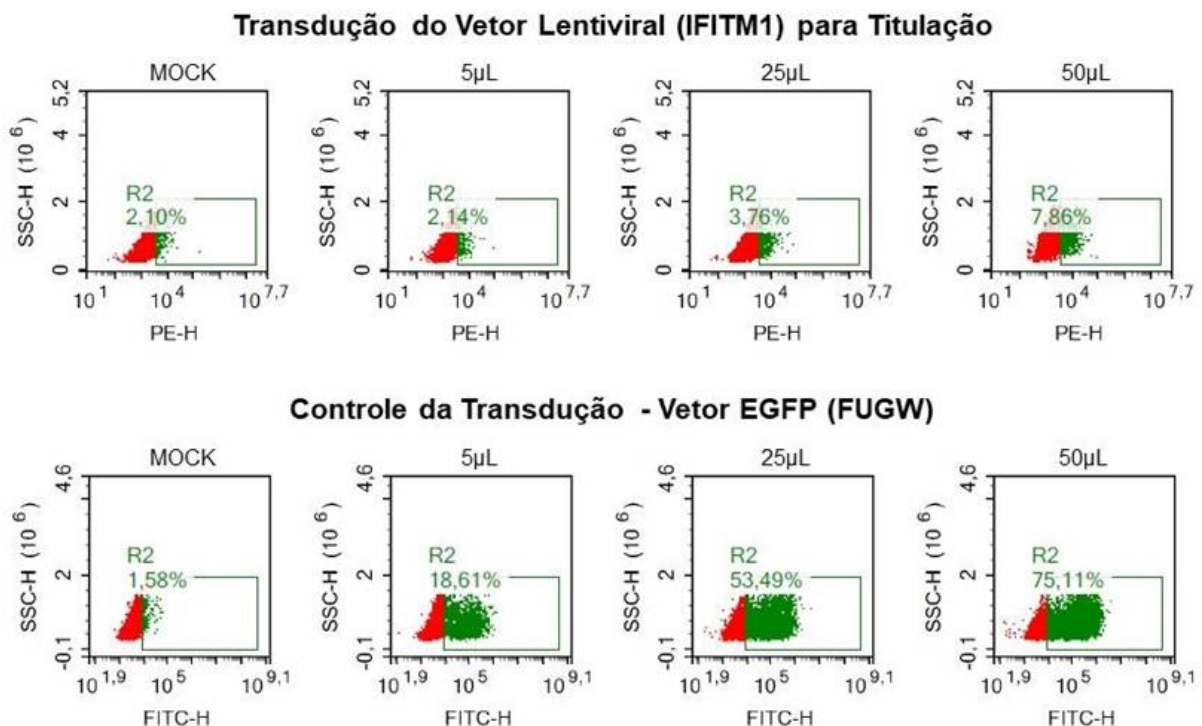


Figura 9. Titulação das produções de lentivirus por FACS. A figura demonstra resultado de citometria de fluxo (FACS) utilizada para titular o vetor lentiviral concentrado codificando o gene IFITM1. Todas as transduções para titulação tanto em células HEK-293T para produção, quanto HT1080 para o experimento, foram acompanhadas da transdução em paralelo do vetor FUGW-EGFP como controle e tiveram os mesmos volumes transduzidos (5, 25, 50 μ L) como padrão para a linhagem do experimento.

5.5. Abordagem experimental para avaliação funcional dos ISGs por FACS

5.5.1. Transdução dos vetores lentivirais e infecção com OROV

Cada vetor lentiviral foi transduzido em células HT1080 plaqueadas em placas de 24 poços (Wuxi NEST Biotechnology Co., Ltd) no dia anterior na concentração de 10^4 células por poço contendo 500 μ L de meio de cultura específico. Para a transdução, 6 alíquotas de cada vetor (sextuplicata) contendo um ISG, incluindo controles positivo (Fluc) e negativo (IRF1) foram adicionados a poços individuais totalizando 500 μ L de volume final entre vetor (MOI 1), meio de cultura e 0,5 μ L de Polibreno (Sigma-Aldrich®) por poço. Dois poços (duplicata) dos vetores (FUGW) e (LY6E) respectivamente foram transduzidos (MOI 10) com a finalidade de uso na compensação e calibração do citometro. Ao fim de 24 horas de incubação em estufa úmida, a 37°C e 5% de CO₂ o meio de cultura de todos os poços foi trocado, sendo que apenas 3 dos 6 poços transduzidos por vetores expressando o mesmo gene receberam meio contendo o OROV (MOI 0,5). Três poços adicionais contendo células parental HT1080 que não haviam recebido transdução também receberam meio contendo OROV com a finalidade do controle da infecção (CV) pelo vírus. Além dos anteriores, três poços contendo células HT1080 parental não foram transduzidos, tampouco infectados e a estes coube a função “mock” juntamente com as células transduzidas pelos vetores FUGW e LY6E (MOI 10) para calibração do equipamento de citometria de fluxo. As células foram novamente levadas à estufa e incubadas por 24 horas adicionais.

5.5.2. Coleta das células

As células transduzidas, transduzidas + infectadas, infectadas e parentais “mock” foram então tripsinizadas com 200 μ L de tripsina (Vitrocell®) por poço para desagregação e resuspendidas em 200 μ L de meio de cultura para a neutralização da tripsina. As células foram fixadas por uma hora com a adição de paraformaldeído a 4% diretamente aos poços da placa de 24 com as células suspensas. Após o período de fixação das células, as mesmas foram coletadas em microtubos (Wuxi NEST Biotechnology Co., Ltd) de 1,5 mL e centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e os grupos de células “mock” e transduzidas porém não

infectadas foram resuspendidas em 200 μ L de PBS1x e armazenadas em geladeira a 4°C *overnight* (ON) até a leitura por citometria do experimento como um todo.

5.5.3. Marcação das células com anticorpos primário e secundário

As células infectadas com OROV, tanto as transduzidas como não transduzidas passaram por reação de imunofluorescência e foram, portanto, marcadas por meio de anticorpo primário policlonal para o OROV (ATCC VR-1228AF) e anticorpo secundário (Goat Anti-Mouse IgG H&L (Alexa Flúor® 488) (ab150113)). Para tanto, as células previamente fixadas, coletadas em microtubos e centrifugadas a serem marcadas por anticorpos conjugados, foram resuspendidas em 1 mL de Perm/Wash buffer (PWB) preparado *in house*, centrifugadas à 1500 rpm por 5 minutos e tiveram seus meios descartados. As mesmas receberam novamente 1 mL de PWB por tubo e foram então incubadas por 1 hora no escuro em geladeira a 4°C. Após o período, os tubos foram centrifugados, tiveram seus meios descartados e as células foram resuspendidas em 50 μ L de anticorpo primário diluído à 1:500 μ L em PWB e incubadas ON no escuro a 4°C. Na manhã seguinte, os tubos foram centrifugados a 1500 rpm por 5 minutos, tiveram seus sobrenadantes descartados e foram lavadas duas vezes com 1mL de PWB. Em seguida, cada tubo recebeu 50 μ L de anticorpo secundário e as células foram resuspendidas na proporção de 1:1000 μ L do anticorpo em PWB. Estas foram incubadas por 2 horas a 4°C no escuro. Os tubos foram então centrifugados à 1500 rpm por 5 minutos e as células lavadas duas vezes com 1 mL de PWB seguidas de centrifugação à 1500 rpm por 5 minutos. Após o processo, as células foram resuspendidas em 200 μ L de PBS1x.

5.5.4. Análise do experimento por FACS

Todas as células marcadas por anticorpos assim como as não marcadas foram transferidas para uma placa de 96 poços com fundo “U” sem tampa (Wuxi NEST Biotechnology Co., Ltd) e agrupadas de acordo com suas características de processamento para facilitar a leitura por meio de citometria de fluxo (FACS). Células não transfectadas e não infectadas foram utilizadas como controle negativo para calibração do equipamento. As células apenas transduzidas pelos vetores expressando FUGW e LY6E (MOI 10) foram utilizadas na compensação do

equipamento para leitura de FITC e PE respectivamente. As células transduzidas e infectadas do experimento foram então avaliadas quanto à expressão de FITC +/- ou RFP +/- ou ambos. As células apenas transduzidas por vetores expressando ISGs que não receberam infecção por OROV foram utilizadas como controle da transdução assim como as células apenas infectadas por OROV e marcadas por anticorpos que foram utilizadas como controle da infecção. Os grupos das células transduzidas pelo vetor Fluc e infectadas foram utilizadas como controle positivo (+) de regulação em células transduzidas sendo que o transgene tem ausência de função. As células transduzidas pelo vetor IRF1 e infectadas pelo OROV cumpriram a função de controle negativo (-) sendo que vasta literatura indica esse gene como um regulador negativo panviral [19, 149-153].

Com base na análise por citometria os ISGs que regularam positivamente ou negativamente a replicação do vírus foram anotados.

5.6. Análise da infecção por OROV e da expressão de genes da resposta imune inata em células HT1080

5.6.1. Cinética viral

Para a análise cinética de replicação do OROV em células HT1080 foi realizada a quantificação do número de cópias virais em períodos pré-determinados. O experimento foi realizado em placas de 24 poços com tampa (Wuxi NEST Biotechnology Co., Ltd) aonde células HT1080 plaqueadas à 10^4 células por poço foram infectadas (MOI 0,5) após 24 horas de cultivo, seguido de período de adsorção de 2 horas em câmara fria à 4°C sobre plataforma de balanço. Após o período de adsorção, os meios contendo partículas virais não adsorvidas foram coletados e descartados. As células aderentes foram lavadas duas vezes com PBS1x, incluso células não infectadas “mock”, receberam então meio de cultura novo ausente de SFB e foram encubadas em estufa úmida segundo orientações de cultivo. Os tempos de coleta foram: 0, 4, 12, 24 e 48 horas, sendo que o tempo 0 foi considerado como o tempo inicial de incubação após período de adsorção de 2 horas e todas as condições foram reproduzidas em triplicata.

5.6.2. Extração de RNA celular total

O RNA celular total foi extraído utilizando o reagente TRIzol® (Invitrogen) de acordo com as recomendações do fabricante. Como o OROV é um agente patogênico do Nível de Contenção 2, as células foram deixadas em TRIzol durante 30 minutos para assegurar sua inativação completa e remoção ao laboratório de Nível 1. As amostras foram armazenadas a -80°C até a extração. Para a extração do RNA foram adicionados 0,2 volumes de clorofórmio a cada tubo e misturados invertendo-os 5 a 10 vezes. As amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm (> 15.000 g) por 10 minutos antes de a fase aquosa ser removida para um novo tubo contendo 500 µl de isopropanol. Depois de homogeneizadas as amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 15 minutos antes de serem centrifugadas a 14.000 rpm por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante foi cuidadosamente removido e o precipitado lavado em 1000 µl de etanol gelado antes de nova centrifugação a 14.000 rpm por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi removido e o precipitado deixado secar ao ar antes de ser resuspendido em 20 µl de água livre de nuclease. A concentração de RNA foi determinada usando um espectrofotômetro NanoDrop (Thermo Scientific®).

5.6.3. Preparo de cDNA por RT-PCR

Para a produção de cDNA, 2 µg de cada amostra de RNA total foi submetido à reação de transcrição reversa por meio do kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems®) de acordo com as recomendações do fabricante e o cDNA obtido foi armazenado à -20°C até o momento do uso.

5.6.4. Quantificação viral do OROV por RT-qPCR

Para a detecção molecular de OROV foi utilizado TaqMan® Fast Virus 1-Step Master Mix (Applied Biosystems), utilizando-se de oligonucleotídeos e sondas específicos (SIGMA- ALDRICH) (Tabela 2). Em resumo, foram utilizados 2 µL do RNA total quantificado, 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 seguido de 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.

Virus	Sequências	Referência
OROV	F: 5'-TACCCAGATGCGATCACCAA-3' R: 5'-TTGCGTCACCATCATTCCAA-3'	(PROENCA-MODENA et al., 2015)
Sonda	5'-/FAM/ TGCCTTTGGCTGAGGTAAAGGGCTG/36-TAMSp/-3'	(PROENCA-MODENA et al., 2015)

Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados para detecção do OROV.

5.6.5. Análise da expressão de genes da resposta imune por qPCR SYBR Green

A partir das amostras de RNA celular total provenientes das cinéticas de infecção pelo OROV e conseguinte cDNA (DNA complementar) de cada amostra, foram analisadas a expressão de IFN α (total) e IFN β 1 nos diferentes tempos de coleta após infecção.

Um experimento complementar foi realizado aonde células HT1080 foram plaqueadas e tratadas em condições similares as analisadas por FACS (HT1080 parentais infectadas com OROV, HT1080 parentais apenas transduzidas pelos vetores lentivirais, HT1080 parentais transduzidas e infectadas). Após coletadas, as células tiveram seu RNA total extraído e cDNA produzido assim como previamente descrito. Para este experimento, foram analisadas a expressão basal dos ISGs pertencentes à biblioteca no período após 24 horas de infecção pelo vírus, a expressão dos ISGs em células transduzidas, a expressão dos ISGs em células transduzidas e infectadas.

A análise dessas expressões por qPCR foi realizada pelo método SYBR Green (BIO RAD Taq™ Universal SYBR® Green Supermix) utilizando 200 ng de cDNA previamente quantificado, para cada 5 μ L de SYBR Green Mix (2x) e 3 μ L de mix de oligonucleotídeos (Tabela 3) a 600 nM, totalizando 10 μ L 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. O nível de expressão para cada gene alvo foi normalizado contra GAPDH como controle endógeno utilizando o método $\Delta\Delta$ CT e expresso como níveis de duplicação em comparação com as células parentais “mock”.

Gene	Sequências	Referência
IFIT1	F: 5'-TCATCAGGTCAAGGATAGTCTG-3' R: 5'-GGTGTTCACATAGGCTAGTAG-3'	<i>in house</i>
IFIT2	F: 5'-ACTGCAACCATGAGTGAGAAC-3' R: 5'-GCCTCGTTTTGCCCTTTGAG-3'	<i>in house</i>
IFIT3	F: 5'-TCACTTGGGGAACTACGCC-3' R: 5'-GTGTCCACCCTTCCTCACAG-3'	<i>in house</i>
IFIT5	F: 5'-CCATTACCACTATGGCCGCT-3' R: 5'-AGCACTTGTCAGTTTGGTGC-3'	<i>in house</i>
IFITM1	F: 5'-CCGTGAAGTCTAGGGACAGG-3' R: 5'-TCACAGAGCCGAATACCAGT-3'	<i>in house</i>
IFITM2	F: 5'-GTGAAGTCTAGGGACAGGAAGA-3' R: 5'-CCAACACTGGGATGATGATGAG-3'	<i>in house</i>
IFITM3	F: 5'-AAGTGCCTGAACATCTGGGC-3' R: 5'-AGATCAGCACTGGGATGACG-3'	<i>in house</i>
LY6E	F: 5'-GCTCGCTGATGTGCTTCT-3' R: 5'-GACACAGTCACGCAGTAGTT-3'	<i>in house</i>
ISG20	F: 5'-AGAGATCCTGCAGCTCCTGA-3' R: 5'-ACAACAGCCTGTCAGTGGAC-3'	<i>in house</i>
BST2	F: 5'-CAGAAGGGCTTTCAGGATGT-3' R: 5'-TTTGTCTTGGGCCTTCTC-3'	<i>in house</i>
ADAR	F: 5'-GGCCAGTCTCAGAAGAACTATG-3' R: 5'-GCTATCTGGTCATGGAAGGTG-3'	<i>in house</i>
IRF1	F: 5'-CATTACACAGGCCGATACA-3' R: 5'-TGGTCTTTCACCTCCTCGATA-3'	<i>in house</i>
Fluc	F: 5'-TTCACCGATGCCACATT-3' R: 5'-GTTTCAGGCCGTACCTCTTC-3'	<i>in house</i>
IFN α (total)	F: 5'-TCCATGAGVTGATBCAGCAGA-3' R: 5'-ATTTCTGCTCTGACAACTCCC-3'	(HARPER et al., 2015)
IFN β 1	F: 5'-GCTTGGATTCTACAAAGAAGCA-3' R: 5'-ATAGATGGTCAATGCGGCGTC-3'	(LI et al., 2016)
GAPDH	F: 5'-CCCATGTTCTGTCATGGGTGT-3' R: 5'-TGGTCATGAGTCCTTCCACGATA-3'	(MICKE et al., 2006)

Tabela 3. Oligonucleotídeos utilizados para qPCR, SYBER Green.

5.7. Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism versão 5.00. Para a análise de experimentos funcionais *in vitro* os dados foram representados como a média e o erro padrão associado (SEM) [154] utilizando a análise da variância (ANOVA) [155] seguido do teste de comparação múltipla de Kruskal-Wallis [156]. Para todos os testes estatísticos os valores de P menores que 0,05 ($P < 0,05$) foram considerados significativos.

6. ASPECTOS ÉTICOS

O estudo proposto neste projeto de dissertação foi autorizado pela Comissão Interna de Biossegurança (CIBIO) do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM) e protocolado sob o número de projeto / processo 2017-04 (documento datado de 14 de março de 2017, ANEXO B).

7. RESULTADOS

7.1. Titulação dos estoques de OROV

Estoques de OROV (linhagem BeAn 19991) foram produzidos a partir de uma alíquota de 1 mL (1.1×10^5 FFU/mL) por meio de passagens alternadas em células de linhagem Vero e C6/36. A titulação por ensaio de formação foco (FFA) demonstrou que as células de linhagem oriundas de inseto foram eficientes em produzir títulos mais elevados do vírus a partir de passagens alternadas (Tabela 4).

Título OROV (FFU/mL)					
	Título Recebido (p4)	1ª Passagem (p5)	2ª Passagem (p6)	1ª Passagem (p6)	2ª Passagem (p7)
Célula VERO	1.1×10^5	7.5×10^5	1.75×10^5	-	-
Célula C6/36	-	-	-	1.6×10^6	1.35×10^7

Tabela 4. Relação dos títulos de OROV produzidos nas passagens consecutivas a partir da alíquota inicial recebida de vírus em 4ª passagem.

7.2. Cinéticas de infecção e avaliação da expressão dos IFNs α/β frente ao OROV em células HT1080

Para avaliar se células HT1080 são susceptíveis e permissivas a replicação de OROV, analisamos a cinética de produção de RNA viral nos seguintes momentos após infecção: 0, 4, 12, 24 e 48 horas pós infecção (h.p.i.). A MOI utilizada nesse experimento foi de 0,5, a mesma utilizada nos experimentos de infecção com OROV após transdução com os vetores retrovirais carregando os ISGs. MOIs muito altas provocavam taxas altas de morte celular precoce, o que dificultava as análises após a transdução, enquanto MOIs muito baixas, como de 0,01, não levaram a infecções produtivas em HT1080 (dados não mostrados).

A infecção com OROV utilizando uma MOI de 0,5 levou a formação de uma curva exponencial de RNA viral no interior celular, com pico de detecção em 48 h.p.i. (Figura 10). Esse acúmulo de RNA viral foi associado com a tentativa da formação de uma resposta antiviral, uma vez que podemos observar um aumento significativo nos níveis de IFN α/β entre 4 a 24 h.p.i. Entretanto essa resposta parece não ser efetiva, pois além de não conseguir controlar a infecção viral, ela aparentemente não se

correlaciona com uma indução na expressão dos ISGs, visto que não observamos um aumento significativo na expressão desses genes em células HT1080 infectadas e não transduzidas (Figura 13). Assim, acreditamos que OROV pode possuir algum mecanismo capaz de antagonizar componentes intracelulares que atuem após a produção de IFN do tipo I em células HT1080.

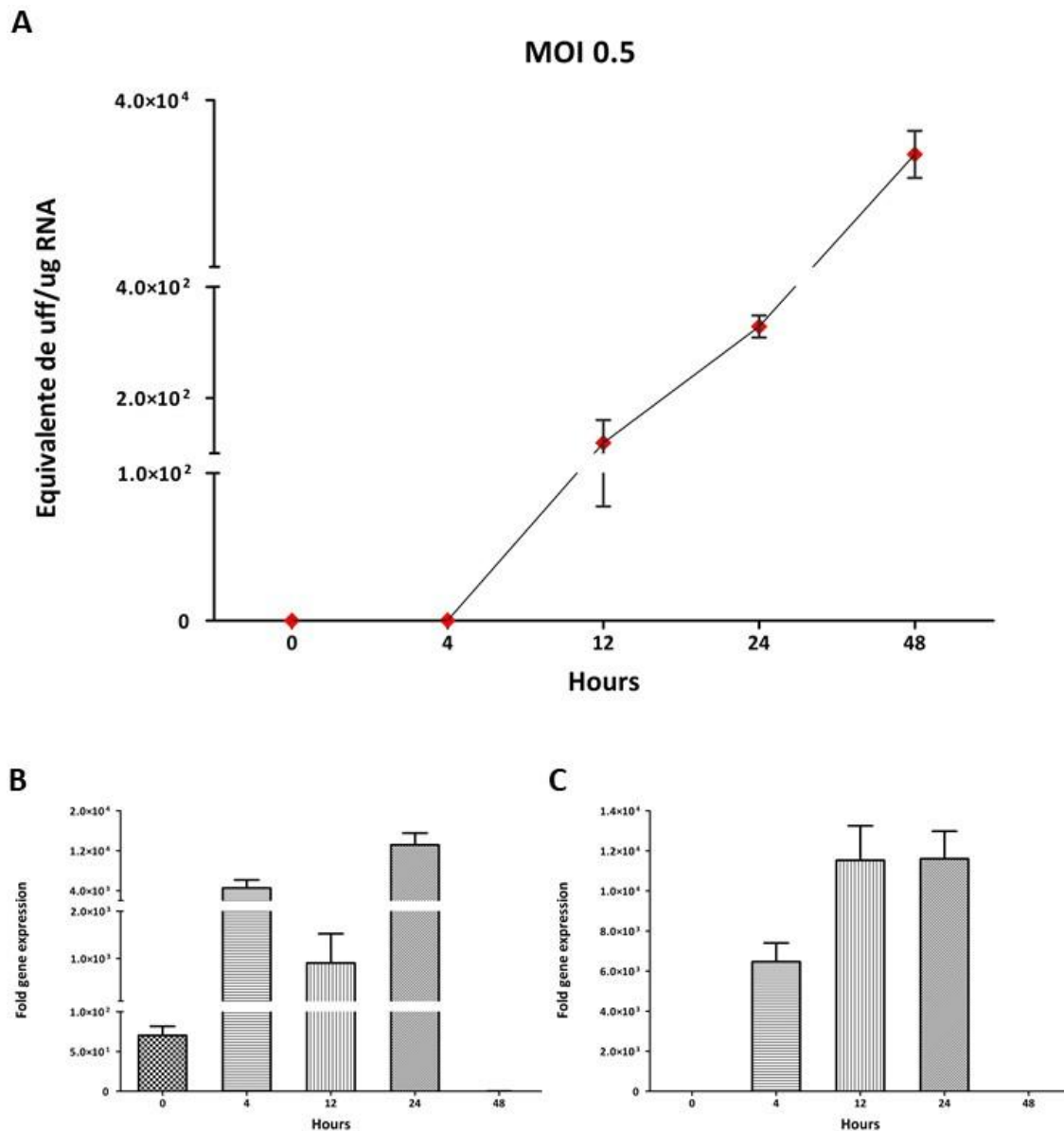


Figura 10. Cinéticas de infecção e expressão de IFNs α/β frente ao OROV. A) Cinética da replicação de OROV em células humanas HT1080 após infecção com MOI 0,5. B) Expressão de IFN α total em células infectadas com OROV (MOI 0,5) nos diferentes períodos da análise de cinética viral. C) Expressão de IFN β em células infectadas com OROV (MOI 0,5) nos diferentes períodos da análise de cinética viral.

7.3. Produção e caracterização dos vetores

O primeiro passo constituiu na produção e estoque de DNA plasmidial a partir das alíquotas de 4 μ L (não quantificadas) de cada um dos plasmídeos recebidos do Instituto Pirbright no Reino Unido. Bactérias DH5 α foram transformadas e o DNA purificado, quantificado e armazenado em freezer a -20°C. Para a aferição preliminar da integridade do material produzido, foi realizada a análise do DNA por meio de restrição enzimática de “digestão” em gel de agarose. Cada um dos vetores produzidos foi avaliado em duplicata, sendo que uma amostra foi submetida à eletroforese sem nenhum tipo de tratamento, com o DNA inteiro na sua forma circular e outra amostra teve o DNA cortado por meio da digestão enzimática nos sítios de restrição para as enzimas XbaI e XhoI que antecedem ao inserto Intron[Gene] e sucedem ao mesmo respectivamente segundo o mapa do vetor (Figura 7). Os resultados foram comparados ao marcador de peso molecular de 1 Kb e como esperado, o DNA cortado pelas enzimas teve o vetor linearizado que liberou o inserto. Como pode ser observado no mapa de digestão (Figura 11) as bandas liberadas confirmaram a presença do inserto Intron[Gene] de acordo com o peso molecular dos ISGs somados ao Intron. Como esperado, o vetor vazio (Empty Vector) não foi cortado pelas enzimas de restrição, devido ao fato do mesmo não possuir o *cassette* Intron[Gene] e portanto não possui os sítios de restrição para essas enzimas. Esse vetor foi utilizado como controle na caracterização, porém desconsiderado nos experimentos com células. Além disso, a presença dos ISGs foi confirmada por sequenciamento segundo material e métodos (resultados não informados).

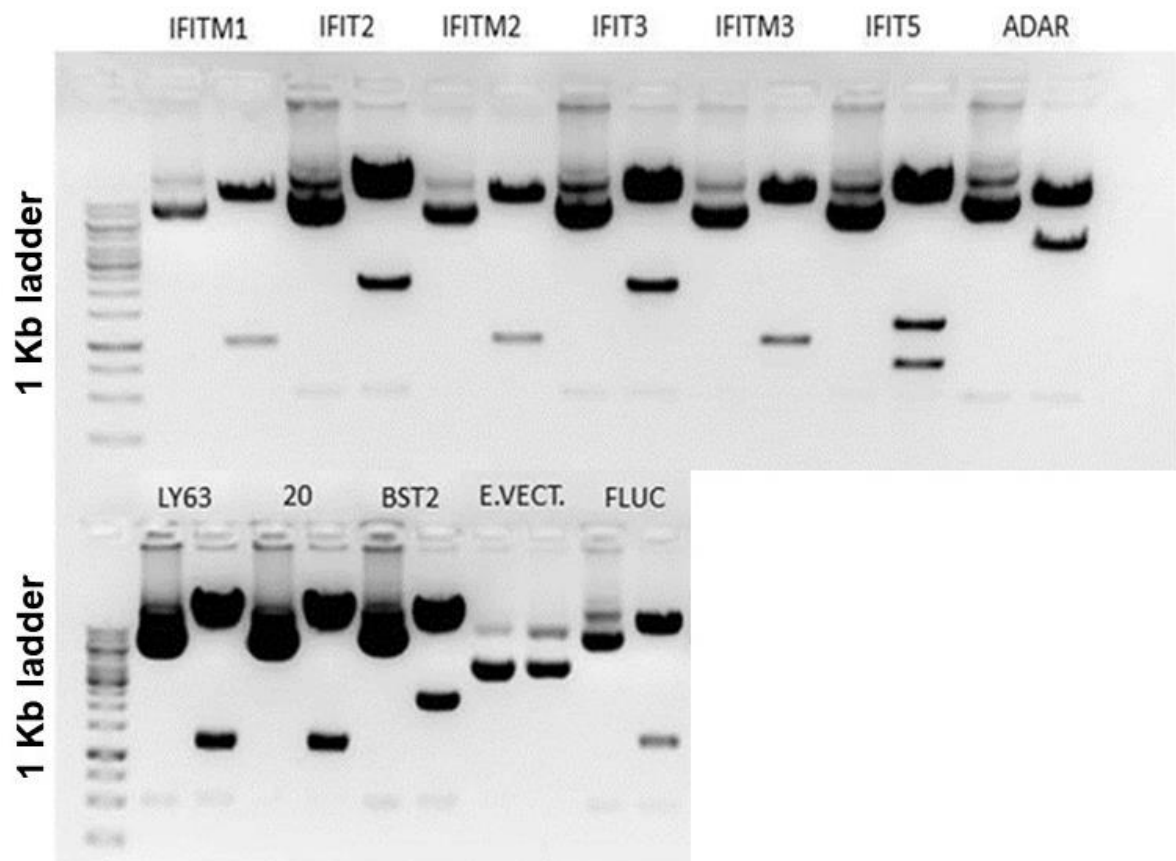


Figura 11. Mapa de digestão para comprovação dos vetores. A imagem do gel de agarose demonstra a integridade do DNA de cada um dos vetores produzidos ao comparar (esquerda para direita) o peso molecular (1 Kb ladder) de amostras integras (não cortadas) com amostras sujeitas a digestão (cortadas) por duas enzimas de restrição (Xho-I, Xba-I) que resultam na liberação do inserto Intron[Gene].

7.3.1. Titulação por FACS dos estoques lentivirais produzidos

Após a transfecção para a produção de cada um dos vetores lentivirais, os mesmos foram transduzidos em células HEK-293T plaqueadas em placas de 24 poços a fim de se obter o título viral em (mL) que foi utilizado para cálculo do MOI de infecção no experimento *in vitro*. Os títulos obtidos variaram entre 10^4 e 10^7 com exceção do gene IFITM1 que posteriormente foi concentrado por meio de coluna Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Unit with Ultracel-100 membrane (Sigma-Aldrich).

As produções também foram tituladas em células HT1080 utilizadas nos ensaios experimentais e podem ser visualizadas no quadro de resultados (Quadro 2). Alguns dos vetores foram mais eficientes em transduzir as células do experimento que as células de produção, sendo que diferentes células apresentam diferentes taxas de

transdução, portanto podemos observar que é essencial determinar o título dos vetores virais nas células a serem utilizadas nos experimentos subsequentes.

Gene/ Inserto	1ª Prod. # / título HEK-293T (mL)		2ª Prod. # / título HEK-293T (mL)		3ª Prod. # / título HEK-293T (mL)		4ª Prod. # / título HEK-293T (mL)		Título HT1080 # / título (mL)		Título HT1080 # / título (mL)	
IFIT1	152	1.1x10 ⁵	221	8.2x10 ⁴	326	5x10 ⁵			221	4.9x10 ⁵	369	1.2x10 ⁵
IFITM1	170	7.2x10 ²	224	7.5x10 ³	338	1.3x10 ⁶	344	1.6x10 ⁵	338	7.6x10 ⁵	344	1.1x10 ⁵
IFIT2	171	2.9x10 ⁴	291	8.7x10 ⁴	345	1.2x10 ⁵			291	2.3x10 ⁶	372	2.7x10 ⁵
IFITM2	172	9.9x10 ³	292	1.8x10 ⁵					172	4.2x10 ⁵	373	6.4x10 ⁵
IFIT3	173	5.5x10 ⁴	293	1.5x10 ⁵					173	5.5x10 ⁵	374	4.8x10 ⁵
IFITM3	174	1.4x10 ⁵	226	6.9x10 ⁴	314	7.4x10 ⁴			174	1.4x10 ⁶	375	1.0x10 ⁶
IFIT5	175	1.0x10 ⁵	227	9.2x10 ⁴	315	6x10 ⁴			227	8.4x10 ⁵	376	2.5x10 ⁵
ADAR	176	1.0x10 ⁴	294	4.8x10 ⁴					294	7.3x10 ⁴	377	1.6x10 ⁴
IRF1	153	2.3x10 ⁵	222	1.0x10 ⁵					153	2.4x10 ⁵	370	1.4x10 ⁴
LY6E	177	5.3x10 ³	225	4.2x10 ⁴					225	3.8x10 ⁵	378	1.9x10 ⁴
ISG20	178	1.1x10 ⁴	295	1.5x10 ⁴					295	1.3x10 ⁵	379	3.3x10 ⁴
BST2	179	7.1x10 ⁴	296	1.7x10 ⁵					296	1.4x10 ⁶	380	3.1x10 ⁵
Fluc	154	4.8x10 ⁵	223	6.8x10 ⁴	325	2x10 ⁶			154	4.1x10 ⁵	368	1.1x10 ⁵
FUGW	167	1.3x10 ⁷	220	2x10 ⁷	290	3x10 ⁷			220	2.5x10 ⁷	290	1.6x10 ⁷
											367	2.8x10 ⁶

Quadro 2. Títulos de lentivírus expressando ISGs. Relação dos títulos de lentivírus expressando ISGs resultantes das transduções em células HEK-293T e células HT1080.

7.4. Avaliação da infecção por OROV em células que superexpressam ISGs humanos

Os produtos de experimentos consecutivos realizados como proposto na abordagem experimental foram processados por FACS e avaliados de maneira quantitativa como descrito em materiais e métodos. O percentual de células infectadas (% FITC) dentro da população de células transduzidas (Figura 12) e o gene Fluc, controle (+) da infecção, foi normalizado para 100%. O gráfico foi obtido a partir de quatro experimentos independentes, representando a média e o erro SEM. Do painel de genes propostos no trabalho, apenas os genes LY6E e ISG20 demonstraram atividade antiviral com redução significativa na infecção em relação ao controle. Outros genes demonstraram potencial de terem atividade antiviral, porém a redução do percentual de células infectadas com OROV não significativa. Isso faz com que

novos experimentos sejam necessários, principalmente aqueles que visem avaliar o potencial desses ISGs atuando em sinergia durante a resposta contra OROV.

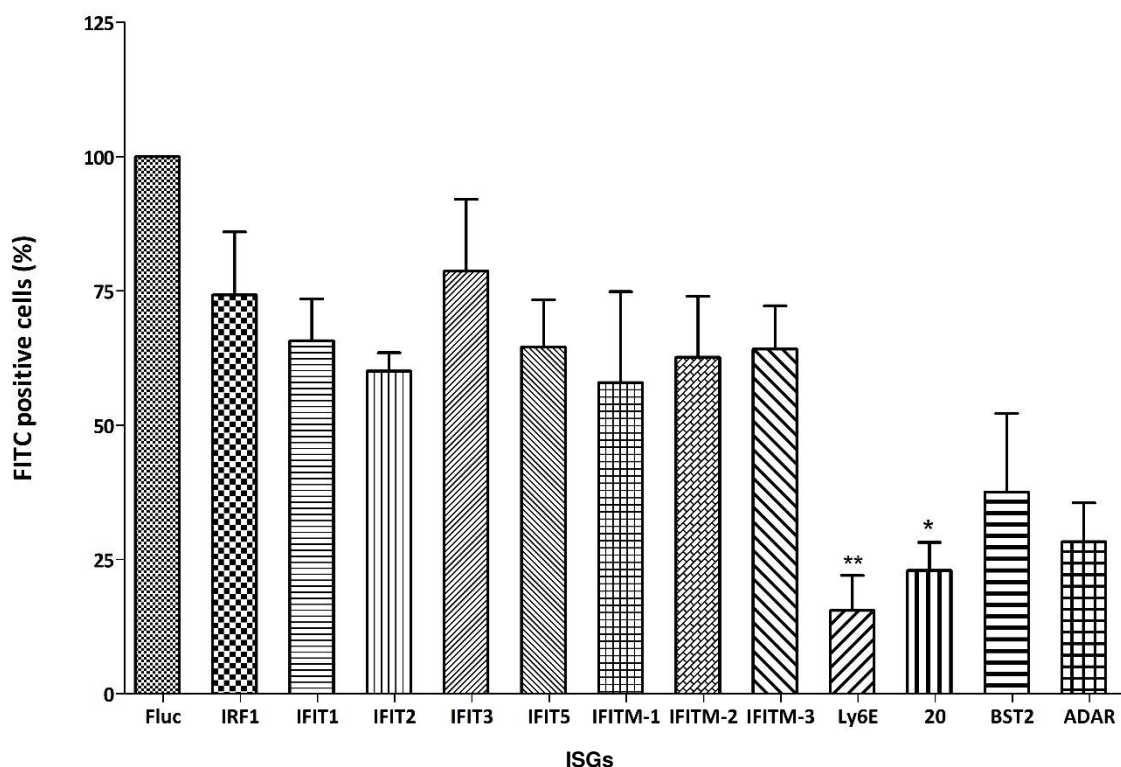


Figura 12. Percentual de células infectadas (% FITC) dentro da população de células transduzidas. O gene Fluc foi normalizado para 100% da infecção.

7.5. Confirmação da expressão de ISGs nas células modificadas por lentivirus

Para confirmar a superexpressão dos ISGs em células HT1080 após tradução com lentivirus, realizamos três experimentos independentes. No primeiro, células parentais foram infectadas com OROV e não transduzidas. No segundo, as células foram transduzidas com lentivirus para a superexpressão dos ISGs, mas não foram infectadas, enquanto no último, as células foram transduzidas e posteriormente infectadas com OROV no mesmo modelo do desenho experimental analisado por FACS e descrito anteriormente. Para tanto, os produtos da expressão gênica de cada um dos ISGs foram analisados por RT-qPCR após normalização com GAPDH, utilizando células HT1080 parentais sem nenhum tratamento como referência. Como narrado anteriormente, células HT1080 infectadas com OROV e não transduzidas não apresentaram níveis significantes de expressão dos 12 ISGs após 24 h.p.i, indicando

que OROV possua algum mecanismo para inibir a ativação desses doze ISGs em fibroblastos de origem humana (Figura 13).

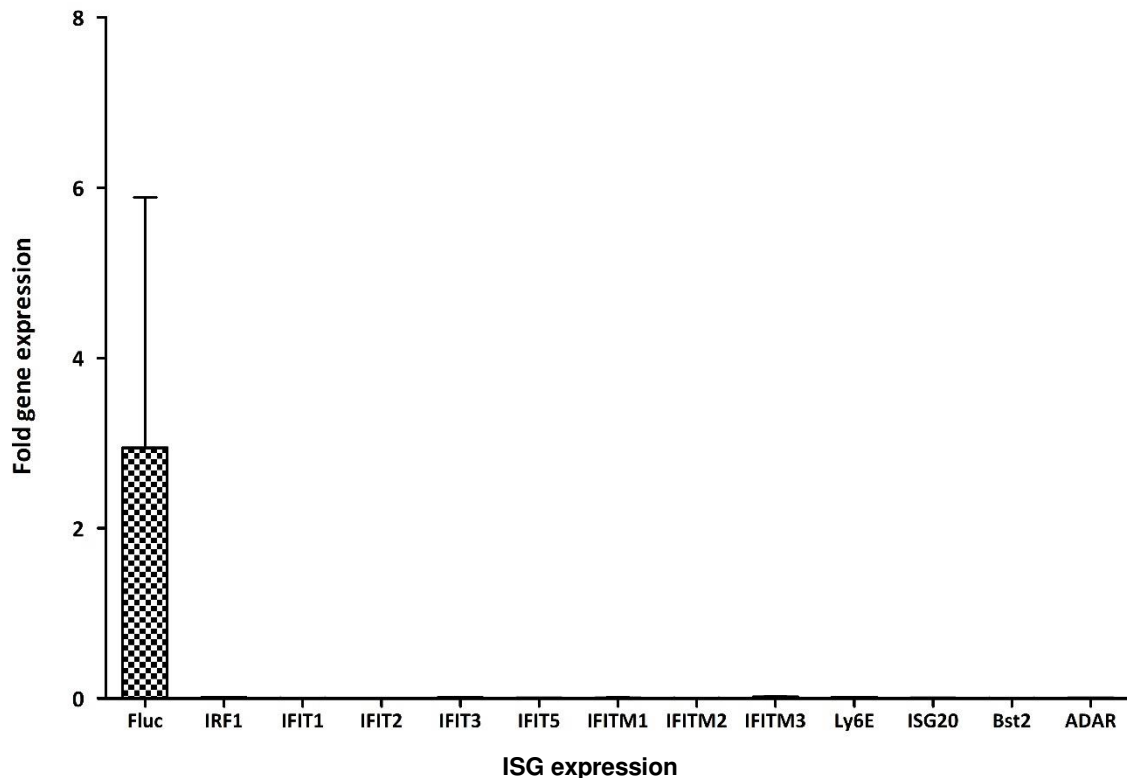


Figura 13. RT-qPCR de células HT1080 infectadas com OROV e não transduzidas.

Em contrapartida, células transduzidas com os lentivirus (IFITM1, IFITM2, LY6E, BST2 e ADAR) e não infectadas apresentaram maior expressão desses ISGs em relação as células parentais não tratadas (Figura 14), indicando que a superexpressão desses genes pelos respectivos vetores virais funcionou a contento. Por fim, HT1080 transduzidas e infectadas com OROV também demonstraram diferença de expressão dos seguintes genes: IFITM1, LY6E, BST2 e ADAR (Figura 15), indicando que a inibição da infecção pode estar correlacionada ao aumento da expressão desses genes. Desse modo, os dados somados apontam que o produto de LY6E possui atividade antiviral essencial contra OROV, uma vez que a diminuição da infecção por OROV foi acompanhado pelo aumento da expressão desse gene após transdução com os vetores virais. Os dados relacionados a ISG20, BST2 e ADAR ainda precisarão ser validados, pois a diminuição da infecção por OROV não foi acompanhado pelo aumento da expressão do respectivo gene ou não foi estatisticamente relevante.

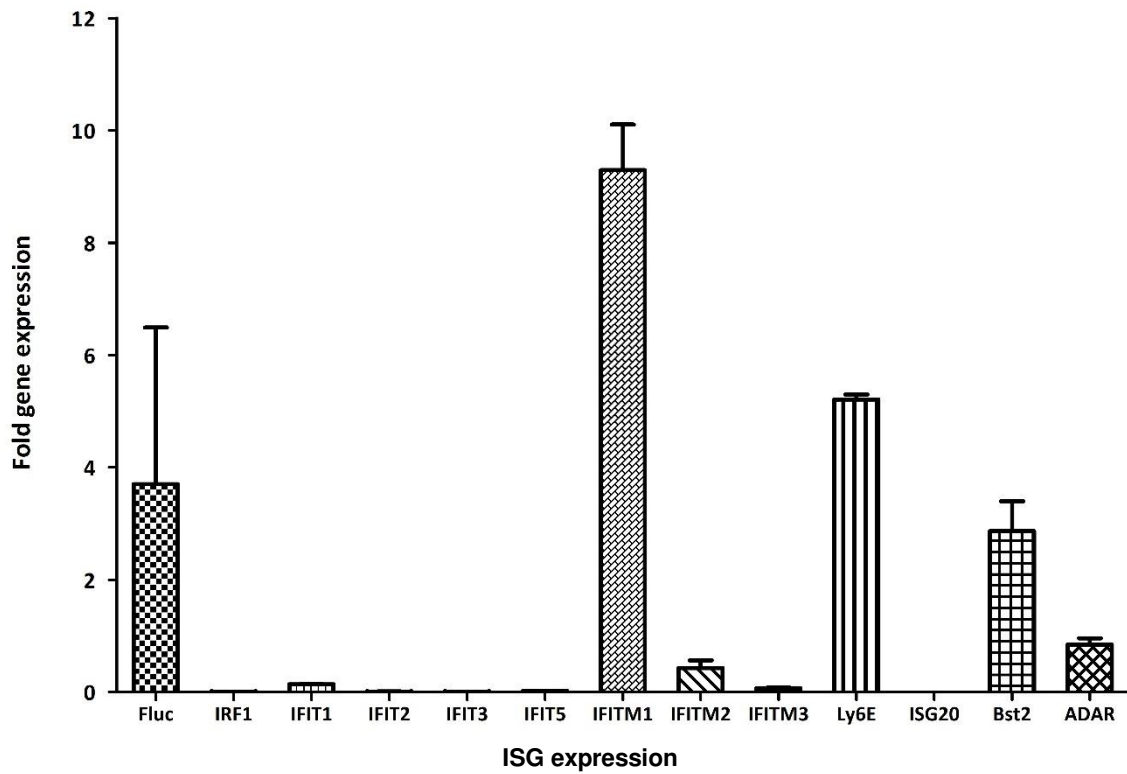


Figura 14. RT-qPCR de células HT1080 transduzidas com lentivirus expressando ISGs humanos.

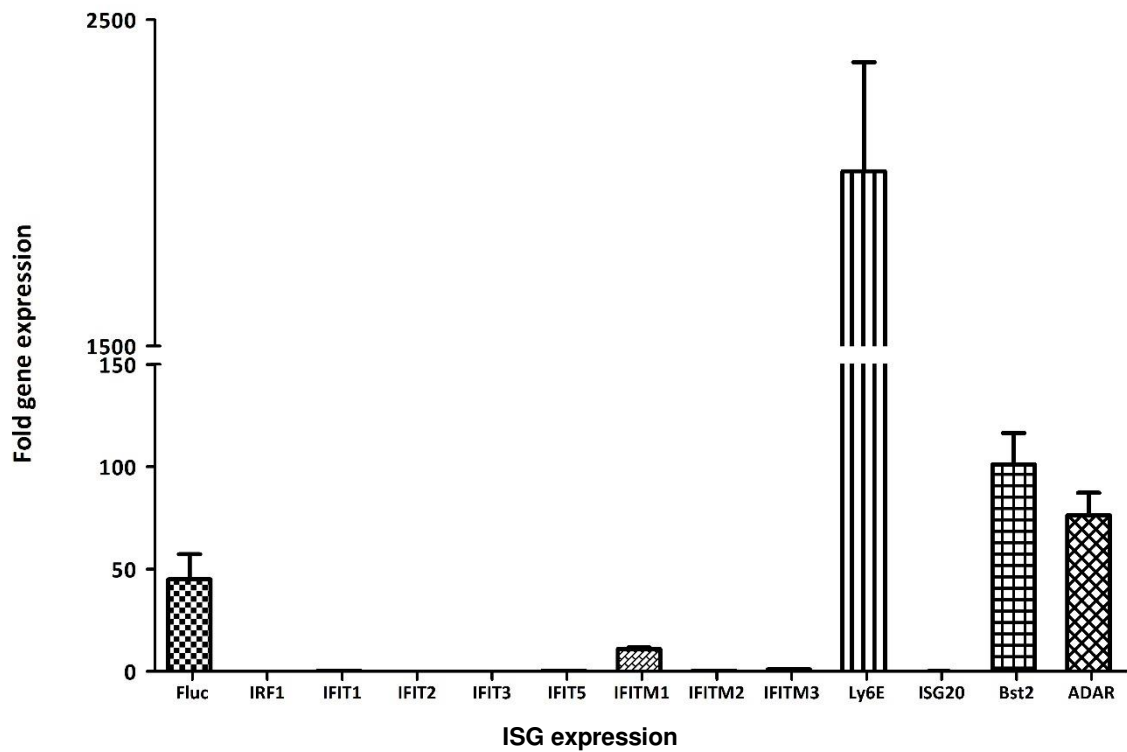


Figura 15. RT-qPCR de células HT1080 transduzidas com lentivirus expressando ISGs humanos seguido de infecção com OROV.

8. DISCUSSÃO

O sistema de interferon (IFN) é uma resposta extremamente poderosa, capaz de controlar a maioria das infecções virais na ausência da imunidade adaptativa. Os fatores celulares que medeiam essa defesa são produtos de genes estimulados por interferon (ISGs), cuja ação conjunta gera um “estado antiviral”. Embora centenas de ISGs tenham sido identificados desde sua descoberta há mais de 25 anos, apenas alguns foram caracterizados em relação à sua atividade antiviral. Os IFNs do Tipo I são conhecidos por limitar a replicação dos bunyavirus tanto *in vitro* como *in vivo*, com implicações importantes para a patogênese [63-70]. Entretanto, o papel dos diferentes ISGs no controle de bunyavirus foi pouco explorado na literatura. Nesse estudo, mostramos a primeira evidência experimental que alguns ISGs, particularmente LY6E, são capazes de restringir a infecção por um importante bunyavirus brasileiro, o vírus Oropouche (OROV).

OROV é um dos mais importantes orthobunyavirus associados a doenças negligenciadas humanas na América tropical, mas os mecanismos associados com o desenvolvimento de doença ainda não são totalmente entendidos. Nesse estudo fornecemos uma das primeiras evidências de que OROV possa infectar fibroblastos de origem humana, uma vez que células HT1080 foram susceptíveis e permissivas a infecção com OROV, com acúmulo exponencial de RNA viral intracelular durante os intervalos de 4, 12, 24 e 48 hpi. O impacto da infecção de fibroblastos para a patogênese de OROV ainda é desconhecido, mas pode ser relevante durante o início da infecção, uma vez que essas células são abundantes no sítio de entrada viral após a picada pelo inseto vetor [173, 174]. Além disso, células dendríticas e macrófagos, pelo menos de camundongos, são naturalmente resistentes a infecção por OROV [119], indicando que outras células, como fibroblastos, podem ter papel essencial para a amplificação da infecção no sítio de entrada viral.

No presente estudo observamos que a cinética de produção de genoma viral se correlaciona com o aumento da expressão de IFNs do Tipo I sem um concomitante aumento da expressão dos ISGs analisados. Esses dados indicam que OROV pode possuir algum mecanismo de inibir componentes-chaves da via de IFN que ajam após a produção dessas citocinas em fibroblastos humanos. As proteínas não estruturais de OROV são bons candidatos, afinal estudos com outros bunyavírus tem destacado o papel de NSs na inibição da via dos IFNs do tipo I [65, 77-85, 175]. Desse modo,

acreditamos que a utilização de sistemas de genética reversa para OROV, particularmente aqueles que levem a produção de vírus sem NSs e NSm, poderiam fornecer indícios importantes sobre os mecanismos de antagonismo imune do OROV e apontar indiretamente para componentes chaves da resposta antiviral contra esse vírus.

Visto que fibroblastos foram susceptíveis e permissivos, e que essas células são relevantes para a patogênese de OROV, uma vez que elas são presentes em grande número no sítio de entrada viral, resolvemos avaliar o papel de 12 genes estimulados por IFNs (ISGs) na infecção viral por OROV em HT1080 utilizando a tecnologia de lentivirus. O sistema de vetores lentivirais é utilizado na terapia genica por meio dos quais genes podem ser inseridos, modificados ou deletados num organismo alvo, e tem a capacidade de carregar uma grande quantidade de material genético assim como transduzir células em divisão e sem divisão. O capsídeo dos lentivirus pode ter tropismo específico pelas células alvo, dado por glicoproteínas que são apresentadas na sua superfície [148]. Assim, neste trabalho utilizamos lentivirus com o capsídeo VSV-G que tem ampla taxa de transdução em vários tipos celulares [157].

Desse modo, células HT1080 foram transduzidas com ISGs e após serem infectadas, foram analisadas por citometria de fluxo para determinar a taxa de infecção em células que superexpressavam esses ISGs. Os dados de superexpressão foram validados por qRT-PCR, de modo que o único gene que possuiu efeito antiviral significativo acompanhado do aumento da expressão foi LY6E. LY6E, do inglês *Lymphocyte antigen 6 complex, locus E*, também conhecido como TSA-1 (do inglês - thymic shared antigen 1) ou SCA-2 (do inglês - stem cell antigen 2) ou RIG-E (do inglês - *retinoic acid-induced gene E*) é uma proteína induzida por IFN pertencente à família Ly-6/uPAR. A porção terminal possui uma âncora de GPI (do inglês - *glycosylphosphatidylinositol*), que permite com que essa proteína se ancore em microdomínios da membrana plasmática ricos em jangadas lipídicas, e que são importantes para o brotamento de muitos vírus [19, 159-161, 176-181]. Assim, alguns pesquisadores acreditam que LY6E pode inibir o brotamento e montagem de alguns vírus [19, 23, 189]. LY6E foi inicialmente caracterizado como um marcador de timócito, que discrimina subtipos maduros e imaturos de células T. Além disso, LY6E modula a sinalização mediada por TCR, a ativação de células T, a adesão celular, migração e produção de citocinas [182, 183].

O efeito de LY6E durante infecções virais ainda não foi profundamente estudado. A maioria dos relatos mostraram que LY6E possui efeito predominantemente pró-viral [19, 159-161], embora relatos recentes tenham demonstrado que LY6E possui atividade antiviral contra vírus específicos em alguns tipos celulares. Em 2016, em um estudo para identificar ISGs com atividade antirretroviral, Kane *et al.* relatou LY6E poderia ter efeito contrário em linhagens celulares distintas [27]. Mar *et al.* também relataram atividades ambíguas de LY6E para vírus de diferentes famílias, que podem estar associadas a diferenças tanto na estratégia de replicação dos vírus, como do maquinário celular presente em diferentes células do hospedeiro [170]. Além disso, a atividade anti-OROV do LY6E pode ter sido dependente do contexto geral do experimento. Assim, experimentos adicionais, como aqueles utilizando siRNAs [164, 165, 186] ou CRISPR-CAS9 [184, 185], ainda precisarão ser realizados para confirmar o papel de LY6E para o controle da infecção em humanos.

Além de LY6E, outros genes apresentaram resultados promissores. A transdução com os vetores de ISG20 reduziram significativamente a infecção por OROV, embora a superexpressão do gene não tenha sido validada por qRT-PCR. Isso pode estar relacionado pelo fato da expressão ter sido determinada com o RNA total do pool de células transduzidas. Como o título dos lentivirus obtidos teve grande variação, e as taxas de transdução não foram tão eficientes, células não transduzidas poderiam mascarar o efeito do aumento da expressão de ISG20. Neste sentido, acreditamos que a análise da expressão de ISG20 em células sorteadas por citometria de fluxo seria uma solução interessante, pois assim analisaríamos o nível de expressão e a taxa de infecção apenas em células transduzidas.

A superexpressão de BST2 (do inglês - *bone marrow stromal antigen 2*) ou *Tetherin*, também levou a uma diminuição da infecção por OROV, embora os valores não tenham sido significantes. Esse aumento da expressão foi validado por qRT-PCR, indicando que BST2 pode ter mesmo um efeito antiviral importante contra OROV em fibroblastos humanos. Assim como LY6E, BST2 também interage com domínios de jangadas lipídicas ricos em colesterol na membrana plasmática, indicando que ele pode interferir na montagem e brotamento de alguns vírus [6, 19, 27, 159, 188]. De fato, dados na literatura descrevem o efeito antiviral de BST2 [158, 168, 169]. BST2 é constitutivamente expresso em células B maduras, células do plasma, células dendríticas plasmocitóides e muitos outros tipos celulares e age em outros

fenômenos complexos, como adesão e migração celular. Assim, acreditamos que estudos futuros devam ser realizados para estudar e caracterizar melhor o papel de BST2 durante a infecção por OROV.

Por fim, outros ISGs apresentaram resultados estatisticamente não significativos, mas que podem indicar efeito antiviral contra OROV. Destacam-se os resultados observados para IFIT-2, IFITM1-3 e ADAR. Esses resultados foram condizentes com a literatura [2, 13, 19, 90, 149-153, 159, 162-168], porém precisam ser validados, principalmente por experimentos que visem analisar o efeito sinérgico deles durante a resposta contra OROV.

Considerando os resultados obtidos aqui, pretendemos caracterizar o efeito da diminuição da expressão de LY6E, BST2, ISG20 pela utilização da tecnologia de RNAi. Pretendemos utilizar vetores retrovirais para gerar linhagens celulares que expressem de forma permanente os siRNAs específicos, de modo a minimizar o efeito mascarador observado nesse estudo, decorrente do grande número de células não transduzidas. Além disso, pretendemos avaliar o efeito desses genes para a patogênese *in vivo*, usando modelos de camundongos *knockout*, como já utilizado em estudos sobre a atividade de diferentes ISGs durante infecções virais *in vivo* [119, 164, 165]. Além disso, a utilização do sistema Cre-recombinase LoxP [187] permite gerar animais em que um desses genes pode ser deletado em tipos celulares específicos, como macrófagos, células dendríticas, fibroblastos etc.

Assim, a investigação do papel de ISGs individuais em tipos celulares específicos é uma importante ferramenta para a elucidação de mecanismos patogénéticos de vírus emergentes e/ou negligenciados, como OROV, que pode contribuir para o conhecimento necessário para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas eficientes contra esse vírus brasileiro.

9. CONCLUSÕES

1. Células de linhagem de fibrosarcoma humano HT1080 são permissíveis e susceptíveis a infecção por OROV.
2. A infecção por OROV em células HT1080 induz a expressão de IFNs tipo I, sem levar a expressão dos ISGs estudados.
3. A transdução com vetores lentivirais seguido de infecção e leitura em citometria de fluxo foi eficiente para triar ISGs com atividade antiviral frente a um vírus pouco estudado.
4. LY6E tem atividade antiviral contra OROV em HT1080.
5. BST2, IS20 e outros ISGs, como IFIT-2, IFITM-1 a 3 e ADAR, podem ter atividade antiviral contra OROV em células humanas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. McNab F, Mayer-Barber K, Sher A, Wack A, O'Garra A. 2015. Type I interferons in infectious disease. *Nat Rev Immunol* 15:87–103.
2. Schneider WM, Chevillotte MD, Rice CM. 2014. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annu Rev Immunol* 32:513–45.
3. Kawai T, Akira S. 2011. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity* 34:637–50.
4. Lasfar A, Abushahba W, Balan M, Cohen-Solal K a. 2011. Interferon lambda: A new sword in cancer immunotherapy. *Clin Dev Immunol* 2011.
5. Platanias LC. 2005. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol* 5:375–86.
6. Schoggins JW, Rice CM. 2011. Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions. *Curr Opin Virol* 1:519–25.
7. Bick MJ, Carroll JN, Gao G, Goff SP, Rice CM, MacDonald MR. 2003. Expression of the zinc-finger antiviral protein inhibits alphavirus replication. *J Virol* 77:11555–62.
8. Brass AL, Huang I-C, Benita Y, John SP, Krishnan MN, Feeley EM, Ryan BJ, Weyer JL, Weyden L Van Der, Fikrig E, Adams J, Xavier RJ, Farzan M, Elledge SJ, van der Weyden L, Adams DJ. 2009. The IFITM proteins mediate cellular resistance to influenza A H1N1 virus, West Nile virus, and dengue virus. *Cell* 139:1243–54.
9. Stremlau M, Owens CM, Perron MJ, Kiessling M, Autissier P, Sodroski J. 2004. The cytoplasmic body component TRIM5alpha restricts HIV-1 infection in Old World monkeys. *Nature* 427:848–853.
10. Haller O, Kochs G. 2011. Human MxA Protein: An Interferon-Induced Dynamin-Like 107 GTPase with Broad Antiviral Activity. *J Interf Cytokine Res* 31:79–87.

11. Shu Q, Lennemann NJ, Sarkar SN, Sadovsky Y, Coyne CB. 2015. ADAP2 Is an Interferon Stimulated Gene That Restricts RNA Virus Entry. *PLoS Pathog* 11.
12. Iwasaki A. 2012. A virological view of innate immune recognition. *Annu Rev Microbiol* 66:177–96.
13. Diamond MS, Farzan M. 2013. The broad-spectrum antiviral functions of IFIT and IFITM proteins. *Nat Rev Immunol* 13:46–57.
14. Lenschow DJ, Lai C, Frias-Staheli N, Giannakopoulos N V, Lutz A, Wolff T, Osiak A, Levine B, Schmidt RE, García-Sastre A, Leib DA, Pekosz A, Knobeloch K, Horak I, Virgin HW. 2007. IFN-stimulated gene 15 functions as a critical antiviral molecule against influenza, herpes, and Sindbis viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:1371–6.
15. Lenschow DJ, Giannakopoulos N V, Gunn LJ, Johnston C, O'Guin AK, Schmidt RE, Levine B, Virgin HW. 2005. Identification of interferon-stimulated gene 15 as an antiviral molecule during Sindbis virus infection in vivo. *J Virol* 79:13974–83.
16. Werneke SW, Schilte C, Rohatgi A, Monte KJ, Michault A, Arenzana-Seisdedos F, Vanlandingham DL, Higgs S, Fontanet A, Albert ML, Lenschow DJ. 2011. ISG15 is critical in the control of Chikungunya virus infection independent of UbE1L mediated conjugation. *PLoS Pathog* 7:e1002322.
17. Mattijssen S, Pruijn GJM. 2012. Viperin, a key player in the antiviral response. *Microbes Infect.*
18. Jones PH, Maric M, Madison MN, Maury W, Roller RJ, Okeoma CM. 2013. BST-2/tetherin-mediated restriction of chikungunya (CHIKV) VLP budding is counteracted by CHIKV non-structural protein 1 (nsP1). *Virology* 438:37–49.
19. Schoggins JW, Wilson SJ, Panis M, Murphy MY, Jones CT, Bieniasz P, Rice CM. 2011. A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response. *Nature* 472:481–5. 108

20. Li J, Ding SC, Cho H, Chung BC, Gale M, Chanda SK, Diamond MS. 2013. A short hairpin RNA screen of interferon-stimulated genes identifies a novel negative regulator of the cellular antiviral response. *MBio* 4:e00385-13.

21. François-Newton V, de Freitas Almeida GM, Payelle-Brogard B, Monneron D, Pichard-Garcia L, Piehler J, Pellegrini S, Uzé G. 2011. USP18-based negative feedback control is induced by type I and type III interferons and specifically inactivates interferon α response. *PLoS One* 6.

22. Silva JM, Li MZ, Chang K, Ge W, Golding MC, Rickles RJ, Siolas D, Hu G, Paddison PJ, Schlabach MR, Sheth N, Bradshaw J, Burchard J, Kulkarni A, Cavet G, Sachidanandam R, McCombie WR, Cleary M a, Elledge SJ, Hannon GJ. 2005. Second-generation shRNA libraries covering the mouse and human genomes. *Nat Genet* 37:1281–8.

23. Liu S-Y, Sanchez DJ, Aliyari R, Lu S, Cheng G. 2012. Systematic identification of type I and type II interferon-induced antiviral factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109:4239–44.

24. Fusco DN, Brisac C, John SP, Huang Y-W, Chin CR, Xie T, Zhao H, Jilg N, Zhang L, Chevaliez S, Wambua D, Lin W, Peng L, Chung RT, Brass AL. 2013. A genetic screen identifies interferon- α effector genes required to suppress hepatitis C virus replication. *Gastroenterology* 144:1438–49, 1449–9.

25. Metz P, Dazert E, Ruggieri A, Mazur J, Kaderali L, Kaul A, Zeuge U, Windisch MP, Trippler M, Lohmann V, Binder M, Frese M, Bartenschlager R. 2012. Identification of type I and type II interferon-induced effectors controlling hepatitis C virus replication. *Hepatology* 56:2082–93.

26. Varble A, Benitez A a, Schmid S, Sachs D, Shim J V, Rodriguez-Barrueco R, Panis M, Crumiller M, Silva JM, Sachidanandam R, tenOever BR. 2013. An in vivo RNAi screening approach to identify host determinants of virus replication. *Cell Host Microbe* 14:346–56.

27. Kane M, Zang TM, Rihn SJ, Zhang F, Kueck T, Alim M, Schoggins J, Rice CM, 109 Wilson SJ, Bieniasz PD. 2016. Identification of Interferon-Stimulated Genes with Antiretroviral Activity. *Cell Host Microbe* 20:392–405.
28. McFadden G, Mohamed MR, Rahman MM, Bartee E. Cytokine determinants of viral tropism. *Nat Rev Immunol*. Nature Publishing Group; 2009 Aug 21;9(9):645–55.
29. Swaminathan G, Martin-Garcia J, Navas-Martin S. RNA viruses and microRNAs: challenging discoveries for the 21st century. *Physiological Genomics*. 2013;45(22):1035-48.
30. Granich R, Gupta S, Hersh B, Williams B, Montaner J, Young B, et al. Trends in AIDS Deaths, New Infections and ART Coverage in the Top 30 Countries with the Highest AIDS Mortality Burden; 1990-2013. *Plos One*. 2015;10(7).
31. Neumann G, Kawaoka Y. The first influenza pandemic of the new millennium. *Influenza and Other Respiratory Viruses*. 2011;5(3):157-66.
32. Cheng VCC, To KKW, Tse H, Hung IFN, Yuen KY. Two Years after Pandemic Influenza A/2009/H1N1: What Have We Learned? *Clinical Microbiology Reviews*. 2012;25(2):223-63.
33. Thi EP, Mire CE, Lee ACH, Geisbert JB, Zhou JZ, Agans KN, et al. Lipid nanoparticle siRNA treatment of Ebola-virus-Makona-infected nonhuman primates. *Nature*. 2015;521(7552):362-+.
34. Tong Y-G, Shi W-F, Liu D, Qian J, Liang L, Bo X-C, et al. Genetic diversity and evolutionary dynamics of Ebola virus in Sierra Leone (vol 524, pg 93, 2015). *Nature*. 2015;526(7574).
35. de La Vega MA, Stein D, Kobinger GP. Ebolavirus Evolution: Past and Present. *Plos Pathogens*. 2015;11(11).

36. Rhein BA, Brouillette RB, Schaack GA, Chiorini JA, Maury W. Characterization of Human and Murine T-Cell Immunoglobulin Mucin Domain 4 (TIM-4) IgV Domain Residues Critical for Ebola Virus Entry. *Journal of Virology*. 2016;90(13):6097-111.
37. Lavanchy D. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *Journal of Viral Hepatitis*. 2004;11(2):97-107.
38. Shepard CW, Finelli L, Alter M. Global epidemiology of hepatitis C virus infection. *Lancet Infectious Diseases*. 2005;5(9):558-67.
39. Zhong NS, Zheng BJ, Li YM, Poon LLM, Xie ZH, Chan KH, et al. Epidemiology and cause of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangdong, People's Republic of China, in February, 2003. *Lancet*. 2003;362(9393):1353-8.
40. Rota PA, Featherstone DA, Bellini WJ. Molecular Epidemiology of Measles Virus. *Measles: Pathogenesis and Control*. 2009;330:129-50.
41. Rigau-Perez JG, Clark GG, Gubler DJ, Reiter P, Sanders RJ, Vorndam AV. Dengue and dengue haemorrhagic fever. *Lancet*. 1998;352(9132):971-7.
42. Adams MJ, Lefkowitz EJ, King AMQ, Harrach B, Harrison RL, Knowles NJ, Kropinski AM, Krupovic M, Kuhn JH, Mushegian AR, Nibert M, Sabanadzovic S, Sanfacon H, Siddell SG, Simmonds P, Varsani A, Zerbini FM, Gorbalenya AE, Davison AJ. 2017. Changes to taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2017). *Arch Virol* 162:2505–2538.
43. Elliott R, Schmaljohn C. 2013. Bunyaviridae, p 1244–1282. In Knipe DM, Howley PM, Cohen JI, Griffin DE, Lamb RA, Martin MA, Racaniello VR, Roizman B (ed), *Fields virology*, 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.

44. Alexander DJ. Newcastle disease and other avian paramyxoviruses. *Revue Scientifique Et Technique De L Office International Des Epizooties*. 2000;19(2):443-62.
45. Aldous EW, Mynn JK, Banks J, Alexander DJ. A molecular epidemiological study of avian paramyxovirus type 1 (Newcastle disease virus) isolates by phylogenetic analysis of a partial nucleotide sequence of the fusion protein gene. *Avian Pathology*. 2003;32(3):239-57.
46. Thompson D, Muriel P, Russell D, Osborne P, Bromley A, Rowland M, et al. Economic costs of the foot and mouth disease outbreak in the United Kingdom in 2001. *Revue Scientifique Et Technique De L Office International Des Epizooties*. 2002;21(3):675-87.
47. Olival KJ, Hosseini PR, Zambrana-Torrel C, Ross N, Bogich TL, Daszak P. 2017. Host and viral traits predict zoonotic spillover from mammals. *Nature* 546:646–650.
48. Manrubia SC, Lazaro E. Viral evolution. *Physics of Life Reviews*. 2006;3(2):65-92.
49. Ahlquist P. Parallels among positive-strand RNA viruses, reverse-transcribing viruses and double-stranded RNA viruses. *Nature Reviews Microbiology*. 2006;4(5):371-82.
50. Steinhauer DA, Holland JJ. Rapid evolution of RNA viruses. *Annual Review of Microbiology*. 1987;41:409-33.
51. Gordon LK. Retroviruses and retroviral diseases. *Walsh and Hoyt's Clinical Neuro-Ophthalmology 6th edition*: Lippincott Williams & Wilkins; 2005. p. 3323-68.
52. Castón JR, Carrascosa JL. The Basic Architecture of Viruses. In: Mateu GM, editor. *Structure and Physics of Viruses: An Integrated Textbook*: Springer Netherlands; 2013. p. 53-75.

53. Gelderblom HR. Structure and classification of viruses. University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996.
54. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J. Viruses: Structure, Function, and Uses. Molecular Cell Biology. 4th ed: WH Freeman; 2000.
55. Wyatt R, Sodroski J. The HIV-1 envelope glycoproteins: Fusogens, antigens, and immunogens. *Science*. 1998;280(5371):1884-8.
56. Matrosovich MN, Matrosovich TY, Gray T, Roberts NA, Klenk HD. Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(13):4620-4.
57. Aleksandrowicz P, Marzi A, Biedenkopf N, Beimforde N, Becker S, Hoenen T, et al. Ebola Virus Enters Host Cells by Macropinocytosis and Clathrin-Mediated Endocytosis. *Journal of Infectious Diseases*. 2011;204:S957-S67.
58. Gutierrez C, Martínez-Salas E. Replication of Viruses Infecting Eukaryotes: John Wiley & Sons, Ltd; 2001.
59. Schlee M, Roth A, Hornung V, Hagmann CA, Wimmenauer V, Barchet W, Coch C, Janke M, Mihailovic A, Wardle G, Juranek S, Kato H, Kawai T, Poeck H, Fitzgerald KA, Takeuchi O, Akira S, Tuschl T, Latz E, Ludwig J, Hartmann G. 2009. Recognition of 5' triphosphate by RIG-I helicase requires short blunt double-stranded RNA as contained in panhandle of negative-strand virus. *Immunity* 31:25–34.
60. Schmidt A, Schwerdt T, Hamm W, Hellmuth JC, Cui S, Wenzel M, Hoffmann FS, Michallet MC, Besch R, Hopfner KP, Endres S, Rothenfusser S. 2009. 5'-Triphosphate RNA requires base-paired structures to activate antiviral signaling via RIG-I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:12067–12072.
61. Weber M, Weber F. 2014. RIG-I-like receptors and negative-strand RNA viruses: RLRly bird catches some worms. *Cytokine Growth Factor Rev* 25:621– 628.

62. Schneider WM, Chevillotte MD, Rice CM. 2014. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annu Rev Immunol* 32:513–545.
63. Morrill JC, Jennings GB, Cosgriff TM, Gibbs PH, Peters CJ. 1989. Prevention of Rift Valley fever in rhesus monkeys with interferonalpha. *Rev Infect Dis* 11(Suppl 4):S815–S825.
64. Andersson I, Lundkvist A, Haller O, Mirazimi A. 2006. Type I interferon inhibits Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in human target cells. *J Med Virol* 78:216 – 222.
65. Habjan M, Pichlmair A, Elliott RM, Overby AK, Glatter T, Gstaiger M, Superti-Furga G, Unger H, Weber F. 2009. NSs protein of Rift Valley fever virus induces the specific degradation of the double-stranded RNAdependent protein kinase. *J Virol* 83:4365–4375.
66. Livonesi MC, de Sousa RL, Badra SJ, Figueiredo LT. 2007. In vitro and in vivo studies of the interferon-alpha action on distinct orthobunyavirus. *Antiviral Res* 75:121–128.
67. Luby JP. 1975. Sensitivities of neurotropic arboviruses to human interferon. *J Infect Dis* 132:361–367.
68. Tamura M, Asada H, Kondo K, Takahashi M, Yamanishi K. 1987. Effects of human and murine interferons against hemorrhagic fever with renal syndrome (HFRS) virus (Hantaan virus). *Antiviral Res* 8:171–178.
69. Temonen M, Lankinen H, Vapalahti O, Ronni T, Julkunen I, Vaheri A. 1995. Effect of interferon-alpha and cell differentiation on Puumala virus infection in human monocyte/macrophages. *Virology* 206:8 –15.

70. Streitenfeld H, Boyd A, Fazakerley JK, Bridgen A, Elliott RM, Weber F. 2003. Activation of PKR by Bunyamwera virus is independent of the viral interferon antagonist NSs. *J Virol* 77:5507–5511.
71. Zivcec M, Safronetz D, Scott D, Robertson S, Ebihara H, Feldmann H. 2013. Lethal Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infection in interferon alpha/beta receptor knockout mice is associated with high viral loads, proinflammatory responses, and coagulopathy. *J Infect Dis* 207:1909–1921.
72. Bereczky S, Lindegren G, Karlberg H, Akerstrom S, Klingstrom J, Mirazimi A. 2010. Crimean-Congo hemorrhagic fever virus infection is lethal for adult type I interferon receptor-knockout mice. *J Gen Virol* 91:1473–1477.
73. Bente DA, Alimonti JB, Shieh WJ, Camus G, Stroher U, Zaki S, Jones SM. 2010. Pathogenesis and immune response of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus in a STAT-1 knockout mouse model. *J Virol* 84:11089–11100.
74. Schuh T, Schultz J, Moelling K, Pavlovic J. 1999. DNA-based vaccine against La Crosse virus: protective immune response mediated by neutralizing antibodies and CD4T cells. *Hum Gene Ther* 10:1649 –1658.
75. Wernike K, Breithaupt A, Keller M, Hoffmann B, Beer M, Eschbaumer M. 2012. Schmallerberg virus infection of adult type I interferon receptor knock-out mice. *PLoS One* 7:e40380.
76. Liu Y, Wu B, Paessler S, Walker DH, Tesh RB, Yu XJ. 2014. The pathogenesis of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus infection in alpha/beta interferon knockout mice: insights into the pathologic mechanisms of a new viral hemorrhagic fever. *J Virol* 88:1781–1786.
77. Bridgen A, Weber F, Fazakerley JK, Elliott RM. 2001. Bunyamwera bunyavirus nonstructural protein NSs is a nonessential gene product that contributes to viral pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:664–669.

78. Elliott RM, Weber F. 2009. Bunyaviruses and the type I interferon system. *Viruses* 1:1003–1021.
79. Eifan S, Schnettler E, Dietrich I, Kohl A, Blomstrom AL. 2013. Nonstructural proteins of arthropod-borne bunyaviruses: roles and functions. *Viruses* 5:2447–2468.
80. Hedil M, Kormelink R. 2016. Viral RNA silencing suppression: the enigma of bunyavirus NSs proteins. *Viruses* 8:E208.
81. Weber F, Bridgen A, Fazakerley JK, Streitenfeld H, Kessler N, Randall RE, Elliott RM. 2002. Bunyamwera bunyavirus nonstructural protein NSs counteracts the induction of alpha/beta interferon. *J Virol* 76:7949–7955.
82. Le May N, Dubaele S, Proietti De Santis L, Billecocq A, Bouloy M, Egly JM. 2004. TFIIF transcription factor, a target for the Rift Valley hemorrhagic fever virus. *Cell* 116:541–550.
83. Ikegami T, Narayanan K, Won S, Kamitani W, Peters CJ, Makino S. 2009. Rift Valley fever virus NSs protein promotes post-transcriptional downregulation of protein kinase PKR and inhibits eIF2alpha phosphorylation. *PLoS Pathog* 5:e1000287.
84. Gori-Savellini G, Valentini M, Cusi MG. 2013. Toscana virus NSs protein inhibits the induction of type I interferon by interacting with RIG-I. *J Virol* 87:6660–6667.
85. Ning YJ, Feng K, Min YQ, Cao WC, Wang M, Deng F, Hu Z, Wang H. 2015. Disruption of type I interferon signaling by the nonstructural protein of severe fever with thrombocytopenia syndrome virus via the hijacking of STAT2 and STAT1 into inclusion bodies. *J Virol* 89:4227– 4236.
86. Carlton-Smith C, Elliott RM. 2012. Viperin, MTAP44, and protein kinase R contribute to the interferon-induced inhibition of Bunyamwera orthobunyavirus replication. *J Virol* 86:11548 –11557.

87. Pichlmair A, Lassnig C, Eberle CA, Gorna MW, Baumann CL, Burkard TR, Burckstummer T, Stefanovic A, Krieger S, Bennett KL, Rulicke T, Weber F, Colinge J, Muller M, Superti-Furga G. 2011. IFIT1 is an antiviral protein that recognizes 5'-triphosphate RNA. *Nat Immunol* 12:624–630.
88. Frese M, Kochs G, Feldmann H, Hertkorn C, Haller O. 1996. Inhibition of bunyaviruses, phleboviruses, and hantaviruses by human MxA protein. *J Virol* 70:915–923.
89. Varela M, Piras IM, Mullan C, Shi X, Tilston-Lunel NL, Pinto RM, Taggart A, Welch SR, Neil SJD, Kreher F, Elliott RM, Palmarini M. 2017. Sensitivity to BST-2 restriction correlates with orthobunyavirus host range. *Virology* 509:121–130.
90. Mudhasani R, Tran JP, Retterer C, Radoshitzky SR, Kota KP, Altamura LA, Smith JM, Packard BZ, Kuhn JH, Costantino J, Garrison AR, Schmaljohn CS, Huang IC, Farzan M, Bavari S. 2013. IFITM-2 and IFITM-3 but not IFITM-1 restrict Rift Valley fever virus. *J Virol* 87:8451–8464.
91. Taxonomy of the order Bunyvirales: ICTV update 2019. *Archives of Virology*. May 2019. DOI: 10.1007/s00705-019-04253-6
92. Liu Y, Nie H, Mao R, Mitra B, Cai D, Yan R, et al. (2017) Interferon-inducible ribonuclease ISG20 inhibits hepatitis B virus replication through directly binding to the epsilon stem-loop structure of viral RNA. *PLoS Pathog* 13(4): e1006296.
93. Anderson, C. R., Spence, L., Downs, W. G. & Aitken, T. H. (1961). Oropouche virus: a new human disease agent from Trinidad, West Indies. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 10, 574-578.
94. Aquino, V. H. & Figueiredo, L. T. (2004). Linear amplification followed by single primer polymerase chain reaction to amplify unknown DNA fragments: complete nucleotide sequence of Oropouche virus M RNA segment. *Journal of virological methods* 115, 51-57.

95. Aquino, V. H., Moreli, M. L. & Moraes Figueiredo, L. T. (2003). Analysis of oropouche virus L protein amino acid sequence showed the presence of an additional conserved region that could harbour an important role for the polymerase activity. *Archives of virology* 148, 19-28.

96. Azevedo, R. S. d. S., Nunes, M. R. T., Chiang, J. O., Bensabath, G., Vasconcelos, H. B., Pinto, A. Y. d. N., Martins, L. C., Monteiro, H. A. d. O., Rodrigues, S. G. & other authors (2007). Reemergence of Oropouche fever, northern Brazil. *Emerging infectious diseases* 13, 912-915.

97. Baisley, K. J., Watts, D. M., Munstermann, L. E. & Wilson, M. L. (1998). Epidemiology of endemic Oropouche virus transmission in upper Amazonian Peru. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 59, 710-716.

98. Bastos Mde, S., Figueiredo, L. T., Naveca, F. G., Monte, R. L., Lessa, N., Pinto de Figueiredo, R. M., Gimaque, J. B., Pivoto Joao, G., Ramasawmy, R. & other authors (2012). Identification of Oropouche Orthobunyavirus in the cerebrospinal fluid of three patients in the Amazonas, Brazil. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 86, 732-735.

99. Bernardes-Terzian, A. C., de-Moraes-Bronzoni, R. V., Drumond, B. P., Da Silva-Nunes, M., da-Silva, N. S., Urbano-Ferreira, M., Speranca, M. A. & Nogueira, M. L. (2009). Sporadic oropouche virus infection, acre, Brazil. *Emerging infectious diseases* 15, 348-350.

100. Dixon, K. E., Travassos da Rosa, A. P., Travassos da Rosa, J. F. & Llewellyn, C. H. (1981). Oropouche virus. II. Epidemiological observations during an epidemic in Santarem, Para, Brazil in 1975. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 30, 161-164.

101. Elliott, R. M. (2014). Orthobunyaviruses: recent genetic and structural insights. *Nature reviews Microbiology* 12, 673-685.

102. Elliott, R. M. & Schmaljohn, C. S. (2013). Chapter 42, Bunyaviridae In *Fields Virology*, 6th edn, vol. 2. Edited by D. M. Knipe & P. Howley.
103. Epidemiological Alert (2010). Outbreak of Oropouche Fever, Current Situation. Pan American Health Organization.
104. Epidemiological Bulletin (1982). Oropouche Fever in Brazil. In Pan American Health Organization. 3 (5).
105. Forshey, B. M., Guevara, C., Laguna-Torres, V. A., Cespedes, M., Vargas, J., Gianella, A., Vallejo, E., Madrid, C., Aguayo, N. & other authors (2010). Arboviral Etiologies of Acute Febrile Illnesses in Western South America, 2000–2007. *PLoS neglected tropical diseases* 4, e787.
106. Guu, T. Y., Zheng, W. & Tao, Y. (2012). Bunyavirus: Structure and Replication. In *Viral Molecular Machines (Advances in Experimental Medicine and Biology)*, vol. 726, pp. 245-266. Edited by M. G. Rossmann & V. B. Rao: Springer US.
107. Ladner, J. T., Savji, N., Lofts, L., Travassos da Rosa, A., Wiley, M. R., Gestole, M. C., Rosen, G. E., Guzman, H., Vasconcelos, P. F. & other authors (2014). Genomic and phylogenetic characterization of viruses included in the Manzanilla and Oropouche species complexes of the genus *Orthobunyavirus*, family *Bunyaviridae*. *The Journal of general virology* 95, 1055-1066.
108. Mercer, D. R. & Castillo-Pizango, M. J. (2005). Changes in relative species compositions of biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) and an outbreak of Oropouche virus in Iquitos, Peru. *Journal of medical entomology* 42, 554-558.
109. Mourao, M. P., Bastos, M. S., Gimaqu, J. B., Mota, B. R., Souza, G. S., Grimmer, G. H., Galusso, E. S., Arruda, E. & Figueiredo, L. T. (2009). Oropouche fever outbreak, Manaus, Brazil, 2007-2008. *Emerging infectious diseases* 15, 2063-2064.

110. Nunes, M. R., Martins, L. C., Rodrigues, S. G., Chiang, J. O., Azevedo Rdo, S., da Rosa, A. P. & Vasconcelos, P. F. (2005). Oropouche virus isolation, southeast Brazil. *Emerging infectious diseases* 11, 1610-1613.
111. Pinheiro F P, T. d. R. A. P. A., Vasconcelos P F C (2004). Bunyaviridae: Other Bunyaviridae - Oropouche Fever In *Text book of Pediatric Infectious Diseases*, Fifth edn, vol. 2, pp. 2418–2423. Edited by R. D. Feigin. Philadelphia: Saunders: Elsevier Health Sciences.
112. Pinheiro, F. P., Travassos da Rosa, A. P. A. & Vasconcelos, P. F. (1998). An overview of Oropouche fever epidemics in Brazil and neighbouring countries. In *An overview of arbovirology in Brazil and neighbouring countries* Belem, Brazil, pp. 186-192. Edited by V. P. F. C. Travassos da Rosa A P A, Travassos da Rosa J F S. The Evandro Chagas Institute.
113. Pinheiro, F. P., Travassos da Rosa, A. P., Travassos da Rosa, J. F. & Bensabath, G. (1976). An outbreak of Oropouche virus disease in the vicinity of Santarem, Para, Brazil. *Tropenmedizin und Parasitologie* 27, 213-223.
114. Pinheiro, F. P., Hoch, A. L., Gomes, M. L. & Roberts, D. R. (1981a). Oropouche virus. IV. Laboratory transmission by *Culicoides paraensis*. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 30, 172-176.
115. Pinheiro, F. P., Travassos da Rosa, A. P., Gomes, M. L., LeDuc, J. W. & Hoch, A. L. (1982a). Transmission of Oropouche virus from man to hamster by the midge *Culicoides paraensis*. *Science (New York, NY)* 215, 1251-1253.
116. Pinheiro, F. P., Rocha, A. G., Freitas, R. B., Ohana, B. A., Travassos da Rosa, A. P., Rogerio, J. S. & Linhares, A. C. (1982b). [Meningitis associated with Oropouche virus infections]. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 24, 246-251.
117. Pinheiro, F. P., Travassos da Rosa, A. P., Travassos da Rosa, J. F., Ishak, R., Freitas, R. B., Gomes, M. L., LeDuc, J. W. & Oliva, O. F. (1981b). Oropouche virus. I.

A review of clinical, epidemiological, and ecological findings. The American journal of tropical medicine and hygiene 30, 149-160.

118. Pinheiro, F. P., M.; Bensabath, G.; Causey, O. R.; Shope, R E (1962). Epidemia de vírus Oropouche em Belém. Revista do Serviço Especial de Saúde 12, 15 - 23.

119. Proenca-Modena, J. L., Sesti-Costa, R., Pinto, A. K., Richner, J. M., Lazear, H. M., Lucas, T., Hyde, J. L. & Diamond, M. S. (2015). Oropouche virus infection and pathogenesis are restricted by MAVS, IRF-3, IRF-7, and type I interferon signaling pathways in nonmyeloid cells. Journal of virology 89, 4720-4737.

120. Roberts, D. R., Hoch, A. L., Dixon, K. E. & Llewellyn, C. H. (1981). Oropouche virus. III. Entomological observations from three epidemics in Para, Brazil, 1975. The American journal of tropical medicine and hygiene 30, 165-171.

121. Roberts, D. R., Pinheiro, F. d. P., Hoch, A. L., LeDuc, J. W., Peterson, N. E., Santos, M. A. V. & Western, K. A. (1977). Vectors and Natural Reservoirs of Oropouche virus in the Amazon Region: U. S. Army Medical Research and Development Comand Washington , D.C. 20314.

122. Rodrigues, A. H., Santos, R. I., Arisi, G. M., Bernardes, E. S., Silva, M. L., Rossi, M. A., Lopes, M. B. & Arruda, E. (2011). Oropouche virus experimental infection in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). Virus research 155, 35-41.

123. Rosa, A. P., Rodrigues, S. G., Nunes, M. R., Magalhaes, M. T., Rosa, J. F. & Vasconcelos, P. F. (1996). [Outbreak of oropouche virus fever in Serra Pelada, municipality of Curionopolis, Para, 1994]. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 29, 537-541.

124. Saeed, M. F., Wang, H., Nunes, M., Vasconcelos, P. F., Weaver, S. C., Shope, R. E., Watts, D. M., Tesh, R. B. & Barrett, A. D. (2000). Nucleotide sequences and phylogeny of the nucleocapsid gene of Oropouche virus. The Journal of general virology 81, 743-748.

125. Santos, R. I., Almeida, M. F., Paula, F. E., Rodrigues, A. H., Saranzo, A. M., Paula, A. E., Silva, M. L., Correa, V. M., Acrani, G. O. & other authors (2012). Experimental infection of suckling mice by subcutaneous inoculation with Oropouche virus. *Virus research* 170, 25-33.
126. Santos, R. I. M., Rodrigues, A. H., Silva, M. L., Mortara, R. A., Rossi, M. A., Jamur, M. C., Oliver, C. & Arruda, E. (2008). Oropouche virus entry into HeLa cells involves clathrin and requires endosomal acidification. *Virus research* 138, 139-143.
127. Smith, G. C. & Francly, D. B. (1991). Laboratory studies of a Brazilian strain of *Aedes albopictus* as a potential vector of Mayaro and Oropouche viruses. *Journal of the American Mosquito Control Association* 7, 89-93.
128. Tesh, R. B. (1994). The emerging epidemiology of Venezuelan hemorrhagic fever and Oropouche fever in tropical South America. *Annals of the New York Academy of Sciences* 740, 129-137.
129. Vasconcelos, H. B., Nunes, M. R., Casseb, L. M., Carvalho, V. L., Pinto da Silva, E. V., Silva, M., Casseb, S. M. & Vasconcelos, P. F. (2011). Molecular epidemiology of Oropouche virus, Brazil. *Emerging infectious diseases* 17, 800-806.
130. Vasconcelos, H. B., Azevedo, R. S. S., Casseb, S. M., Nunes-Neto, J. P., Chiang, J. O., Cantuária, P. C., Segura, M. N. O., Martins, L. C., Monteiro, H. A. O. & other authors (2009). Oropouche fever epidemic in Northern Brazil: epidemiology and molecular characterization of isolates. *Journal of clinical virology* 44, 129-133.
131. Vasconcelos, P. F., Travassos Da Rosa, J. F., Guerreiro, S. C., Degallier, N., Travassos Da Rosa, E. S. & Travassos Da Rosa, A. P. (1989). [1st register of an epidemic caused by Oropouche virus in the states of Maranhao and Goias, Brazil]. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 31, 271-278.
132. Vasconcelos, P. F., Travassos da Rosa, A. P., Rodrigues, S. G., Travassos da Rosa, E. S., Degallier, N. & Travassos da Rosa, J. F. (2001). Inadequate management

of natural ecosystem in the Brazilian Amazon region results in the emergence and reemergence of arboviruses. *Cadernos de saude publica* 17 Suppl, 155-164.

133. Walter, C. T., Costa Bento, D. F., Guerrero Alonso, A. & Barr, J. N. (2011). Amino acid changes within the Bunyamwera virus nucleocapsid protein differentially affect the mRNA transcription and RNA replication activities of assembled ribonucleoprotein templates. *Journal of General Virology* 92, 80-84.

134. Wang, H., Beasley, D. W., Li, L., Holbrook, M. R. & Barrett, A. D. (2001). Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the medium RNA segment of Oropouche, a Simbu serogroup virus: comparison with the middle RNA of Bunyamwera and California serogroup viruses. *Virus research* 73, 153-162.

135. Watts, D. M., Phillips, I., Callahan, J. D., Griebenow, W., Hyams, K. C. & Hayes, C. G. (1997). Oropouche virus transmission in the Amazon River basin of Peru. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 56, 148-152.

136. Nichol, S.T., 2001. Bunyaviruses, In: Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds.), *Fields Virology*, 4th ed. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, pp. 1603–1633.

137. SCHMALJOHN, CS; NICHOL, ST. Bunyaviridae. In: Knipe DM et al (Eds), *Fields Virology* (5th Ed), Lippincott-Williams and Wilkins, Philadelphia, 2006. Vol 2. pp. 1741-1789.

138. Elliott, R. M. (1990). Molecular biology of the Bunyaviridae. *J Gen Virol* 71, 501–522.

139. Saeed M.F., Nunes M., Vasconcelos P.F., Travassos Da Rosa A.P., Watts D.M., Russell K., Shope R.E., Tesh R.B., Barrett A.D.T. Diagnosis of Oropouche virus infection using a recombinant nucleocapsid protein-based enzyme immunoassay. *J. Clin. Microbiol.* 2001;39:2445–2452. doi: 10.1128/JCM.39.7.2445-2452.2001.

140. De Souza Luna L.K., Rodrigues A.H., Santos R.I., Sesti-Costa R., Criado M.F., Martins R.B., Silva M.L., Delcaro L.S., Proenca-Modena J.L., Figueiredo L.T.M., et al.

Oropouche virus is detected in peripheral blood leukocytes from patients. *J. Med. Virol.* 2017;89:1108–1111. doi: 10.1002/jmv.24722.

141. Moreli M.L., Aquino V.H., Cruz A.C., Figueiredo L.T. Diagnosis of Oropouche virus infection by RT-nested-PCR. *J. Med. Virol.* 2002;66:139–142. doi: 10.1002/jmv.2122.

142. Weidmann M., Rudaz V., Nunes M.R., Vasconcelos P.F., Hufert F.T. Rapid detection of human pathogenic orthobunyaviruses. *J. Clin. Microbiol.* 2003;41:3299–3305. doi: 10.1128/JCM.41.7.3299-3305.2003.

143. Naveca F.G., Nascimento V.A.D., Souza V.C., Nunes B.T.D., Rodrigues D.S.G., Vasconcelos P.F.C. Multiplexed reverse transcription real-time polymerase chain reaction for simultaneous detection of Mayaro, Oropouche, and Oropouche-like viruses. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2017;112:510–513. doi: 10.1590/0074-02760160062.

144. P. Hubel, C. Urban, V. Bergant, W.M. Schneider, B. Knauer, A. Stukalov, P. Scaturro, A. Mann, L. Brunotte, H.H. Hoffmann, et al. A protein-interaction network of interferon-stimulated genes extends the innate immune system landscape. *Nat Immunol*, 20 (2019), pp. 493-502

145. Flint, S.J. et al. *Virological Methods, Principles of Virology*. ASM Press. ISBN 1-55581-443-3, 2009.

146. HANAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of molecular biology*. v.166, n.4, p.557-580, 1983.

147. Bajgelman, MC. et al. Exploration of critical parameters for transient retrovirus production. *J. Biotechnol.* 103, 97-106, 2003.

148. Strauss, BE. et al. A lentiviral vector with expression controlled by E2F-1: A potential tool for the study and treatment of proliferative diseases. *Biochem Biophys Res Commun.* 348, 1411-1418, 2006.

149. Mboko WP, Mounce BC, Emmer J, Darrah E, Patel SB, Tarakanova VL. Interferon regulatory factor 1 restricts gammaherpesvirus replication in primary immune cells. *J Virol.* (2014) 88:6993–7004.
150. Nair S, Poddar S, Shimak RM, Diamond MS. Interferon regulatory factor-1 (IRF-1) protects against chikungunya virus induced immunopathology by restricting infection in muscle cells. *J Virol.* (2017) 91 e01419–17.
151. Reis LF, Ruffner H, Stark G, Aguet M, Weissmann C. Mice devoid of interferon regulatory factor 1 (IRF-1) show normal expression of type I interferon genes. *EMBO J.* (1994) 13:4798–806.
152. Kimura T, Nakayama K, Penninger J, Kitagawa M, Harada H, Matsuyama T, et al. . Involvement of the IRF-1 transcription factor in antiviral responses to interferons. *Science.* (1994) 264:1921–4.
153. Maloney NS, Thackray LB, Goel G, Hwang S, Duan E, Vachharajani P, et al. . Essential cell-autonomous role for interferon (IFN) regulatory factor 1 in IFN-gamma-mediated inhibition of norovirus replication in macrophages. *J Virol.* (2012) 86:12655–64.
154. Barde, M. "What to use to express the variability of data: Standard deviation or standard error of mean?". *Perspect. Clin. Res.* (2012) 3 (3): 113–116.
155. Bailey, R. A. *Design of Comparative Experiments.* Cambridge University Press. (2008). ISBN 978-0-521-68357-9.
156. Daniel, Wayne W. "Kruskal–Wallis one-way analysis of variance by ranks". *Applied Nonparametric Statistics* (2nd ed.). Boston: PWS-Kent. (1990) pp. 226–234.
157. Yu, J. H., & Schaffer, D. V. (2006). Selection of novel vesicular stomatitis virus glycoprotein variants from a peptide insertion library for enhanced purification of retroviral and lentiviral vectors. *Journal of Virology*, 80, 3285–3292.

158. Varela M, Piras IM, Mullan C, Shi X, Tilston-Lunel NL, Pinto RM, Taggart A, Welch SR, Neil SJD, Kreher F, Elliott RM, Palmarini M. 2017. Sensitivity to BST-2 restriction correlates with orthobunyavirus host range. *Virology* 509:121–130.
159. Schoggins, J. W. et al. Pan-viral specificity of IFN-induced genes reveals new roles for cGAS in innate immunity. *Nature* 505, 691–695 (2014).
160. Schoggins, J. W. et al. Dengue reporter viruses reveal viral dynamics in interferon receptor-deficient mice and sensitivity to interferon effectors in vitro. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 109, 14610–14615 (2012).
161. Hackett, B. A. & Cherry, S. Flavivirus internalization is regulated by a sizedependent endocytic pathway. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 115, 4246–4251 (2018).
162. Weiss CM, Trobaugh DW, Sun C, Lucas TM, Diamond MS, Ryman KD, Klimstra WB. 2018. The interferon-induced exonuclease ISG20 exerts antiviral activity through upregulation of type I interferon response proteins. *mSphere* 3:e00209-18.
163. Zhao X, Li J, Winkler CA, An P and Guo J-T (2019) IFITM Genes, Variants, and Their Roles in the Control and Pathogenesis of Viral Infections. *Front. Microbiol.* 9:3228.
164. Poddar S, Hyde JL, Gorman MJ, Farzan M, Diamond MS. The interferon-induced gene IFITM3 restricts Infection and pathogenesis of arthritogenic and encephalitic alphaviruses. *J Virol.* 2016 Sep 12;90(19):8780-94.
165. Gorman MJ, Poddar S, Farzan M, Diamond MS. The interferon-stimulated gene IFITM3 Restricts West Nile Virus infection and pathogenesis. *J Virol.* 2016 Aug 26;90(18):8212-25.
166. Mears HV, Sweeney TR: Better together: the role of IFIT protein-protein interactions in the antiviral response. *J Gen Virol.* 2018; 99(11): 1463–1477.

167. Fleith RC, Mears HV, Leong XY, et al.: IFIT3 and IFIT2/3 promote IFIT1-mediated translation inhibition by enhancing binding to non-self RNA. *Nucleic Acids Res.* 2018; 46(10): 5269–5285.
168. Kuhl BD, et al. 2010. Tetherin restricts direct cell-to-cell infection of HIV-1. *Retrovirology* 7:115.
169. Kuhl BD, Cheng V, Wainberg MA, Liang C. 2011. Tetherin and its viral antagonists. *J. Neuroimmune Pharmacol.* 6:188 –201.
170. Mar KB, Rinkenberger NR, Boys IN, Eitson JL, McDougal MB, Richardson RB, et al. LY6E mediates an evolutionarily conserved enhancement of virus infection by targeting a late entry step. *Nat Commun.* (2018) 9:3603.
171. Nunes MRT, de Souza WM, Savji N, Figueiredo ML, Cardoso JF, da Silva SP, et al. Oropouche orthobunyavirus: Genetic characterization of full-length genomes and development of molecular methods to discriminate natural reassortments. *Infect Genet Evol.* 2018 Nov 29;68:16–22.
172. Acrani, G. O., Gomes, R., Proenca-Modena, J. L., da Silva, A. F., Carminati, P. O., Silva, M. L., Santos, R. I. & Arruda, E. (2010). Apoptosis induced by Oropouche virus infection in HeLa cells is dependent on virus protein expression. *Virus research* 149, 56-63.
173. Fong, S. W., Kini, R. M. & Ng, L. F. P. Mosquito saliva reshapes alphavirus infection and immunopathogenesis. *J. Virol.* 92, e01004-17 (2018).
174. Briant L, Desprès P, Choumet V, Missé D. 2014. Role of skin immune cells on the host susceptibility to mosquito-borne viruses. *Virology* 464 – 465:26 –32.
175. van Knippenberg I, Elliott RM. 2015. Flexibility of bunyavirus genomes: creation of an orthobunyavirus with an ambisense S segment. *J Virol* 89:5525–5535.

176. Shan XC, Bourdeau A, Rhoton A et al. Characterization and mapping to human chromosome 8q24.3 of Ly-6-related gene 9804 encoding an apparent homologue of mouse TSA-1. *J Immunol* 1998; 160: 197–208.
177. Capone, M. C., Gorman, D. M., Ching, E. P. & Zlotnik, A. (1996) *J. Immunol.* 157, 969–973.
178. Mao M, Yu M, Tong JH, Ye J, Zhu J, Huang QH, Fu G, Yu L, Zhao SY, Waxman S, Lanotte M, Wang ZY, Tan JZ, Chan SJ, Chen Z. RIG-E, a human homolog of the murine Ly-6 family, is induced by retinoic acid during the differentiation of acute promyelocytic leukemia cell. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:5910.
179. Ding, L., Shevach, E. M. (2001) Inhibition of the function of the FcγRIIB by a monoclonal antibody to thymic shared antigen-1, a Ly-6 family antigen. *Immunology* 104, 28– 36.
180. . Lee, P. Y., J. X. Wang, E. Parisini, C. C. Dascher, and P. A. Nigrovic. 2013. Ly6 family proteins in neutrophil biology. *J. Leukoc. Biol.* 94: 585–594.
181. Luo L, McGarvey P, Madhavan S, Kumar R, Gusev Y, Upadhyay G. Distinct lymphocyte antigens 6 (Ly6) family members Ly6D, Ly6E, Ly6K and Ly6H drive tumorigenesis and clinical outcome. *Oncotarget.* 2016;7(10):11165–93.
182. Upadhyay G (2019) Emerging Role of Lymphocyte Antigen-6 Family of Genes in Cancer and Immune Cells. *Front. Immunol.* 10:819.
183. Dumont F. J., Altmeyer A., Staruch M. J., Dijkmans R., Palfree R. G. and Fischer P. A. (1990): Role of protein kinase C in IFN-mediated Ly-6E antigen induction. *J. Immunol.*, 144, 3795–3803.
184. Westra, E. R., Buckling, A. & Fineran, P. C. CRISPR–Cas systems: beyond adaptive immunity. *Nat. Rev. Microbiol.* 12, 317–326 (2014).

185. Heidari R, Shaw DM, Elger BS. CRISPR and the rebirth of synthetic biology. *Sci Eng Ethics*. 2016.
186. Li J, Ding SC, Cho H, Chung BC, Gale M Jr, et al. 2013. A short hairpin RNA screen of interferon-stimulated genes identifies a novel negative regulator of the cellular antiviral response. *MBio* 4:e00385–13.
187. McLellan, M. A., Rosenthal, N. A. & Pinto, A. R. Cre-loxP-mediated recombination: general principles and experimental considerations. *Curr. Protoc. Mouse Biol.* 7, 1–12 (2017).
188. Ozcan KA, Berndsen CE. 2017. Bending of the BST-2 coiled-coil during viral budding. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 85(11):1-7.
189. Krishnan, M. N., A. Ng, B. Sukumaran, F. D. Gilfoy, P. D. Uchil, H. Sultana, A. L. Brass, R. Adametz, M. Tsui, F. Qian, et al. 2008. RNA interference screen for human genes associated with West Nile virus infection. *Nature* 455: 242–245.

ANEXOS

Anexo 1 - Cópia do Parecer de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa com Organismos Geneticamente Modificados (OGMs).

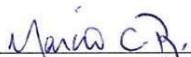


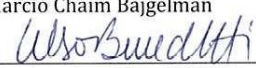
Campinas, 14/03/2017

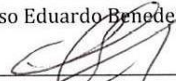
Ata da 50ª reunião da CIBIO

A CIBIO do CNPEM analisou os projetos submetidos, considerando-se aspectos de biossegurança e classificação do nível de biossegurança NB-I e NB-II. Os projetos 2017-05,06,07,08 e 12 utilizam OGMs risco I e foram aprovados. Os projetos 2017-04,09 e 10 utilizam OGMs classe de risco II, previsto na plataforma previamente aprovada pela CTNBio 3599-2013 e foi aprovado. O projeto 2017-11, NB2, envolve experimentação com iPS humana e modificação com lentivírus e será encaminhado para aprovação da CTNBio. Também emitimos parecer favorável ao pedido de extensão de CQB para nova área NB1 destinada à experimentação com peixes transgênicos, que será encaminhado à CTNBio.

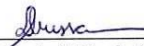
Assinam todos os integrantes da CIBio, exceto Marina Câmara em licença e Sindélia Azoni, desligada do CNPEM e em processo de notificação de desligamento para CTNBio.

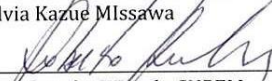

 Presidente da CIBio – CNPEM
 Marcio Chaim Bajgelman


 Membro da CIBio – CNPEM
 Celso Eduardo Benedetti


 Membro da CIBio – CNPEM
 Carolina Borsoi Moraes H. Freitas


 Membro da CIBio da CNPEM
 Marina Camara M. Martins Soldi


 Membro da CIBio da CNPEM
 Silvia Kazuo Mitsuoka


 Membro da CIBio da CNPEM
 Roberto Ruller

Anexo 2 - Declaração de que a dissertação ou tese não infringe os dispositivos da lei nº 9610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Declaração

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação/Tese de Mestrado/Doutorado, intitulada **Ação reguladora de genes estimulados por Interferon (ISGs) na infecção pelo vírus Oropouche (OROV)**, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 10 de Agosto de 2019

Assinatura :

Nome do(a) autor(a): **Michael Edward Miller**

RG n.º 9.652.086-7

Assinatura :

Nome do(a) orientador(a): **Clarice Weis Arns**

RG n.º 5003366001