UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR E DE BIOAGENTES
PATOGÊNICOS

**Análise funcional da proteína não estrutural do segmento M (NSm) do
orthobunyavirus Oropouche**

Marjorie Cornejo Pontelli

Ribeirão Preto, 2018

MARJORIE CORNEJO PONTELLI

**Análise funcional da proteína não estrutural do segmento M (NSm) do
orthobunyavirus Oropouche**

Tese de Doutorado

apresentada ao Departamento de Biologia Celular,

Molecular e Bioagentes Patogênicos da

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Universidade de São Paulo.

Grau pretendido: Doutor

Orientador: Prof. Dr. Eurico Arruda Neto

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

PONTELLI, MARJORIE CORNEJO.

Análise funcional da proteína não estrutural do segmento M (NSm) do orthobunyavirus Oropouche.

Ribeirão Preto, 2018.

104 pg.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Arruda, Eurico de.

1. Oropouche virus; 2. NSm; 3. Fábricas virais; 4. Neutrófilos; 5. Patogênese.

Folha de aprovação da banca examinadora

PONTELLI, M. C. **Análise funcional da proteína não estrutural do segmento M (NSm) do orthobunyavirus Oropouche.** Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do título de doutora em Biologia Celular e Molecular.

Aprovada em:

Banca examinadora:

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

APOIO E SUPORTE FINANCEIRO

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro das seguintes entidades e instituições:

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP através dos projetos Temático 2014/02438-6 e Regular de Doutorado 2015/05354-0.

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP).

Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FAEPA-HC-FMRP-USP).

Dedico este trabalho as incríveis mulheres da minha vida

Ana Ruth, Stefanie e Geordana.

Em memória de meu pai Prof. Elias Pontelli.

Bom tudo isso são sonhos, mas com o esforço e luta, poderei fazer deles uma realidade.

Quanto à minha participação em política Estudantil sempre gostei e acho que todo o estudante consciente deve tomar parte, porque só as disciplinas com seus respectivos conteúdos não formam uma pessoa, integralmente.

Elias Pontelli

AGRADECIMENTOS

Começo meus agradecimentos convidando a refletir sobre o tempo. Sobre o conceito de tempo. Sempre admirei o tempo e o quanto a nossa percepção dele muda ao longo da nossa vida. Para uns, o tempo lhe é tomado sem consentimento. Para outros, o tempo é infinito. O tempo é, ao mesmo tempo, companheiro e inimigo. O tempo é absoluto, vai passar, quer queira, quer não. Independente de qualquer esforço em contê-lo, ele vai passar. Temos apenas que escolher o que fazer com o tempo que nos é dado.

Ao optar por investir meu tempo na vida acadêmica e fazer doutorado, senti-me no caminho correto. Sonho esse que foi aspirado pelo meu pai, Prof. Elias Pontelli, homem que considero um visionário para seu tempo. As mulheres mais fortes, bem-sucedidas e inspiradoras que tive e tenho o prazer de conviver, minha mãe Ana Ruth e irmãs Stefanie e Geordana, que apesar da minha ausência precoce continuaram me incentivando de forma inexorável. Não tenho palavras para descrever o quanto o apoio de vocês foi imprescindível.

Ao Prof. Eurico de Arruda Neto, por acreditar em meu potencial e permitir o desenvolvimento deste trabalho em seu laboratório. Pelo investimento de seu tempo, tutoria, oportunidade e principalmente por ter me ensinado a gostar tanto dos vírus, sou muito grata.

Um agradecimento especial à funcionária Maria Lucia da Silva (Pitty), tanto pelo seu apoio nos experimentos deste trabalho, principalmente no que se refere à cultura de células e titulação de vírus quanto pelo carinho e cuidado que ela sempre demonstrou por nós e pelo nosso laboratório. Muito obrigada.

Aos colegas e amigos do dia-a-dia do laboratório de Patogênese Viral e do Centro de Pesquisa em Virologia. Bruna, Juliano, Ricardo, Ronaldo, Daniel, Suellen, Rosa, Lucas Tavares e Natália Barbosa pela amizade e carinho, assim como pela ajuda na realização de muitos experimentos e na discussão dos dados obtidos, e, principalmente pelos momentos de descontração que tornaram esses quatro anos de doutorado um período de aprendizado e crescimento que será lembrado pelo resto da vida. Muito obrigada.

Em especial gostaria de agradecer meu namorado Ítalo Castro pelo companheirismo, amor e principalmente pelo incentivo diário. Muito obrigada.

Aos amigos do Departamento de Biologia Celular e Molecular, Lucas Lorenzon, Natália Melquie, Juliana Diniz, Rafael Ricci-Azevedo, Gabriel Lamak. Obrigada pela amizade e companheirismo.

As amigas do time Interpós, time de futsal que mantemos desde 2013. Em especial, Sabrina, Pâmela (Fogs), Laura (Pamonha), Ju Bezerra, Aninha, Carol (Jams), Camila (Sandy), Ana Carolina (Lux), muito obrigada por todos os momentos de companheirismo dentro e fora das quadras. Fogs, muito obrigada pela sua amizade acima de tudo. Vocês são demais e levarei vocês comigo para sempre.

Aos amigos que fiz fora da pós-graduação, Rafael Reis com o qual tive o prazer de dividir minha casa, colegas Kilombo CrossFit em especial Natália Costa. Muito obrigada.

Às amigas de infância Laura Huber, Raquel Vargas, Letícia Prado, Pâmela Biernaski e Eduarda Ostrowski. Tenho um lugar especial em meu coração que vocês estão pra sempre guardadas. Obrigada pela amizade ao longo da vida.

Um agradecimento especial aos colegas da Associação dos Pós-Graduandos da USP – RP. Marcella, Marcílio, Pâmella, Stéphânia, Flávio, Bruno, Rodrigo, Frank, Raí, obrigada por compartilharem comigo o desejo de lutar pela nossa classe e me ensinar tanto sobre a representação discente. Foi muito produtivo e gratificante estar com vocês.

A todos que caminharam comigo nesta jornada de aprendizado, trabalho e auto-realização, pela paciência e carinho.

Meu mais sincero muito obrigada!

RESUMO

O vírus Oropouche (OROV) pertence à ordem Bunyavirales, família Peribunyaviridae, gênero Orthobunyavirus, e está entre as mais frequentes causas de arbovirose no Brasil. OROV é endêmico da região Amazônica, onde já causou mais de meio milhão de casos em surtos publicados, no entanto recentemente tem ganhado atenção devido à ocorrência de infecções em seres humanos e primatas não humanos fora daquela região. OROV é transmitido pela picada do vetor *Culicoides paraensis* e causa doença febril aguda. OROV tem genoma composto por três segmentos de RNA (L, M e S) que codificam as proteínas estruturais, bem como duas não estruturais: NSm e NSs. A proteína NSs é um fator de virulência reconhecido em alguns vírus do gênero Orthobunyavirus, mas quase nada se sabe sobre funções da proteína NSm. Evidências obtidas com outros vírus da família mostram que NSm tem papel em processos de montagem e morfogênese de partículas virais. Todavia, não existem conhecimentos sobre funções da NSm de OROV. A partir do desenvolvimento deste trabalho foi possível conhecer que a proteína NSm de OROV não é essencial à produção de progênie viral, mas está envolvida com a montagem do vírus pela via canônica no complexo de Golgi. A ausência de NSm modifica o recrutamento de organelas envolvidas em fábricas virais, com diminuição da área dessas fábricas, atrasando a produção de progênie infecciosa durante a fase exponencial de replicação. Outra importante descoberta é que NSm está envolvida na atenuação da virulência de OROV *in vivo*, já que na sua ausência OROV é altamente letal em modelo murino. O contrário foi observado para o vírus deletado da proteína NSs, que é menos letal que o OROVwt. Mais ainda, OROV deletado simultaneamente de NSm e NSs é quase completamente atenuado. OROV sem NSs e NSm infectam células do sangue periférico humano das linhagens mielóide, de modo similar ao OROVwt, mas com produção alterada da citocina TNF- α sugerindo que essas proteínas não estruturais estão envolvidas na patogenicidade de OROV. A expressão heteróloga de NSm demonstra que NSm sozinha tem distribuição diferente da NSm do vírus nativo, indicando que a expressão de elementos da poli-proteína M viral é essencial para o seu direcionamento final. Em conjunto, essas observações mostram que NSm de OROV está envolvida com a montagem de fábricas virais e com a morfogênese viral, e tanto NSm quanto NSs estão relacionadas com a patogenicidade do vírus em modelo murino. O mutante de OROV com deleção de ambas as proteínas é significativamente atenuado, e pode ser uma importante ferramenta para o desenvolvimento de vacina. Esses dados inéditos contribuem para o conhecimento de OROV e podem auxiliar na descoberta de possíveis alvos terapêuticos.

ABSTRACT

Oropouche virus is classified in Bunyavirales order, family Peribunyaviridae, genus Orthobunyavirus and it's one of the most frequent causes of arboviruses in Brazil. OROV is endemic in the Amazon region, where it infected half million cases in documented outbreaks. However, it's recently gaining more attention due to an occurrence in humans and primates outside this region. OROV is transmitted by the bite of *Culicoides paraensis* vector and causes a febrile disease. Its genome is composed of three negative RNA strands (L, M and S) that codes the structural and non-structural viral proteins: NSm and NSs. NSs is a known virulence factor in the Orthobunyavirus genus, but nearly nothing is known about NSm function. Evidence obtained with other orthobunyaviruses showed that NSm is involved with viral particle assembly and morphogenesis. But there are not information's about OROVs NSm function. With the development of this work it was possible to discover that NSm protein it is not essential for progeny production, but it is involved with the canonical assembly pathway in Golgi complex. The absence of NSm modifies organelles recruitment to viral factories, diminishing viral factories area, affecting progeny production in the exponential growth phase in the replication curve. Another important discovery is that NSm is a virulence attenuator factor since the OROV NSm mutant is highly pathogenic in a mouse model. The opposite was observed in OROV NSs mutant, being less lethal compared to OROV wild type. Moreover, OROV mutant lacking both non-structural proteins infect human peripheral blood cells from myelocytic lineage, in similar ways of OROV wild-type, but with altered TNF- α cytokine production, suggesting that these proteins are involved with OROV pathogenicity. Heterologous NSm expression demonstrated that its coding region by itself it is not functional, indicating that is necessary to express elements from the M polyprotein to the correct destination. Taking together, these observations show that OROVs NSm is involved with viral factories assembly and viral morphogenesis, and both NSm and NSs are related to pathogenicity in a mouse model. OROV mutant lacking both non-structural proteins its highly attenuated in vivo, and it can be an essential tool to develop a vaccine to this virus. These new data contribute to the discovery of possible therapeutic targets in treating this virus.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Primers utilizados neste trabalho..... 36

Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados na síntese e clonagem de NSm..... **Erro!**

Indicador não definido.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclos de transmissão do vírus Oropouche.	21
Figura 2. Estrutura e organização genômica dos Orthobunyavirus.....	23
Figura 3. Ciclo replicativo dos orthobunyavirus.	26
Figura 4. Esquema da construção dos plasmídeos mutantes para proteínas não estruturais.	34
Figura 5. Desenho experimental do resgate dos vírus mutantes.....	35
Figura 6. Resgate dos vírus mutantes para as proteínas não estruturais.	46
Figura 7. Predição biofísica da poliproteína do segmento M de OROV.	49
Figura 8. Cinética de replicação de OROVwt, rOROV e OROV-ΔNSm.	50
Figura 9. Visualização da distribuição da proteína N dos vírus rOROV e rOROV-ΔNSm ao longo do tempo do ciclo replicativo.	53
Figura 10. Localização de NSm se correlaciona com grandes agregados de proteínas virais.	55
Figura 11. Microscopia eletrônica de células HeLa infectadas com rOROV ou OROV-ΔNSm.....	56
Figura 12. Mutante de OROV sem NSm interrompe o recrutamento do retículo endoplasmático para região perinuclear.....	59
Figura 13. Colocalização de proteínas virais com cisternas do cis Golgi e Golgi medial.....	60
Figura 14. Ausência de NSm causa retenção de proteínas virais na rede trans-Golgi.	61
Figura 15. Ausência de NSm atrofia a formação de grandes fábricas virais.....	62
Figura 16. Transfecção de células HeLa com plasmídeos peGFP expressando NSm.	65
Figura 17. Infecção experimental de animais com vírus Oropouche recombinantes.	69
Figura 18. Detecção do segmento S em diferentes tecidos de animais infectados.....	71
Figura 19. Detecção de antígenos virais em cortes de cérebros de camundongos.....	73

Figura 20. OROV wild type e OROV- Δ NSm infectam neutrófilos in vitro.	78
Figura 21. Desgranulação de neutrófilos infectados por rOROV ou OROV- Δ NSm.	80
Figura 22. Perfil de resposta de neutrófilos ao vírus Oropouche é modificado na ausência de NSm.	82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg - micrograma	kDa - kilodalton	RER – retículo endoplasmático rugoso
µm - micrômetro	kg - kilograma	RNA – ácido ribonucleico
AB/AM – antibiótico / antimicótico	L – segmento maior	RNP - ribonucleoproteico
AKAV – vírus Akabane	LACV – vírus La Crosse	ROS – espécies reativas de oxigênio
BUNV – vírus Bunyamwera	M – segmento médio	RT – transcrição reversa
cDNA – DNA complementar	mg - miligrama	S – segmento pequeno
CHIKV – vírus Chikungunya	mL - mililitro	SBV – vírus Schmallenberg
CPS – ftons por segundo	mM - milimolar	SFB – soro fetal bovino
DENV – vírus Dengue	MOI – multiplicidade de infecção	TCID ₅₀ – Tissue Culture Infectious Dose 50%
DNA – ácido desoxirribonucleico	mRNA – RNA mensageiro	UTR – região não traduzida
EEA-1 – antígeno de endossomo inicial 1	NET – neutrophil extracellular traps	VTM – meio de transporte viral
ELISA - Enzyme-Linked Immunosorbent Assay	nm - nanômetro	ZIKV – vírus Zika
ESCRT - endosomal sorting complexes required for transport	NSm – proteína não estrutural do segmento M	
Gc – Glicoproteína C-terminal	NSs – proteína não estrutural do segmento S	
Gn – Glicoproteína N-terminal	nt - nucleotídeo	
ICTV – Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus	ORF – quadro de leitura aberto	
IFN - interferon	OROV – vírus Oropouche	
IHQ - Imunohistoquímica	PMN - polimorfonuclear	
ip – intraperitoneal	qPCR – Reação em cadeia quantitativa da polimerase	
	RdRp – RNA polimerase dependente de RNA	

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. VÍRUS OROPOUCHE: EMERGÊNCIA E EPIDEMIOLOGIA.....	19
1.2. ASPECTOS CLÍNICOS DA PATOGÊNESE CAUSADA PELO VÍRUS OROPOUCHE.....	21
1.3. BIOLOGIA MOLECULAR E ORGANIZAÇÃO GENÔMICA DE OROV	22
1.4. CICLO REPLICATIVO	25
1.5. PROTEÍNAS NÃO ESTRUTURAIS E A INTERAÇÃO VÍRUS-HOSPEDEIRO	27
2. OBJETIVOS.....	31
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
3.1. LINHAGENS E CULTIVO DE CÉLULAS	33
3.2. RESGATE DOS VÍRUS RECOMBINANTES POR GENÉTICA REVERSA E PROPAGAÇÃO DOS ESTOQUES VIRAIS.....	33
3.3. QUANTIFICAÇÃO VIRAL: MÉTODO DE TCID ₅₀ E ENSAIO DE PLACA	35
3.4. PRIMERS E PROTOCOLOS DE PCR CONVENCIONAL, RT-QPCR E SEQUENCIAMENTO 36	
3.5. CONSTRUÇÃO DE PLASMÍDEOS EXPRESSANDO NSM FUSIONADA COM EGFP	38
3.6. EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL E COLETA DE ÓRGÃOS	39
3.7. SEPARAÇÃO DE CÉLULAS DO SANGUE PERIFÉRICO POR GRADIENTE DE DENSIDADE 39	
3.8. MICROSCOPIA ELETRÔNICA.....	40
3.9. IMUNOFENOTIPAGEM DE CÉLULAS OROV+ POR CITOMETRIA DE FLUXO	40
3.10. QUANTIFICAÇÃO DA LIBERAÇÃO DE <i>NEUTROPHILS EXTRACELULAR TRAPS</i> (NET) E ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (ROS).....	41
3.11. ELISA	42
3.12. IMUNOHISTOQUÍMICA	42
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
4.1. GENÉTICA REVERSA DO VÍRUS OROPOUCHE: RESGATE E CARACTERIZAÇÃO DE MUTANTES DE OROV PARA AS PROTEÍNAS NÃO-ESTRUTURAIS NSM E NSS	45
4.1.1. <i>Resgate dos vírus mutantes.....</i>	45
4.1.2. <i>Caracterização dos vírus rOROV e OROV-ΔNSm.....</i>	48
4.1.3. <i>Caracterização das fábricas virais formadas na infecção por OROV-ΔNSm.....</i>	53
4.1.4. <i>Expressão heteróloga de NSm em células de mamífero.....</i>	63

4.2. AUSÊNCIA DAS PROTEÍNAS NÃO-ESTRUTURAIS ALTERA A PATOGENICIDADE DO VÍRUS OROPOUCHE NA INFECÇÃO DE MODELOS EXPERIMENTAIS <i>IN VIVO</i>	68
4.3. BIOLOGIA DA INFECÇÃO POR OROV EM CÉLULAS DO SANGUE PERIFÉRICO DE HUMANOS <i>IN VITRO</i>	77
4.3.1. <i>Interação com neutrófilos</i>	77
CONCLUSÕES.....	85
REFERÊNCIAS.....	87
ANEXOS.....	94

INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1. Vírus Oropouche: emergência e epidemiologia

Os arbovírus (termo derivado da expressão em inglês **arthropod-borne** vírus) são vírus transmitidos a um hospedeiro vertebrado por um vetor hematófago artrópode. Nas últimas duas décadas observou-se aumento substancial na incidência de doenças causadas por arbovírus, denominadas arboviroses. Diversos fatores contribuem para isso, como a intensa urbanização em regiões periflorestais, fatores ambientais que propiciam o desenvolvimento e dispersão de vetores, e o aumento da mobilidade dos seres humanos dentre outros (Elliott, 2009; Findlater and Bogoch, 2018; Musso *et al.*, 2018). Além disso, a habilidade dos arbovírus para cruzar barreiras entre espécies e se adaptar a novos hospedeiros vertebrados por meio de mutações é muito grande, podendo levar a um aumento da virulência e do potencial epidêmico para áreas além das regiões naturalmente endêmicas (Wilder-smith *et al.*, 2017). Um bom exemplo disso foi o recente surto do vírus zika (ZIKV) no Brasil de 2014 a 2016, ressaltando a importância de se obter conhecimento aprofundado dessas arboviroses para estarmos preparados quando surtos ocorrerem (Musso, Cao-Lormeau and Gubler, 2015).

Mais de 100 espécies de arbovírus patogênicos para seres humanos estão distribuídos em seis principais grupos taxonômicos de vírus de RNA: as famílias *Togaviridae*, *Flaviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Orthomyxoviridae* e a ordem *Bunyavirales* (Charlier *et al.*, 2017). Nesta última, o vírus Oropouche (OROV) se destaca pelo seu potencial de emergir/reemergir em regiões para além da Amazônia, devido à viremia que causa em humanos, que implica na possibilidade de transmissão para outros artrópodes (Wilder-smith *et al.*, 2017).

O primeiro relato de OROV ocorreu há 63 anos, quando o vírus foi isolado de um trabalhador florestal que apresentava doença febril aguda na vila de Vega de Oropouche, em Trinidad, no ano de 1955 (Anderson *et al.*, 1961). No Brasil, OROV foi primeiramente isolado em 1960 do sangue de um bicho preguiça (*Bradypus trydactylus*) durante a construção da rodovia Belém-Brasília, e

também de mosquitos *Ochlerotatus serratus* capturados na mesma área. No ano seguinte, OROV causou a primeira epidemia em Belém, Pará, onde acometeu cerca de 11.000 pessoas (Pinheiro *et al.*, 1962). Durante o período de 1961 a 2000, estima-se que cerca de meio milhão de pessoas tenham sido acometidas em mais de 30 surtos documentados no Brasil (Romero-Alvarez and Escobar, 2018).

No ano 2000, OROV foi detectado pela primeira vez fora da região Amazônica em um macaco do gênero *Calithrix* coletado em Arinos, Minas Gerais, na região sudeste do Brasil (Teixeira Nunes *et al.*, 2005). No centro-oeste, durante uma epidemia de DENV no estado de Mato Grosso, foi possível detectar tanto pessoas quanto mosquitos positivos por RT-PCR para o segmento S de OROV (Cardoso *et al.*, 2015). Mais recentemente, OROV foi detectado no sangue periférico de um paciente apresentando uma doença febril aguda na região nordeste do Brasil (Luna *et al.*, 2017). Em conjunto, os dados sugerem que a circulação de OROV ocorre fora da Amazônia, mas deve estar sendo confundida com outras doenças febris agudas, o que gera subnotificação.

OROV é mantido na natureza em ciclos silvático e urbano, esquematizados na **Figura 1**. No ciclo silvático os hospedeiros reservatórios são mamíferos como bichos-preguiça, primatas não-humanos e aves silvestres, entre os quais o vírus é transmitido por vetores como *Coquilletidia venezuelensis* e *Aedes serratus*. Os seres humanos tornam-se infectados em regiões de floresta ou periflorestais. Ao retornar para o meio urbano, o homem torna-se o hospedeiro vertebrado e a mosca hematófaga *Culicoides paraensis* é o vetor considerado mais importante ou abundante. As epidemias de OROV são sazonais, geralmente coincidindo com períodos chuvosos, quando há maior população de vetores (Pinheiro *et al.*, 1981, 1982; Vasconcelos *et al.*, 1989; Batista *et al.*, 2013; Cardoso *et al.*, 2015; Da Carneiro Rocha *et al.*, 2015; Romero-Alvarez and Escobar, 2018).

Figura 1. Ciclos de transmissão do vírus Oropouche. O ciclo silvático de OROV ocorre entre os hospedeiros vertebrados com bichos-preguiça, primatas não-humanos, e possivelmente aves silvestres, transmitido por diversos vetores. O ser humano torna-se infectado em regiões periflorestais a ao retornar para o meio urbano com viremia pode ser fonte de vírus para a infecção de artrópodes, principalmente o vetor urbano *Culicoides paraensis*. Adaptado de (Romero-Alvarez and Escobar, 2018).

1.2. Aspectos clínicos da patogênese causada pelo vírus Oropouche

Ao ser picado pelo vetor artrópode, o ser humano adquire o vírus via epiderme e derme, e após 4 a 8 dias de incubação surgem sintomas e sinais clínicos, o que coincide com viremia (da Rosa *et al.*, 2017).

A doença causada pos OROV é chamada Febre do Oropouche, cujos sintomas são muito similares às outras arboviroses, incluindo febre, artralgias, mialgia, mal-estar geral que pode chegar à astenia, intensa fotofobia e dor retro-orbital, cefaleia, vômitos, calafrios, tonturas e, com menos frequência, exantema. Como outras arboviroses, a doença é autolimitada, com desaparecimento dos sintomas em até 10 dias. No entanto, quase 60% dos pacientes apresentaram recaída após a melhora, desenvolvendo quadro clínico similar ao quadro inicial, podendo ser até mais severo (Vasconcelos *et al.*, 1989).

Em um estudo clínico, OROV foi detectado por RT-PCR no líquido cerebroespinal em 7% de pacientes apresentando meningoencefalite (Bastos *et al.*, 2012, 2014). Sintomas hemorrágicos como petéquias e sangramento gengival também já foram observados em baixa frequência (Mourão *et al.*, 2009). Mais importante, menorrugas e abortos foram relatados durante uma epidemia de OROV (Pinheiro, Travassos da Rosa and Vasconcelos, 2004). Essa última observação é importante, pois outros orthobunyavirus do sorogrupo Simbu, portanto do mesmo grupo sorológico de OROV, causam abortos em hospedeiros vertebrados, como o vírus Akabane (AKAV) e Schmallenberg (SBV) (Kurogi *et al.*, 1976; Hoffmann *et al.*, 2012). Até hoje não houve relatos publicados de óbitos associados à infecção por OROV, logo pouco se sabe sobre tropismo tecidual do agente. Somente leucócitos do sangue periférico foram até hoje relatados como células alvos de OROV em infecções humanas (Luna *et al.*, 2017), porém, de um modo geral pouco se sabe sobre a patogênese de OROV.

1.3. Biologia molecular e organização genômica de OROV

A família *Bunyaviridae*, na qual Oropouche estava classificado até recentemente recebeu este nome do vírus Bunyamwera (BUNV), isolado originalmente de mosquitos *Aedes* na Floresta Semliki em Uganda, durante uma pesquisa sobre febre amarela em 1943 (Smituburn and Haddow, 1943). Desde então, diversos arbovírus com as mesmas características sorológicas que BUNV foram descobertos, levando à criação da família *Bunyaviridae* em 1975 pelo Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV), reconhecida como a maior e mais diversa família de vírus de RNA, com mais de 350 espécies de vírus. Com a adoção de critérios de classificação com base em sequências, em 2016 o ICTV propôs a criação da ordem Bunyavirales, que contém a família *Peribunyaviridae*, na qual está classificado OROV (Briese *et al.*, 2016).

A partícula viral de OROV é esférica, mede de 80 a 120 nm (por estimativa do gênero *Orthobunyavirus*) e é envolta pelo envelope lipídico derivado do Complexo de Golgi do hospedeiro (**Figura 2A**). O envelope apresenta espículas formadas por trímeros de heterodímeros das glicoproteínas Gn e Gc. No interior da partícula estão contidos três complexos ribonucleoproteicos (RNP)

compostos por um segmento de RNA encapsidado por unidades repetidas da proteína de nucleocapsídeo (N) em disposição circular, cada um deles associado à RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) (Elliot and Schmaljohn, 2013).

Figura 2. Estrutura e organização genômica dos Orthobunyavirus. (A) Desenho esquemático da partícula viral que varia entre 80 a 120 nm de diâmetro, com envelope lipídico onde estão heterodímeros de glicoproteínas virais Gn e Gc. No interior encontram-se três complexos ribonucleoproteicos (RNP) compostos pelas fitas simples de RNA encapsidadas pela proteína de nucleocapsídeo (N) e uma cópia da RNA polimerase dependente de RNA (RpRd). (B) Organização dos segmentos genômicos. Cada segmento é composto por uma região codificante flanqueada pelas regiões 3' não traduzida (3'UTR) e 5'UTR. Nas extremidades de cada UTR há seqüências de 10-15 nucleotídeos que são complementares permitem a formação de dupla fita de RNA denominada *pan handle*, onde a RpRd acomoda-se no complexo RNP. (C)

Estrutura circular dos RNAs na partícula viral devido a hibridação das extremidades complementares das UTRs. **(D) Organização** da codificação de proteínas virais. O segmento maior codifica a RdRp; o segmento médio (M) codifica uma poliproteína que é processada por proteases residentes do RER, gerando as glicoproteínas Gc e Gc, e a proteína não estrutural NSm. O segmento menor (S) codifica a proteína N e, em um quadro alternativo de leitura, a proteína nãoestrutural NSs. (Adaptado de Elliott, 2014).

Como todos os bunyavirus, o genoma de OROV é composto por três segmentos de RNA de fita simples e polaridade negativa. O desenho esquemático da organização e da estratégia de codificação dos segmentos de OROV está na **Figura 2**. Cada um dos segmentos recebe o nome de acordo com o seu tamanho: o segmento L (*large*) tem 6852 nucleotídeos (nt), o segmento M (*medium*) 4385 nt e o segmento S (*small*) 958 nt (Acrani *et al.*, 2015). Todos os segmentos são compostos por uma região codificante flanqueada por regiões não traduzidas (UTR) em 3' e 5'. Uma característica muito interessante das regiões UTRs é que as extremidades de um mesmo segmento são complementares entre si e encontram-se pareadas dentro da partícula viral, formando o desenho de um “cabo de panela” (tradução de *panhandle*). O *panhandle* é onde fica localizada a RNA polimerase dependente de RNA (RdRp), que utiliza essa região de dupla fita como promotor para iniciar a transcrição do genoma viral (Elliott, 2014).

O segmento L codifica a RdRp, responsável pelos processos de replicação e transcrição dos RNAs virais. Esta proteína possui domínios conservados com outros vírus de RNA segmentado de polaridade negativa como das famílias *Arenaviridae* (2 segmentos), *Tenuiviridae* (4-6 segmentos) e *Orthomyxoviridae* (6-8 segmentos). A principal semelhança ocorre no domínio de endonuclease, responsável por clivar o cap dos mRNAs do hospedeiro durante o processo de transcrição (Reguera, Weber and Cusack, 2010).

O segmento M expressa uma única poliproteína precursora, que é direcionada para o retículo endoplasmático rugoso (RER) pelo peptídeo sinal contido em sua região amino-terminal, onde é clivada por proteases celulares à medida que é traduzida pelos ribossomos residentes do retículo (Shi *et al.*, 2016). Após o processamento, são geradas duas glicoproteínas do envelope Gn e Gc e uma proteína não estrutural denominada NSm.

O segmento S codifica a proteína de nucleocapsídeo, que encapsida o RNA viral e é a proteína mais abundante durante a replicação de OROV, cuja concentração citoplasmática está intimamente relacionada com a troca dos mecanismos de replicação para transcrição do genoma viral (Ferron *et al.*, 2017). Além desta proteína, o segmento S de alguns orthobunyavirus codifica uma segunda proteína não estrutural, denominada NSs. Esta proteína é traduzida do mesmo mRNA de N, porém o códon de início encontra-se em outro quadro de leitura n+1, o qual é encontrado pelo ribossomo por um processo chamado *leaky ribosomal scanning* (Fuller, Bhowan and Bishop, 1983).

1.4. Ciclo replicativo

O ciclo de replicação geral para orthobunyavirus está esquematizado na **Figura 3**. A entrada ocorre por interação das glicoproteínas do envelope com receptor ainda não identificado. Sabe-se que a entrada de OROV em células HeLa envolve vesículas revestidas de clatrina e acidificação endossomal, processo também descrito para o orthobunyavirus LACV (Santos *et al.*, 2008; Hollidge *et al.*, 2012). No entanto, enquanto que OROV utiliza vesículas marcadas para EEA-1 após a entrada, LACV utiliza de vesículas Rab5+ para o transporte intracelular. Após a acidificação dos endossomos, ocorre a liberação dos complexos RNP no citoplasma onde se inicia a transcrição primária. Para isso, a RdRp sequestra mRNAs celulares e retira a região 5' contendo o cap junto com uma pequena sequência de aproximadamente 10 a 15 nucleotídeos que servirá de iniciador para transcrição (Reguera *et al.*, 2016). A tradução ocorre simultaneamente à transcrição, característica exclusiva dos bunyavirus (Barr, 2007). Uma vez produzidas as proteínas virais, a polimerase começa a sintetizar cópias do genoma para serem utilizadas nas partículas virais. Para BUNV foi demonstrado *in vitro* que a concentração da proteína N leva ao *switch* da transcrição para replicação do RNA por mecanismos ainda não elucidados (Ferron *et al.*, 2017). A replicação, que inclui a síntese do antigenoma de polaridade positiva, é feita de forma independente de iniciador pela polimerase. O antigenoma é utilizado como molde para síntese de múltiplas cópias de RNA de polaridade negativa que serão os genomas da progênie viral.

Figura 3. Ciclo replicativo dos orthobunyavirus. Na etapa 1 o vírus interage com o receptor provavelmente pelas glicoproteínas do envelope, e em seguida é internalizado (etapa 2). No endossomo inicial ocorre a acidificação, desfazendo a partícula viral e induzindo a fusão da membrana viral com a vesícula. Os complexos ribonucleoproteicos (RNP) são liberados no citosol (etapa 3) onde a RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) catalisa a transcrição primária do RNA mediante *cap snatch* de mRNAs do hospedeiro (etapa 4). O genoma viral é transcrito em antígeno de polaridade positiva, que será utilizado como molde para a produção de genoma (etapa 6) e arranjo dos complexos com a RNP. A medida que as proteínas são traduzidas no RER (etapa 5), as glicoproteínas trafegam pelo complexo de Golgi onde receberão modificações pós-traducionais. Os complexos RNPs são transportados até as regiões de Golgi modificadas pela inserção das glicoproteínas, onde ocorrerá a morfogênese das partículas virais, transporte (etapa 8) dos corpos multivesiculares e fusão com a membrana do hospedeiro (etapa 9), liberando os vírus no meio extracelular (etapa 10). Retirado de Elliott, 2014.

As proteínas virais endereçadas para o retículo seguem pela via secretória e acumulam-se no complexo de Golgi onde receberão as modificações pós-traducionais (Shi, Lappin and Elliott, 2004). Ao chegar à rede trans Golgi, OROV recruta a maquinaria ESCRT para modificar a membrana desta organela, assumindo a morfologia de corpo multivesicular (Barbosa *et al.*, 2018). Os complexos RNP são direcionados para as regiões do Golgi modificadas pelas inserções das glicoproteínas por mecanismos ainda não descritos. Uma hipótese levantada por Shi e colaboradores é que a proteína NSm atuaria como uma proteína de matriz, ajudando no transporte dos complexos RNPs até a cauda citosólica das glicoproteínas (Fontana *et al.*, 2008). O empacotamento dos três

complexos RNPs é direcionado pelas UTRs de cada segmento, de forma que apenas uma cópia de cada segmento seja empacotada na partícula viral (Lowen *et al.*, 2005). Os vírions contidos no corpo multivesicular são direcionados para membrana plasmática pela via exocítica, onde são liberados e sofrem o segundo processo de maturação dos heterodímeros de Gn e Gc (Shi *et al.*, 2010). Além disso, foi descrito para outro bunyavirus que filamentos de actina estão envolvidos no processo de saída das partículas virais, levantando a hipótese de que também impulsionaria vírus para células não infectadas adjacentes como havia sido previamente descrito para poxvirus (Sanz-Sánchez and Risco, 2013).

1.5. Proteínas não estruturais e a interação vírus-hospedeiro

A disponibilidade do sistema de genética reversa revolucionou a compreensão da biologia dos bunyavirus, e aumentou significativamente o nosso conhecimento sobre as funções de proteínas não estruturais, que vêm recebendo mais atenção devido às funções associadas à interação vírus-hospedeiro.

A proteína NSs é codificada em um quadro de leitura +1 do códon de início da proteína N no segmento S. Ela possui 10 kDa e ainda não possui a estrutura terciária descrita. Para os orthobunyavirus BUNV e LACV, NSs não é essencial para infecção *in vitro*, e em cultura de células os vírus sem NSs se replicam em menor eficiência, induzindo em menor escala o *shutoff* de síntese proteica em relação aos vírus *wild type* (Bridgen *et al.*, 2001; Blakqori and Weber, 2005). Já no hospedeiro invertebrado a expressão de NSs não induz *shutoff* e em mosquitos *Aedes aegypti* o vírus mutante BUNV Δ NSm demora para progredir na infecção, mas em determinado momento consegue atingir inclusive a glândula salivar (Kohl *et al.*, 2004; Szemiel, Failloux and Elliott, 2012).

O papel de NSs na inibição da resposta de hospedeiros mamíferos já está bem estabelecido por estudos que demonstraram que NSs de BUNV, SBV e LACV impede a produção de interferon α/β em células infectadas, e que vírus mutantes sem esta proteína são atenuados *in vitro* e *in vivo*. Em processos de morte celular, NSs parece ter papéis distintos entre os orthobunyavirus. Para

BUNV, NSs é anti-apoptótica, enquanto que para LACV foi descrita como indutora de apoptose (Bridgen *et al.*, 2001; Streitenfeld *et al.*, 2003; Kohl *et al.*, 2004; Varela *et al.*, 2013).

A proteína NSm resulta do processamento da poliproteína do segmento M, em que são liberadas as duas glicoproteínas Gn e Gc. NSm possui de 16 a 18 kDa e pela análise do perfil de hidropatia possui cinco domínios sendo três transmembranas (I, III e V) e dois hidrofílicos (II e IV) (Shi *et al.*, 2016). Para BUNV foi possível determinar que NSm se associa com o complexo de Golgi e, durante o processo de replicação, é responsável pelo correto direcionamento de Gc além de organizar a estrutura das fábricas virais (Shi, Lappin and Elliott, 2004; Fontana *et al.*, 2008; Shi *et al.*, 2010). Para o AKAV, recentemente foi descrito que mutantes deletados de de NSm tinham virulência alterada em modelos *in vivo* (Ishihara *et al.*, 2016). No entanto, para OROV, as funções de NSm são desconhecidas.

Em relação ao hospedeiro invertebrado, a NSm dos *Phlebovirus* foi demonstrada ser essencial para a disseminação do vírus no artrópode. Foi observado *in vivo* que RVFV-ΔNSm não consegue atingir a glândula salivar e a probóscide em mosquitos *Aedes aegypti* (Kading *et al.*, 2014; Kreher *et al.*, 2014). A NSm do gênero *Tospovirus* (bunyavirus que infectam plantas) é chamada de proteína de movimento, estando associada com a rede de membranas do RER das plantas (Singh and Savithri, 2015). A presença de NSm é capaz de induzir a formação de túbulos no plasmodesma que resulta na conexão entre as células da planta. Dessa forma, NSm interage com os complexos RNP e com proteínas do citoesqueleto para acessar células adjacentes, sem a necessidade de os vírus brotarem e reiniciarem o processo de infecção. Essa função de NSm dos tospovirus é muito bem estabelecida, uma vez que a expressão heteróloga de NSm induz a formação de estruturas tubulares, tanto em protoplastos quanto em células de inseto (Storms *et al.*, 1995; Leastro *et al.*, 2015; Feng *et al.*, 2016).

A associação de NSm com estruturas tubulares também foi observada durante o processo de replicação de vírus do gênero *Orthobunyavirus*, que inclui OROV. A infecção por BUNV causa um intenso remodelamento da estrutura

celular para a região perinuclear, aonde são encontradas organelas essenciais para os processos de morfogênese viral, como RER (tradução de proteínas), Golgi (maturação das glicoproteínas) e mitocôndrias (energia). Além disso, foram encontrados túbulos que conectam essas organelas, contendo aberturas para o interior do complexo de Golgi e que crescem à medida que a infecção progride. Estes túbulos são formados por membranas do Golgi, actina e proteína NSm. Neste aspecto a proteína NSm dos orthobunyavirus atua como “scaffold”, organizando a estrutura das fábricas virais durante a replicação viral (Novoa, Calderita, Arranz, *et al.*, 2005; Novoa, Calderita, Cabezas, *et al.*, 2005; Fontana *et al.*, 2008; De Castro, Volonté and Risco, 2013).

Em conjunto, as proteínas não estruturais NSm e NSs parecem ter um papel fundamental na relação vírus-hospedeiro, tanto modulando a resposta imune, como mecanismos básicos da célula, tornando-as alvos interessantes de estudo com vistas ao desenvolvimento de tratamentos e vacinas.

O presente estudo foi feito para investigar o papel da proteína não estrutural NSm na biologia de OROV, incluindo sua replicação, virulência para camundongo e resposta de neutrófilos à infecção *in vitro*.

OBJETIVOS

2. Objetivos

Este trabalho buscou compreender a função da proteína não estrutural NSm, na biologia do vírus Oropouche.

Para isso, foi necessário:

- a) Resgatar OROV deletado das proteínas NSm (OROV- Δ NSm), NSs (OROV- Δ NSs) e duplo mutante sem ambas as proteínas não estruturais (OROV- Δ NSm/ Δ NSs);
- b) Caracterizar a cinética de replicação dos vírus recombinantes em cultura de células de mamíferos;
- c) Determinar a localização intracelular de NSm durante o ciclo de replicação e avaliar o impacto na organização das organelas envolvidas com as fábricas virais;
- d) Analisar a resposta de neutrófilos humanos frente à infecção pelos vírus mutantes;
- e) Avaliar a susceptibilidade e a resposta de células mononucleares do sangue periférico de humanos à infecção pelos vírus mutantes;

MATERIAIS E MÉTODOS

3. Materiais e Métodos

3.1. Linhagens e cultivo de células

Monocamadas de BHK-21 (fibroblasto renal de hamster neonato) e de Vero-E6 (células epiteliais renais de macacos verdes africanos) foram mantidas em meio essencial mínimo Dulbecco (DMEM; Gibco/Invitrogen, EUA) contendo 10% de soro fetal bovino (SFB; Gibco/Invitrogen-EUA) e 10% de triptose fosfato (Invitrogen-EUA). As células BSRT7/5 (BHK-21 modificada pra expressar constitutivamente a RNA Polimerase do bacteriófago T7) foram mantidas em meio essencial mínimo Glasgow (GMEM; Invitrogen-EUA) suplementado com 10% de SFB, 10% triptose fosfato e 1mg/mL de geneticina (Invitrogen-EUA). As monocamadas de células HeLa (carcinoma cervical de ovário humano) foram cultivadas em meio essencial mínimo (MEM; Gibco/Invitrogen-EUA) contendo 10% SFB, 1% de uma suspensão de antimicótico-antibiótico (Gibco/Invitrogen-EUA) e 100 mM de L-glutamina (Gibco/Invitrogen-EUA). Todas as células de mamíferos foram cultivadas a 37°C em estufa com atmosfera contendo 5% de CO₂.

3.2. Resgate dos vírus recombinantes por genética reversa e propagação dos estoques virais

Os plasmídeos utilizados na genética reversa de OROV estão descritos em (Tilston-Lunel *et al.*, 2015). Resumidamente, o cDNA genômico de cada um dos segmentos L, M e S foi clonado em um plasmídeo pTVT controlado pelo promotor do bacteriófago T7 gerando os plasmídeos pTVT-L, pTVT-M e pTVT-S, respectivamente. Para o estudo da proteína NSm, a ORF de NSm foi retirada do plasmídeo pTVT-M gerando o plasmídeo pTVT-ΔNSm (**Figura 4A**). Para o estudo de NSs, foi realizado mutagênese sítio-dirigida inserindo *stop codon* na ORF de NSs sem alterar a ORF da proteína N, gerando o plasmídeo pTVT-ΔNSs (**Figura 4B**).

Figura 4. Esquema da construção dos plasmídeos mutantes para proteínas não estruturais. (A) A região codificante de NSm foi retirada por PCR overlap das regiões que flanqueiam NSm, mantendo o primeiro domínio transmembrana onde está situado o sítio de clivagem de Gc. (B) A expressão de NSs foi interrompida através de mutagênese sítio dirigida inserindo um stop codon após a metionina da ORF de NSs. Retirado e adaptado de Tilston-Lunel et al., 2015.

O desenho experimental do resgate está esquematizado na **Figura 5**. Antes da transfecção dos plasmídeos, células BSRT7/5 foram passadas quatro vezes alternando-se meio contendo 1 mg/mL de geneticina (Invitrogen) e sem geneticina. No dia da transfecção o meio usado não continha geneticina e a monocamada de células estava 80% confluenta em placa de 6 cavidades. Para transfecção foi utilizado o sistema de lipossomos kit Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher) de acordo com o manual do fabricante. Para resgate do vírus recombinante *wild type* (rOV OV) e do vírus *mutante* deletado da proteína NSm (OROV-ΔNSm) foi utilizado 1μg de cada plasmídeo: pTVT-L, pTVT-M e pTVT-S; e pTVT-L, pTVT-M-ΔNSm e pTVT-S, respectivamente. Para resgate dos vírus *mutante* deletado de NSs (OROV-ΔNSs) e o duplo *mutante* deletado para NSm e NSs simultaneamente (OROV-ΔNSm/ΔNSs) foi utilizado 750ng de pTVT-L, 750ng de pTVT-M ou 500ng de pTVT-M-ΔNSm e 1,5μg de OROV-S-ΔNSs.

Três dias após a transfecção ou até o aparecimento de efeito citopático, o sobrenadante da cultura de BSRT7/5 foi coletado e utilizado para infectar células

Vero, a fim de verificar se a progênie era infecciosa. O resgate dos vírus recombinantes foi então confirmado por imunofluorescência, RT-PCR e sequenciamento de Sanger do sobrenadante da cultura de células Vero.

Figura 5. Desenho experimental do resgate dos vírus mutantes. Para o resgate dos vírus por genética reversa, monocamadas de células BSRT7/5 (BHK modificada para expressar constitutivamente a RNA polimerase do bacteriófago T7) foram transfectadas por lipossomos com as combinações de plasmídeos para gerar cada uma das variações genotípicas. Três dias após a transfecção ou até o aparecimento de efeito citopático, o sobrenadante foi coletado e utilizado para tratar células Vero-E6, as quais são susceptíveis e permissivas a infecção por OROV. Dois dias após infecção ou até o aparecimento do efeito citopático, o sobrenadante das células Vero foi coletado para realização de RT-PCR e sequenciamento. A monocamada foi fixada e marcada com anticorpo policlonal anti-OROV.

Os estoques de vírus recombinantes foram propagados em monocamadas de células Vero com até 50% de efeito citopático, quando as células foram coletadas e congeladas a -70°C . Após o congelamento, os tubos foram submetidos a *snap freezing duas vezes em* nitrogênio líquido e descongelamento em água quente para lisar as células. Depois, os tubos contendo o lisado celular foram centrifugados a 4000 rpm por 15min a 4°C para separar do debris celulares. Os sobrenadantes foram concentrados em filtros Amicon 100 kDa (Merck), aliquotados e titulados.

3.3. Quantificação viral: método de TCID₅₀ e ensaio de placa

Para quantificar partículas virais viáveis de OROV pelo método de *tissue culture infectious dose* para 50% das células (TCID₅₀) foram utilizadas

monocamadas de células Vero E6 confluentes em placas de 96-wells. O inóculo viral foi preparado misturando 50 µL da amostra com 450 µL de meio DMEM 2% SFB. A partir dessa mistura, foram feitas diluições seriadas em quadruplicata passando 50 µL da diluição anterior para 450 µL de meio de cultura. As placas foram incubadas por três dias a 37°C 5% CO₂ e lidas no terceiro dia pós infecção. Para o cálculo das partículas virais foi utilizado o método de Reed-Muench (Reed and Muench, 1938), verificando-se as diluições máximas que induziram efeito citopático na monocamada, e expressando o título como recíproca da diluição.

O ensaio de placa foi utilizado tanto para quantificar o título viral quanto para analisar a morfologia das placas formados pelos vírus mutantes. Para estes experimentos, monocamadas de células Vero E6 em placas de 24-wells foram inoculadas com diluições seriadas dos vírus durante uma hora a temperatura ambiente. Depois, o inóculo viral foi retirado lavando-se as monocamadas com PBS 1x três vezes. O *overlay* foi preparado com ágar bacteriológico e misturado com DMEM 2x com 4% SFB e 4% AB/AM, sendo a concentração final do ágar de 0.3%. As placas foram incubadas por três dias a 37°C a 5% de CO₂, quando as células foram fixadas com formaldeído a 10% por 20 min. Para leitura as placas foram coradas com cristal violeta por uma hora com agitação em temperatura ambiente. O cristal violeta foi removido, as placas lavadas com água corrente e secadas para realização da contagem de placas.

3.4. Primers e protocolos de PCR convencional, RT-qPCR e sequenciamento

Os *primers* utilizados para PCR convencional, qPCR, sequenciamento e seus genes alvos estão descritos na **Tabela 1**.

Tabela 1. Primers utilizados neste trabalho.

Nome	Sequência (5'→ 3') forward e reverse	Alvo	Tamanho	Objetivo
L OROV	5' -TTAGTATGCAATGGTTTTTTG 5' -ATGCATGCTTGGTTTTTCCTG	Região codificante	451 bp	PCR convencional/ Sequenciamento

		da proteína		
		L		
M OROV	5' -TGCATGCTTTAGACAACATAG 5' -TCTTTCTGGACATGCATATCC	Região codificante de Gn e NSm	818 bp	PCR convencional/ Sequenciamento
S OROV	5' -TCAATGCTGGTGTTGTTAGAG 5' -TCACCATCATTTCCAAGTACAG	Região amino- terminal de N	306 bp	PCR convencional/ Sequenciamento
L ORO	5' - TCCGCACATCTCTACTGGTATTTTC 5' - AGCATGGTTGCCCACCAT		154 pb	qPCR
M ORO	5' - GACCACAATTTACGGTTACATGCT 5- TCGTCAACAAAACCTCAACCACTTT	Gene Gc	120 pb	qPCR
S ORO	5' - TTGCGTCACCATCATTTCCAA 5' - TACCCAGATGCGATCACCAA	Região amino- terminal de N	100 pb	qPCR

Para PCR em tempo real, inicialmente das amostras (tecido ou cultura de células armazenados em TriZol) foi extraído o RNA utilizando o kit QiAmp Viral RNA Extraction (QiAgen). Em seguida, 1000 ng de RNA de input foi colocado na reação de transcrição reversa utilizando primers randômicos e o kit High Capacity Reverse cDNA transcription (Life Technologies), de acordo com orientações do manual do kit. A PCR em tempo real foi realizada utilizando Kit Sybr Green (Kappa Biosystems) Taqman Universal PCR Master Mix (Applied biosystems), e *primers* específicos da **Tabela 1**. As reações foram conduzidas em termociclador StepOnePlus Real-Time PCR System (Applied biosystems). Para curva padrão de detecção dos segmentos foram utilizados os plasmídeos de resgate pTVT-L, pTVT-M e pTVT-S. A ciclagem da PCR em tempo real foi: 10min a 95°C, 45 ciclos de 15s a 95°C e 1min a 60°C e a curva de *melting* 15s a 95°C, 1min a 60°C e 15s a 95°C.

Para a PCR convencional foi utilizado Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (NEB Biolabs, England) e as reações foram preparadas de acordo com as instruções do fabricante. A ciclagem do PCR convencional foi: 2min a 94°C, 25 ciclos de 30s a 94°C, 30s a 55°C e 1min a 72°C, extensão final de 10min a 72°C e 4°C até retirada da amostra do termociclador. O termociclador utilizado foi T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad).

3.5. Construção de plasmídeos expressando NSm fusionada com eGFP

Para isso, foi amplificado o gene da proteína NSm de OROV a partir do vetor de genética de reversa pTVT-M em uma reação de PCR convencional com primers da **Erro! Fonte de referência não encontrada.** contendo sítios de restrição para posterior clonagem. O produto foi aplicado em gel de agarose 0,8% e a banda esperada de 550 pb foi recortada e purificada. O DNA foi sub-clonado no vetor pGEM-T Easy (Promega) e confirmado por sequenciamento de Sanger com primers universais M13. A seguir o vetor pGEM-NSm foi digerido com as enzimas para clonagem de NSm nos vetores peGFP-C2 e pEGFP-N2, separado em gel 0,8% de agarose, e o inserto liberado foi recortado, purificado e clonado nos vetores. Para confirmação foi realizado o sequenciamento dos plasmídeos utilizando os oligonucleotídeos de amplificação de NSm.

Tabela 2. Oligonucleotídeos utilizados na síntese e clonagem de NSm.

Oligo name	Sequence (5' -> 3')	Object
NSm_Fow_XhoI	CTCGAGCATGTGTAAATCGA AAAGCTG	Adicionar sítio XhoI na região 5' do gene de NSm Adicionar sítio BamHI na região 3' e <i>stop codon</i> no gene de NSm para clonagem no vetor peGFP-C2
NSm_rev_BamHI	GGATCCTTATTATGCATAAAC TGTATATATAGTAGCAC	
NSm_Fow_XhoI	CTCGAGCATGTGTAAATCGA AAAGCTG	Adicionar sítio XhoI na região 5' do gene de NSm Adicionar sítio BamHI na região 3' do gene de NSm

---

NSm_rev_BamHI_sem	GGATCCCTGCATAAACTGTAT	para clonagem no vetor
stop	ATATAGTAGCAC	peGFP-N2

3.6. Experimentação animal e coleta de órgãos

O uso de animais nesta pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética no uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP (protocolo número 194/2015 – Anexo 1). O modelo animal utilizado neste estudo foi previamente descrito pelo nosso grupo em Santos *et al.*, 2012.

Animais recém-nascidos Balb/C foram inoculados com $2.10^{5,75}$ TCID₅₀ vírus pela via subcutânea na área dorso-lombar. Os animais foram pesados diariamente e analisados quanto ao aparecimento de sinais de doença. Depois de repetidas as curvas de sobrevivência para determinar o progresso da doença, um segundo experimento foi realizado para coletar órgãos. Para isso, os animais foram acompanhados até o último estágio da doença, quando então eram sacrificados para coleta de órgãos. Os animais foram anestesiados, via intraperitoneal (i.p), com uma mistura de Ketamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg); em seguida, foi realizada a perfusão intracardíaca com 5mL de solução de PBS. Foram retirados cérebro, rins, fígado, baço e medula espinhal, que foram divididos em duas alíquotas: uma contendo o fixador de Carnoy (tecido para imunohistoquímica) e outra contendo meio de transporte viral (VTM). O tecido no VTM foi homogeneizado por 10 min a temperatura ambiente utilizando uma *bead* e TissueLyser (QiAgen). Depois, o homogeneizado foi centrifugado para retirar o debris teciduais e foi aliqotado em TriZol (Invitrogen) e outro mantido em VTM, ambos acondicionados a -80C.

3.7. Separação de células do sangue periférico por gradiente de densidade

O trabalho com adultos voluntários foi realizado em parceria com o Laboratório de Glicobiologia FMRP em um projeto aprovado pelo Comitê de Ética

da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP Protocolo 10012/2009, os quais assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido antes da doação do sangue.

O sangue dos doadores saudáveis foi coletado com heparina e as frações mononuclear (PBMC) e polimorfonuclear (PMN) foram separadas por gradiente de densidade. O tratamento inicial foi realizado por sedimentação com dextran seguido de centrifugação com Fycoll-Paque Plus (Amersham). As frações foram coletadas com auxílio de uma micropipeta e lavadas duas vezes com HBSS 1x. A fração de PBMCs teve viabilidade analisada por coloração de azul de Trypan (>95%) e o PMN por preparações por citocentrifugação, coradas com panótico (>95%).

3.8. Microscopia eletrônica

Monocamadas de células HeLa foram cultivadas em placas de 6 cavidades e infectadas com rOROV ou OROV- Δ NSm (MOI=1), e coletadas 18hpi. As células foram fixadas em 2,5% de glutaraldeído em 0,1M de tampão de cacodilato (pH 7.4) por 1h. Para o protocolo de *pre-embedding*, as células foram fixadas por irradiação de micro-ondas em 0,05% de glutaraldeído com 4% de formaldeído em tampão de 0,1M de cacodilato (pH 7.4). Depois, as células foram pós-fixadas com em 1% de tetróxido de ósmio (OsO₄, Electron Microscopy Sciences) em tampão 0,1M de cacodilato (pH 7,4), lavadas com água Milli-Q e desidratadas em bateria de etanol. As monocamadas foram removidas das placas por óxido de propileno e colocadas em EMBED 812 (Electron Microscopy Sciences). Finas secções foram feitas com navalha de diamante, montadas em grades de cobre e marcadas com citrato de Reynald's e 0,5% de acetato de uranila aquoso. As imagens foram feitas utilizando JEOL JEM-100CX II microscopia eletrônica de transmissão (JEOL USA, MA, EUA).

3.9. Imunofenotipagem de células OROV+ por citometria de fluxo

Células do sangue periférico de doadores saudáveis foram purificadas de acordo com o item 3.6 de Materiais e Métodos. A preparação de PBMCs (1×10^6 células/mL) foi infectada com rOROV ou OROV- Δ NSm (MOI=1) em suspensão por 1h. Depois, o inóculo foi retirado por centrifugação, as células ressuspensas em RPMI suplementado com 2% de soro autólogo e cultivado a 37°C em 5% de CO₂. Nos horários especificados as células foram centrifugadas e ressuspensas em FcBlock e incubadas por 30 minutos a 4°C em agitação. Os anticorpos para fenótipo celular (CD3, CD4, CD8, CD11c, CD11b, CD19, CD20) foram adicionados diretamente na mistura contendo o FC Block e incubados por 1h ao abrigo da luz. Após a incubação, as células foram lavadas duas vezes com PBS 1x e incubadas com Fix/Perm Solution (BD Biosciences) por 20 min a 4°C. Após a fixação as células foram lavadas duas vezes com Perm/Wash Solution (BD Biosciences) e incubadas com anticorpo policlonal de camundongo anti-OROV diluído 1:500 em Perm/Wash Solution por 1h. Depois as células foram lavadas três vezes com Perm/Wash Solution e incubadas com anticorpo anti-camundongo 488 na diluição 1:1000 em Perm/Wash Solution por 30min. Ao final da incubação, as células foram lavadas três vezes com Perm/Wash Solution e lidas no citômetro de fluxo FACSCanto II (BD Biosciences). Como controle foi utilizado PBMC não infectado para zerar a leitura do fluoróforo 488.

3.10. Quantificação da liberação de *neutrophils extracellular traps* (NET) e espécies reativas de oxigênio (ROS)

Para quantificação da liberação de NETs, neutrófilos humanos (2×10^5 células/mL) foram infectados com rOROV ou OROV- Δ NSm (MOI=1) em suspensão por 1h a 37°C. Em seguida, as células foram plaqueadas em placa de 96 cavidades onde foi adicionada a enzima de restrição EcoRI (200 u/mL) por 10min para digerir parcialmente as NETs liberadas. Depois, os debris e células foram centrifugados a 600 g por 10min. A uma alíquota do sobrenadante foi adicionado SYTOX Green Nucleic Acid Stain (Invitrogen; 1 μ M) em uma placa escura e incubada a 37° C por 10min. Os fragmentos de NET-DNA foram quantificados usando um leitor de fluorescência de placa FLx800 Fluorescence

Microplate Reader (BioTek Instruments, USA; excitação 485 nm, emissão 528 nm) e os resultados foram expressos como variação da fluorescência. Como controles negativos foram utilizados neutrófilos não infectados e como controles positivos foram usados neutrófilos incubados com PMA.

Para quantificação das espécies reativas de oxigênio (ROS), neutrófilos (2×10^5 células/mL) foram infectados com rOROV ou OROV- Δ NSm (MOI=1) em suspensão e misturados com a luminol quimioluminescente (0,1 mM) em placas escuras de 96 cavidades, incubados por 1h. A quimioluminescência foi avaliada em luminômetro de placa LB 960 (Berthold Technologies, Alemanha) e a emissão de luz foi gravada em contagem de fótons por segundo (CPS) por 30 a 60min. A quantidade total de ROS detectado foi estabelecido como a área sob a curva de detecção ao longo do tempo avaliado. Como controles negativos foram utilizados neutrófilos não infectados e como controles positivos foram usados neutrófilos incubados com PMA.

3.11. ELISA

Neutrófilos ou PBMCs (2×10^6 células/mL) foram infectados com rOROV ou OROV- Δ NSm (MOI=1) em suspensão por 1h a 37°C. Como controle fisiológico foram utilizadas células não infectadas e como controle positivo, células tratadas com PMA (50 nM). A produção de TNF- α (BD Biosciences) em tempos especificados no texto foi quantificada por ELISA no sobrenadante das células, de acordo com a especificação do kit.

3.12. Imunohistoquímica

Para a análise da presença de proteínas virais por IHQ, cortes de 3 μ m provenientes de tecidos parafinados foram inicialmente desparaфинados e reidratados, seguindo-se o desmascaramento antigênico em tampão citrato (Glass, Papin and Mandell, 2009). Após o bloqueio da peroxidase endógena, os tecidos foram incubados com anticorpo primário policlonal de camundongo anti-OROV diluído 1:500 por 1 h. Em seguida, os tecidos foram incubados com anticorpo secundário biotinilado IgG de cavalo anti-camundongo (Biotinylated

Horse Anti-Mouse IgG – Vector). A reação foi revelada com o kit NovaRed (Vector NovaRed Substrate Kit) e a contracoloração realizada com Hematoxilina de Harris (Sigma). Por fim, as lâminas foram montadas com Entellan (Fisher Chemical) e visualizadas em microscópio óptico, campo claro, nos aumentos de 100 e 400 vezes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

- I. *Genética reversa do vírus Oropouche: resgate e caracterização de mutantes de OROV deletados para as proteínas não-estruturais NSm e NSs*

4. Resultados e Discussão

4.1. Genética reversa do vírus Oropouche: resgate e caracterização de mutantes de OROV deletados para as proteínas não-estruturais NSm e NSs

4.1.1. Resgate dos vírus mutantes

Os vírus mutantes foram gerados por genética reversa utilizando um sistema de plasmídeos. O desenvolvimento dos plasmídeos foi realizado pelo Dr. Gustavo Acrani durante seu estágio de pós-doutoramento (Projeto FAPESP nº 2013/02798-0) (Acrani *et al.*, 2015). Resumidamente, os plasmídeos contendo o cDNA genômico com background *wild type* ou com as alterações foram transfectados em células BSRT7/5, uma linhagem celular de BHK-21 modificada que expressa constitutivamente a polimerase do bacteriófago T7 (**Figura 6A**). Uma vez transfectados, esses plasmídeos (que são controlados pelo promotor do bacteriófago T7) são transcritos em mRNA e traduzidos pela maquinaria da célula, produzindo as proteínas virais estruturais e envolvidas na replicação e liberação do vírus. Depois, o sobrenadante das culturas de BSRT7/5 foi utilizado para tratar células Vero-E6, as quais são susceptíveis e permissivas a infecção por OROV, para verificar a infectividade da progênie gerada. Por imunofluorescência (**Figura 6B**) foi possível observar que a transfecção de apenas um plasmídeo não é suficiente para ser detectado por IF, em contraste com células que foram tratadas com o sobrenadante de transfecções com as combinações completas para resgate dos vírus. Além do resgate do genótipo selvagem (rOROV), do *mutante* deletado de NSm (OROV- Δ NSm) e NSs (OROV- Δ NSs) (Tilston-Lunel *et al.*, 2015), foi possível fazer o resgate até aqui inédito do vírus duplo mutante, com ambas as proteínas deletadas (OROV- Δ NSm/ Δ NSs). O resgate de todos os vírus recombinantes foi confirmado por sequenciamento de Sanger para garantir as deleções pretendidas.

Figura 6. Resgate dos vírus mutantes para as proteínas não estruturais. (A) Esquema da genética reversa. O cDNA de cada segmento é clonado em um plasmídeo controlado pelo promotor e

terminador do bacteriófago T7. Ao ser transfectado na célula BSRT7, que expressa constitutivamente a RNA polimerase do bacteriófago T7, o cDNA é transcrito em mRNA e traduzido pela maquinaria celular. As proteínas virais são produzidas e iniciam a replicação do mRNA em vRNA genômico para constituição dos complexos ribonucleoproteicos e das demais proteínas que compõem a partícula viral. **(B)** Imunofluorescência de células Vero 24h após infecção com o sobrenadante das culturas usadas resgate dos vírus mutantes. A primeira linha corresponde a transfecção feita somente com os plasmídeos L e M, demonstrando que há necessidade dos três plasmídeos para a produção de partículas virais. As demais linhas correspondem ao resgate dos vírus rOROV, OROV- Δ NSm, OROV- Δ NSs e OROV- Δ NSm/ Δ NSs.

O resgate dos vírus mutantes em nosso laboratório corrobora dados descritos por Tilston-Lunel e colaboradores para rOROV, OROV- Δ NSm, OROV- Δ NSs em 2015, e acrescenta OROV- Δ NSm/ Δ NSs, e mostram que as proteínas não estruturais de OROV não são essenciais para a produção de partículas virais viáveis infecciosas para células Vero.

Já foi demonstrado que a proteína NSs não é essencial para a replicação *in vitro* do vírus Bunyamwera (BUNV), que é o protótipo do gênero *Orthobunyavirus*. No entanto, o BUNV sem NSs não se replicou em linhagens celulares ou sistemas biológicos que têm resposta antiviral mediada por interferon (IFN) intacta (Bridgen *et al.*, 2001; Kohl *et al.*, 2003). Para o orthobunyavirus La Crosse (LACV), a replicação normal do vírus sem NSs foi completamente recuperada com a inativação do sistema de resposta de interferon em células de mamífero (Blakqori *et al.*, 2007). O vírus Schmallenberg (SBV) selvagem e um mutante sem NSs replicaram-se nos mesmos níveis em linhagens de células deficientes de IFN, porém o vírus mutante apresentou placas de lise menores em linhagens IFN-competentes (Kraatz *et al.*, 2015). Resultado semelhante foi visto para o Phlebovirus Rift Valley (RVFV), cujo mutante sem NSs produziu títulos virais semelhantes ao wild type *in vitro* (Bird *et al.*, 2008).

Em relação à proteína NSm, o seu perfil de hidropatia prediz cinco domínios, sendo os domínios I, III e V hidrofóbicos e os domínios II e IV hidrofílicos, configurando uma proteína transmembrana do tipo II. Estudos com a NSm de bunyavirus indicam que a importância de cada domínio depende do vírus em estudo. Por exemplo, para BUNV, OROV e SBV foi possível resgatar vírus mutantes com deleção dos domínios II até o V (Shi *et al.*, 2006; Kraatz *et al.*, 2015; Tilston-Lunel *et al.*, 2015). Foi apenas no ano seguinte que descobriu-se que a manutenção do domínio I é essencial por se tratar do peptídeo sinal que

direciona a glicoproteína Gc para o Golgi (Shi *et al.*, 2016). Para esses agentes, até então não haviam sido detectadas diferenças de produção de progênie entre os vírus wild type e os mutantes sem NSm em células de mamífero. Para AKAV, que também é um *Orthobunyavirus* do sorogrupo Simbu, não foi possível resgatar partículas virais viáveis usando a construção contendo deleção dos domínios II a V (Ishihara *et al.*, 2016). Desta forma, fica claro que é necessário estudar a função dessa proteína para cada *Orthobunyavirus*.

Para obter o vírus duplo mutante OROV- Δ NSm/ Δ NSs, fruto inédito deste estudo, foi necessário balancear a quantidade de plasmídeo pTVT-S- Δ NSs transfectado, sugerindo uma maior necessidade de proteína de nucleocapsídeo presente para resgatar este vírus. O resgate do vírus duplo mutante de RVFV sem NSs e sem NSm foi um grande passo para o desenvolvimento de uma vacina veterinária para este vírus (Bird, Albariño and Nichol, 2007). Essa mesma estratégia de desenho racional de uma vacina foi utilizada para SBV, onde o resgate do vírus duplo mutante trouxe um grande avanço na área veterinária, uma vez que animais imunizados com este duplo mutante são protegidos da infecção do vírus selvagem (Kraatz *et al.*, 2014). Nesse sentido, OROV- Δ NSm/ Δ NSs tem também grande potencial de desenvolvimento biotecnológico.

4.1.2. Caracterização dos vírus rOROV e OROV- Δ NSm

Como já mencionado, o segmento M codifica uma poliproteína precursora que é processada por proteases celulares gerando Gn, Gc e NSm (Shi *et al.*, 2010, 2016). O processamento da poliproteína ocorre no retículo endoplasmático, para onde ela é direcionada pelo peptídeo sinal existente na região N-terminal (**Figura 7A**). Na construção do segmento M- Δ NSm, foi mantido o domínio I de NSm (**Figura 7B**), o qual corresponde ao sítio de processamento de Gn e de endereçamento de Gc, mantendo o fluxo natural das proteínas do envelope (Shi *et al.*, 2016).

Figura 7. Predição biofísica da poliproteína do segmento M de OROV. (A) Predição de peptídeo sinal no segmento M, indicando que o possível sítio de clivagem por proteases é localizado entre os aminoácidos 16 e 17. **(B)** Perfil de hidropatia de NSm indicando as possíveis regiões transmembrana e solúveis. Em vermelho, as regiões hidrofóbicas transmembrana, rosa região hidrofílica voltada para interior da organela em azul as regiões hidrofílicas voltadas para o citoplasma. **(C)** Distribuição dos domínios e representação esquemática da predição estrutural de NSm. (a) Predição feita com SignalP (Nielsen H., 2017). (b) Predição feita no site TMHMM (Krogh *et al.*, 2001).

Avaliamos como o OROV- Δ NSm se comportaria na ausência da proteína NSm quanto à cinética de replicação em células HeLa (MOI = 1), quantificando progênie viral tanto no sobrenadante quanto nas células. As titulações feitas em células Vero por determinação de TCID₅₀ mostraram que a cinética de produção de progênie viral foi similar nos sobrenadantes de culturas infectadas com OROVwt, rOROV e OROV- Δ NSm (**Figura 8A**). No entanto, houve um atraso na replicação de OROV- Δ NSm e no acúmulo de vírus dentro das células nas primeiras 24-36 horas após a infecção, com redução de 3 a 4 ordens de magnitude quando comparada com a produção dos vírus OROVwt e rOROV (**Figura 8B**). Porém, a taxa de crescimento de OROV- Δ NSm igualou-se à dos vírus OROVwt e rOROV às 48 hpi, sugerindo que a produção de progênie de

OROV- Δ NSm foi alterada durante a fase exponencial de replicação, mas não impedida no cômputo final.

Figura 8. Cinética de replicação de OROVwt, rOROV e OROV- Δ NSm. Células HeLa foram infectadas com OROV wt, rOROV ou rOROV- Δ NSm (MOI = 1) e foram quantificados os sobrenadantes (A) e células (B) em diferentes tempos pós-infecção. A titulação foi realizada por detecção de efeito citopático em monocamadas de células Vero-E6 inoculadas com diluições decimais seriadas das amostras. Os dados apresentados representam a média $\pm$ desvio padrão de três experimentos independentes.

Estudos de transcrição *in vitro* demonstraram que a concentração de N no citoplasma é o principal fator para trocar o processo de biossíntese da RdRp de transcrição para replicação (Ferron *et al.*, 2017). Baseando-se neste fato, foi realizado um experimento de *time course* por imunofluorescência (IF) nos mesmos pontos da curva de replicação (**Figura 9**) com células HeLa infectadas com rOROV ou OROV-ΔNSm marcadas com anticorpo policlonal anti-N.

O fenótipo da marcação para a proteína N foi muito similar em células infectadas por ambos os vírus nos tempos de 1, 6 e 12 hpi (**Figura 9A a 9F**). Às 18 hpi as células infectadas com rOROV apresentaram aglomerados de marcação para N maiores e mais numerosos do que as células infectadas por OROV-ΔNSm (**Figura 9G e 9H**). A marcação para a proteína N mostrou-se mais definida, enquanto que nas células infectadas por rOROV-ΔNSm a marcação foi mais difusa. Às 24 hpi, quando a fase exponencial atinge o platô nos vírus rOROV e OROVwt (**Figura 8**), a marcação para proteína N ainda apresenta grandes aglomerados (**Figura 9I**) nas células infectadas por rOROV. Por outro lado, a proteína N em células infectadas por OROV-ΔNSm estava dispersa no citoplasma (em pequenos e poucos aglomerados) ou concentrada na região da membrana plasmática (**Figura 9J**). Já às 36 hpi, o perfil de marcação da proteína N apresentou distribuição quase homogênea no contorno da membrana plasmática das células infectadas por rOROV (**Figura 9K**), em contraste com o perfil mais disperso pelo citoplasma e menos homogêneo na membrana plasmática (**Figura 9L**).

Figura 9. Visualização da distribuição da proteína N dos vírus rOROV e rOROV-ΔNSm ao longo do tempo do ciclo replicativo. Monocamadas de células HeLa foram infectadas com MOI = 1 e nos mesmos tempos da curva de replicação as células foram marcadas para a proteína viral usando anticorpo policlonal anti-N. Imagens representativas da maioria da população de células. Barra de escala 5 µm. Aumento: 1000x.

Em concordância com observações anteriormente publicadas (Tilston-Lunel *et al.*, 2015), não houve diferença de produção final de progênie entre os vírus rOROV e rOROV-ΔNSm. No entanto, análises mais detalhadas da cinética de replicação demonstraram atraso na produção viral intracelular no início da fase exponencial de replicação (**Figura 8**). A distribuição de proteínas virais ao longo da infecção (**Figura 9**) mostra que proteínas virais foram detectadas por IF mesmo nos pontos divergentes das curvas de replicação dos dois vírus, sugerindo que há produção de proteínas virais equivalente na infecção pelos dois vírus, mas com evidências de que não há equivalência na distribuição da montagem de progênie infecciosa. A IF para proteína N mostrou um padrão de marcação completamente diferente para agregados de proteínas virais, indicativo de fábricas virais. Em conjunto, esses resultados indicam que a função da proteína NSm está de alguma forma relacionada com a eficiência de replicação, e na ausência de NSm a produção final de progênie pode ser alcançada mediante vias alternativas à via canônica de montagem em fábricas virais, talvez envolvendo brotamento a partir da membrana plasmática.

4.1.3. Caracterização das fábricas virais formadas na infecção por OROV-ΔNSm

É sabido que tanto a montagem quanto a morfogênese das partículas virais envolve interações entre as proteínas virais e do hospedeiro (Novoa, Calderita, Arranz, *et al.*, 2005). Para os *Orthobunyavirus* demonstrou-se que o sítio de montagem nas células hospedeiras corresponde à região perinuclear, onde há o recrutamento de organelas como retículo endoplasmático rugoso (RER), Complexo de Golgi (CG) e mitocôndria para formar grandes aglomerados celulares chamados fábricas virais (Novoa, Calderita, Cabezas, *et al.*, 2005; Fontana *et al.*, 2008). As fábricas virais são grandes complexos para onde são recrutados os elementos da maquinarias de replicação e montagem viral, de tal maneira que os elementos virais permanecem em um ambiente protegido da detecção por receptores de reconhecimento de patógenos (PRR's) durante estes

processos (Novoa, Calderita, Arranz, *et al.*, 2005; Jensen and Thomsen, 2012). Nesse sentido foi descrito que a proteína NSm de BUNV auxilia na montagem da progênie viral pela formação de túbulos juntamente com actina conectando as proteínas virais às organelas das fábricas (Fontana *et al.*, 2008).

A fim de verificar a localização intracelular da NSm de OROV, foi preparado um anticorpo policlonal anti-NSm usando um epítipo do domínio IV predito. Células HeLa infectadas com rOROV ou OROV- Δ NSm foram fixadas 24hpi, ponto em que há divergência na produção de progênie viral entre rOROV e OROV- Δ NSm (**Figura 10B**), e marcadas com anti-NSm e policlonal anti-OROV, que detecta as proteínas estruturais Gn, Gc e N, conforme já verificamos previamente?? por western blot. A distribuição normal das proteínas virais em células infectadas por rOROV, inclusive a formação de fábricas virais (**Figura 10A**), mostrou-se completamente diferente da marcação difusa e sem fábricas virais definidas, vista em células infectadas por OROV- Δ NSm (**Figura 10D**). Como esperado, NSm não foi detectada em células infectadas pelo vírus OROV- Δ NSm (**Figura 10E e 10F**). Em células infectadas por rOROV a marcação para NSm mostrou-se espacialmente próxima de grandes aglomerados de proteínas virais, sugestivo de fábricas virais (**Figura 10G e 10H**).

Figura 10. Localização de NSm se correlaciona com grandes agregados de proteínas virais. Células HeLa foram infectadas com rOROV (A-C) ou com OROV-ΔNSm (D-F) (MOI=1) e às 24hpi as células foram fixadas e marcadas com anti-NSm (vermelho), anti-OROV (verde) e DAPI (azul). Painéis (A) e (D) mostram a distribuição das proteínas virais. Painéis (B) e (E) apresentam a marcação para proteína NSm, portanto, não há marcação no painel (E). Painéis (G) e (H) mostram a sobreposição das marcações revelando uma associação íntima entre NSm e proteínas virais. Aumento 63x. Barra de escala 10 μm

O próximo passo foi verificar se a ausência de NSm afetaria a composição das fábricas virais. Para isso utilizou-se microscopia eletrônica de transmissão de células infectadas com rOROV ou OROV-ΔNSm às 18 hpi, por ser este o tempo do em que ocorrem mais mudanças na morfologia da célula para iniciar a fase exponencial de replicação (**Figura 8**). Recentemente foi descrito que as fábricas virais de OROV são compostas por membranas do retículo endoplasmático, onde ocorre a tradução das proteínas, e a região trans de Golgi,

onde ocorre a glicosilação de proteínas do envelope e montagem, assim como para outros bunyavirus (Salanueva *et al.*, 2003; Barbosa *et al.*, 2018). Em células não infectadas as organelas estão normalmente dispersas pela célula (**Figura 11A**). Células infectadas pelo vírus rOROV apresentam concentração de organelas na região perinuclear, em contraste com células infectadas pelo vírus OROV-ΔNSm, que tinham pouco ou nenhum recrutamento de organelas para a mesma região (**Figura 11B**).

Figura 11. Microscopia eletrônica de células HeLa infectadas com rOROV ou OROV-ΔNSm. (A) Monocamadas de células HeLa foram tratadas com mock ou infectadas com rOROV ou OROV-ΔNSm e 24 hpi fixadas com glutaraldeído. Aumento 20.000x. **(B)** Quantificação de organelas na região perinuclear. Foram contadas três células para cada condição a uma distância de 4 μm do núcleo. As organelas contadas foram mitocôndria, vesículas, lisossomos e túbulos. Imagens representativas do fenótipo de 5 células para cada tratamento de 2 experimentos independentes.

Uma vez determinado que a ausência de NSm altera as fábricas virais como um todo, avaliou-se como esta condição altera individualmente cada uma das organelas. O marcador para calnexina, uma chaperona transmembrana do tipo II que se liga a glicoproteínas nascentes como Gn e Gc de OROV, foi utilizado para visualizar o RER, local onde ocorre a tradução das proteínas virais e o processamento da poliproteína (Shi *et al.*, 2016). Células HeLa foram infectadas com rOROV (**Figura 12A a 12C**) ou com OROV- Δ NSm (**Figura 12D a 12F**), fixadas 24hpi e marcadas com anti-calnexina e anti-OROV. Analisando a colocalização das proteínas virais e calnexina entre as células infectadas com rOROV ou OROV- Δ NSm, não foi possível visualizar ou detectar diferenças (**Figura 12K**). No entanto, ao analisar a distribuição espacial da colocalização calnexina-proteínas virais, fica clara a distribuição perinuclear da colocalização nas células infectadas com rOROV (**Figura 12G e 12H**) em comparação com a distribuição difusa das células infectadas com OROV- Δ NSm (**Figura 12I e 12J**).

Figura 12. Mutante de OROV sem NSm interrompe o recrutamento do retículo endoplasmático para região perinuclear. (A a F) Colocalização entre calnexina e proteínas virais. Células HeLa foram infectadas com rOROV (12A a 12C) ou com rOROV- Δ NSm (12D a 12F) em uma MOI=1, fixadas às 18hpi e marcadas com anti-calnexina (vermelho), anti-OROV (verde) e núcleo (DAPI, azul). **(G e H)** Surface plot da distribuição de calnexina de células infectadas rOROV vista no painel A. **(I e J)** Surface plot da distribuição de calnexina em células infectadas com rOROV- Δ NSm. **(K)** Coeficiente de correlação de Manders. Dados utilizados para co-localização estão expressos como a média $\pm$ desvio padrão da análise de 5 células de 3 experimentos independentes. Dados plotados no surface plot representam o fenótipo de 10 células de 3 experimentos independentes. ns: não significativo. Barra de escala 5 μ m.

Em seguida, investigou-se as alterações no complexo de Golgi, uma vez que as proteínas glicosiladas Gn e Gc de BUNV passam por esta organela onde sofrem modificações pós-traducionais (Novoa, Calderita, Cabezas, *et al.*, 2005). Os dados prévios demonstraram uma concentração maior da marcação para giantina em células infectadas tanto por rOROV quanto por OROV- Δ NSm, orientada espacialmente para regiões com maiores fábricas virais. Em ambos os tempos analisados não houve diferença na colocalização com proteínas virais e giantina. Houve redução na colocalização de proteínas virais com giantina (**Figura 13**), provavelmente pelo fato de que nesse tempo pós-infecção (24 hpi) a grande maioria das proteínas virais já saíram dessa organela.

Figura 13. Colocalização de proteínas virais com cisternas do cis Golgi e Golgi medial. Monocamadas de células HeLa foram infectadas com (A a C) rOROV ou (D a F) OROV-ΔNSm, e às 24 hpi foram fixadas e marcadas com anti-giantina (vermelho), anti-OROV (verde) e DAPI (núcleo). (G) Coeficiente de colocalização de Manders. Os dados plotados foram obtidos da análise de colocalização de cinco células de três experimentos independentes. Ns = não significativo.

Em seguida analisou-se a relação das proteínas virais com a rede trans-Golgi. Para outros *Orthobunyavirus*, já foi demonstrado que a rede trans-Golgi é o principal sítio onde os componentes virais se acumulam para montagem, pois está envolvida no tráfego de partículas virais para a membrana, com consequente liberação para o espaço extracelular (Fontana *et al.*, 2008; Barbosa *et al.*, 2018). Usando anticorpo anti-TGN46, foi observado que às 18 hpi houve clara dispersão da marcação para TGN46, provavelmente consequente a um

desmonte da rede trans-Golgi associado com a replicação viral e com a presença de glicoproteínas do vírus. No entanto, no ponto mais tardio (24 hpi) foi visto que a marcação de TGN46 voltou a ser perinuclear, provavelmente pela reciclagem desta proteína de endossomos tardios em células infectadas por rOROV (**Figura 14A-14C**) ou por OROV- Δ NSm (**Figura 14-14G**). A colocalização entre TGN46 e proteínas virais (**Figura 14D e 14H**) decaiu significativamente em células infectadas com rOROV em comparação com células infectadas com OROV- Δ NSm (**Figura 14I**), indicando retenção de proteínas virais nesse compartimento.

Figura 14. Ausência de NSm causa retenção de proteínas virais na rede trans-Golgi. Monocamadas de células HeLa infectadas com (**A a D**) rOROV ou (**E a H**) OROV- Δ NSm e 24 hpi, fixadas e marcadas com anti-TGN46 (vermelho), anti-OROV (verde) e núcleo (DAPI). (**I**) Coeficiente de colocalização de Manders (tM1) seguido do teste de Bonferroni comparando a colocalização entre a marcação de TGN46 e proteína dos vírus rOROV e OROV- Δ NSm. ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$.

Outro fenômeno observado em células infectadas por OROV- Δ NSm foi a diminuição do tamanho da área das fábricas virais (**Figura 15**). Para isso, foram

medidas as áreas dos 30 maiores aglomerados proteicos em células infectadas por rOROV ou OROV- Δ NSm às 24hpi, quando fica mais evidente a diferença de distribuição das proteínas virais na ausência de NSm.

Figura 15. Ausência de NSm atrofia a formação de grandes fábricas virais. Análise da área das fábricas virais formadas em células infectadas por (A) rOROV ou (B) OROV- Δ NSm. ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$. (C) Quantificação da área das 10 maiores fábricas virais de 4 células para cada tratamento de dois experimentos independentes, analisados por T-test pareado e paramétrico. Barra de escala 10 μm .

Dessa forma, foram investigadas as principais organelas envolvidas nas fábricas virais de bunyavirus (Fontana *et al.*, 2008). Primeiramente, na investigação do RER, que é essencial para síntese proteica, os resultados de IF para calnexina não mostraram diferenças na colocalização com proteínas virais

entre células infectadas por rOROV ou por rOROV- Δ NSm. Por outro lado, foi observada ausência de recrutamento de calnexina para região perinuclear em células infectadas por OROV- Δ NSm. Essa característica já foi descrita para a proteína NSm de *Tospovirus*, onde a co-expressão de NSm e de sequências HDEL do RER indicaram remodelamento do RER, culminando na produção de vesículas (Singh and Savithri, 2015). Também não houve diferença na colocalização das cisternas cis e medial de Golgi, entre células infectadas por rOROV ou OROV- Δ NSm.

Enquanto não houve alteração na relação das proteínas virais com RER e cis-Golgi, a rede trans-Golgi parece ser o principal componente das fábricas virais em que NSm atua. A marcação de TGN46 às 18hpi, que é o início da fase exponencial, mostrou intensa reorganização desta região em células infectadas com rOROV, mas não com OROV- Δ NSm. À medida que a infecção progride para 24h, já na fase exponencial tardia de replicação, as proteínas virais de rOROV apresentaram um padrão mais disperso de marcação e TGN46 volta à região perinuclear, sugerindo reciclagem da proteína, diminuindo a colocalização entre TGN46 e proteínas virais. O oposto é visto em células infectadas por OROV- Δ NSm, indicando que as proteínas virais de OROV- Δ NSm ficam retidas na rede trans de Golgi. Além disso, o fenótipo de distribuição e forma das fábricas virais é alterado em células infectadas com OROV- Δ NSm, nas quais os aglomerados de proteínas virais têm menor tamanho em comparação com células infectadas com rOROV.

Em conjunto, os dados sugerem que a proteína NSm está envolvida na montagem das fábricas virais, consequentemente na morfogênese de partículas virais de OROV pela via canônica (Barbosa *et al.*, 2018).

4.1.4. Expressão heteróloga de NSm em células de mamífero

Além do OROV knockout para a proteína NSm, outra importante ferramenta para o estudo da função desta proteína é sua expressão heteróloga e avaliação de fenótipos que induz.

Os plasmídeos recombinantes peGFP-N2-NSm e peGFP-C2 foram transfectados em monocamadas de células HeLa cultivadas sobre lamínulas de vidro e o progresso da expressão de GFP foi monitorado usando microscópio invertido de fluorescência Olympus, com células fixadas e marcadas com DAPI. A **Figura 16D a 16F** mostra o padrão de distribuição de NSm. Nas **Figura 16A a 16C**, a monocamada de HeLa foi infectada com o vírus rOROV e marcada com anti-NSm e com DAPI. Já nas **Figura 16D a 16L** as monocamadas foram transfectadas com plasmídeos peGFP vazio (**Figura 16D a 16F**), peGFP-N2-NSm (**Figura 16G a 16I**) ou peGFP-C2-NSm (**Figura 16J a 16L**). Nos *insets* na parte inferior da imagem fica evidente que o padrão de distribuição de NSm nas células transfectadas com o peGFP-NSm se aproxima mais do padrão apresentado pelas células transfectadas com o plasmídeo peGFP vazio, do que com as células infectadas com rOROV. Isso sugere que a localização normal de NSm é alterada na presença da proteína fluorescente.

Figura 16. Transfecção de células HeLa com plasmídeos peGFP expressando NSm. (A a C) Imunofluorescência de célula HeLa infectada com rOROV (MOI=1), fixadas 18hpi e marcadas com anti-NSm (verde) e DAPI (azul). (D a F) Células HeLa transfetadas com peGFP-N2 vazio. (G a I) Células HeLa transfetadas com peGFP-N2-NSm. (J a L) Células HeLa transfetadas com peGFP-C2-NSm. Barra de escala: 20 nm.

Alternativamente, a alteração de localização de NSm na expressão heteróloga pode sugerir que a proteína somente será corretamente

direcionada na presença da poliproteína precursora, produto da tradução do segmento M. É provável que durante o processamento da poliproteína originária do segmento M os sinais de endereçamento que as glicoproteínas possuem influenciem o correto endereçamento de NSm no interior da célula (Shi, Lappin and Elliott, 2004). De fato, o trabalho que descreveu a localização de NSm em células infectadas pelo vírus protótipo BUNV no complexo de Golgi foi realizado expressando o segmento M inteiro (Lappin et al., 1994).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

- II. Ausência das proteínas não-estruturais altera a patogenicidade do vírus Orpouche na infecção de modelos experimentais *in vivo*

4.2. Ausência das proteínas não-estruturais altera a patogenicidade do vírus Oropouche na infecção de modelos experimentais *in vivo*

Pouco se sabe sobre os fatores virais que influenciam na sua virulência de OROV. Com o objetivo de verificar a influência das proteínas não estruturais de OROV na sua patogenicidade, os vírus gerados por genética reversa foram inoculados em camundongos Balb/C recém-nascidos, um modelo já descrito pelo nosso grupo (Santos *et al.*, 2012). Cada animal foi inoculado pela via subcutânea na área dorso-lombar com $2 \times 10^{5,75}$ TCID₅₀ de OROV recombinante descrito no item 3.6 de Materiais e Métodos. O grupo controle foi inoculado com *mock*, consistindo em igual volume de sobrenadante de cultura de células Vero-E6, a mesma linhagem utilizada para produzir os estoques virais. Os animais foram seguidos por 21 dias, pesados e avaliados duas vezes por dia para verificar sinais de doença. Este experimento foi repetido duas vezes com 7 animais em cada grupo e com estoques virais distintos.

As curvas de sobrevivência obtidas com os animais inoculados estão na **Figura 17A**. Como esperado, animais inoculados com rOROV começaram a morrer no 5º dpi. No 4º dpi 4 animais do grupo inoculado com OROV-ΔNSm apresentaram letargia e paralisia de membros inferiores (**Figura 17B**) e morreram, assim como 2 animais do grupo inoculado com OROV-ΔNSs. Nenhum dos animais inoculados com *mock* morreu. Todos os animais do grupo inoculado com OROV-ΔNSm morreram até o 10º dpi, enquanto que o último animal a morrer do grupo rOROV+ foi encontrado morto no 13º dpi (**Figura 17C**). Ao final do experimento, a letalidade do grupo inoculado com rOROV foi 78,5%, de modo semelhante ao descrito anteriormente (Santos *et al.*, 2012). No grupo inoculado com OROV-ΔNSm a letalidade foi 100%, no grupo inoculado com OROV-ΔNSs foi de 42% e no grupo inoculado com OROV-ΔNSm/ΔNSs foi de 14,3%. Os animais que sobreviveram não apresentaram sinais de doença até o final do experimento. A maioria dos animais que morreram apresentaram sinais que incluíram espasmos, letargia, ataxia e nos estágios mais avançados, paralisia dos membros inferiores (**Figura 17E**), inabilidade de se amamentar.

Figura 17. Infecção experimental de animais com vírus Oropouche recombinantes. (A) Curva de sobrevivência dos grupos experimentais. Animais foram inoculados com $2.10^{5.75}$ TCID₅₀ dos vírus rOROV, OROV-ΔNSm, OROV-ΔNSs, OROV-ΔNSm/ΔNSs ou sobrenadante de células Vero-E6 (mock), analisados duas vezes por dia por 21 dias para verificar sinais de doença. (B) Sinais de doença nos animais infectados com vírus OROV-ΔNSm (pontilhado verde) em comparação ao grupo *mock* (pontilhado preto), evidenciando paralisia dos membros inferiores (cabeça de seta), perda de peso por falta de alimentação e ataxia (animal da direita). (C) Último animal a morrer no 10º dia pi no grupo rOROV, com paralisia dos membros inferiores. (D) Animais no 5º dia pi quando houve maior número de mortes no grupo OROV-ΔNSm (pontilhado verde), em um animal do grupo rOROV (pontilhado azul), em comparação ao animal inoculado com *mock* (pontilhado preto). (E) Paralisia dos membros inferiores em animal rOROV+. O gráfico de sobrevivência é a somatória dos dois experimentos totalizando um n=14 para cada grupo. As curvas individuais não possuíam diferenças estatísticas.

O tropismo tecidual nas infecções pelos vírus mutantes foi avaliado pela coleta de órgãos de animais que apresentavam algum sinal de doença no 7º dpi. Os animais foram eutanasiados, perfundidos com PBS 1x e o cérebro, rins, fígado, baço e medula espinhal foram colhidos. Foi feita a detecção do segmento

S nos diferentes tecidos por PCR em tempo real (Figura 17). Em todos os tecidos de animais doentes foi possível detectar OROV. No entanto, a maior diferença foi observada nos tecidos neurais (cérebro e medula espinhal), principalmente em relação à quantificação do vírus OROV- Δ NSm na medula espinhal. Foi realizada imunohistoquímica para detectar antígenos virais nos cortes de cérebro desses animais (Figura 19), e observou-se a presença de proteínas virais em todos.

Figura 18. Detecção do segmento S em diferentes tecidos de animais infectados. Camundongos Balb/C recém-nascidos foram infectados com $2 \times 10^{5.75}$ TCID₅₀ de rOROV, OROV-ΔNSm, OROV-ΔNSs ou OROV-ΔNSm/ΔNSs pela via subcutânea. No sétimo dia pós infecção, os animais que apresentavam pelo menos algum sinal de doença foram anestesiados, perfundidos e tiveram os órgãos coletados. A quantificação de RNA foi realizada através de triplicata experimental e normalização por curva padrão utilizando o plasmídeo pTVT-S.

De acordo com as evidências experimentais, tanto na diferença detectada nos tecidos neurais por qPCR quanto pelos sinais de acometimento do sistema nervoso central (paralisia dos membros inferiores e espasmos), foi realizada imunohistoquímica para detectar antígenos virais nos cortes de cérebro destes animais (**Figura 19**). Observou-se que em todos os cortes de cérebro houve detecção das proteínas virais.

Figura 19. Detecção de antígenos virais em cortes de cérebros de camundongos. Camundongos Balb/C recém-nascidos foram infectados com $2 \times 10^{5,75}$ TCID₅₀ de rOROV, OROV-ΔNSm, OROV-ΔNSs ou

OROV- Δ NSm/ Δ NSs pela via subcutânea. No sétimo dia pós infecção, os animais que apresentavam pelo menos algum sinal de doença foram anestesiados, perfundidos e tiveram os órgãos coletados.

Portanto, a infecção experimental de camundongos Balb/c recém-nascidos com os OROV deletado das proteínas não estruturais alterou o perfil de sobrevivência em relação ao vírus OROV selvagem. O vírus sem NSm desencadeou doença mais grave, com início mais rápido e morte abrupta dos animais, chegando a ser 100% letal. Esses resultados sugerem que NSm esteja envolvida em mecanismos de supressão de virulência na fase aguda da infecção, visto que a letalidade aumentou na sua ausência. Para outros *Orthobunyavirus* esta proteína foi descrita como envolvida no processo de montagem do vírus Bunyamwera (Shi *et al.*, 2006) e mais recentemente foi demonstrada estar associada à patogenicidade *in vivo* do vírus Akabane (Ishihara *et al.* 2016). No entanto, para esses vírus não foi possível gerar vírus mutantes sem NSm no mesmo background genético do tipo selvagem, do modo que fizemos para OROV, o que indica que o mecanismo de atuação da NSm em OROV é diferente de outros vírus da família.

Por outro lado, na ausência de NSs, apesar de os óbitos terem ocorrido aproximadamente no mesmo período de tempo dos outros vírus, a taxa de sobrevivência foi maior que a observada com o OROV wild type, sugerindo que a ausência de NSs tende a atenuar a virulência de OROV. Resultado semelhante foi visto com o *Orthobunyavirus* La Crosse em experimentos que evidenciaram que LACV mutante sem NSs foi atenuado em relação ao tipo selvagem (Blakqori *et al.*, 2007). No entanto, o vírus Schmallenberg (SBV) sem NSs apresentou a mesma virulência para animais IFN-deficientes do que SBV selvagem em animais IFN-competentes, sugerindo que a resposta de IFN é um dos mecanismos de supressão viral (Kraatz *et al.*, 2015).

O dado mais surpreendente do presente estudo foi a grande atenuação da virulência do OROV duplo knockout para NSs e NSm simultaneamente, que teve baixa letalidade (14%). Dos dois animais que morreram, foi possível detectar OROV em diferentes tecidos, inclusive no cérebro, de um deles, porém com um fenótipo diferente de marcação para os antígenos virais. Como assim? Cadê esse dado? A esse respeito, o vírus SBV duplo mutante deletado das duas

proteínas não estruturais não causou doença quando inoculados em gado, mas levaram à soroconversão, protegendo os animais em um experimento de desafio com SBV selvagem (Kraatz *et al.*, 2015). O duplo mutante do *Phlebovirus* RVFV, com apenas uma dose, imunizou 37 de 40 animais em um teste de desafio, no qual não foi detectada viremia (Bird *et al.*, 2008).

A estratégia de utilizar vacinas de vírus vivos contendo uma ou múltiplas substituições de nucleotídeos para atenuação traz risco por causa da possibilidade de reversão do fenótipo atenuado para o selvagem, devido erros de transcrição inerentes da RNA polimerase. Portanto, vacinas atenuadas mediante deleções de genes inteiros têm maior potencial de desenvolvimento biotecnológico. Assim, o insumo presentemente desenvolvido, OROV- Δ NSm/ Δ NSs, pode vir a ser desenvolvido como vacina candidata para OROV.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

III. Biologia da infecção *in vitro* por OROV em células humanas do sangue periférico

4.3. Biologia da infecção por OROV em células do sangue periférico de humanos *in vitro*

4.3.1. Interação com neutrófilos

Recentemente foi publicado um estudo do nosso grupo relatando a detecção de OROV por IF em células de aspecto polimorfonuclear na nata leucocitária obtida de sangue periférico de dois pacientes com doença febril aguda (Luna *et al.*, 2017). A infecção deste tipo de célula é de extrema importância, pois elas podem atuar como “cavalo de Tróia” transportando vírus para tecidos diversos, inclusive para o sistema nervoso central. A esse respeito, é importante ressaltar que OROV tem intenso neurotropismo em modelos experimentais em roedores (Rodrigues *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2012), e que em humanos há diversos relatos de acometimento do sistema nervoso central e detecção na medula espinhal (Bastos *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2014).

Recentemente foi publicado pelo nosso grupo a detecção do vírus Oropouche em um esfregaço do sangue periférico de um paciente com doença febril aguda (Luna *et al.*, 2017). Neste relato, células de aspecto polimorfonuclear foram positivas para OROV através de IF. A infecção deste tipo de célula é de extrema importância pois já foi relatado que estas podem atuar como “Cavalo de Tróia” até o sistema nervoso central. Neste aspecto, é importante ressaltar que OROV possui um intenso neurotropismo em animais e em humanos são diversos os relatos de acometimento do sistema nervoso central quanto a detecção na medula espinhal (Bastos *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2014).

Para avaliar a importância da proteína NSm na infecção deste tipo de célula, primeiramente foi determinada a natureza das células polimorfonucleares (PMN) passíveis de infecção pelos vírus rOROV e OROV- Δ NSm. Para isso, do sangue de três doadores saudáveis foram purificados PMNs, que foram infectados *in vitro* com os vírus rOROV ou OROV- Δ NSm (MOI=1). As células foram fixadas e marcadas com anti-MPO, que marca para a enzima mieloperoxidase presente abundantemente em neutrófilos (Klebanoff *et al.*, 2013). Por IF (**Figura 20**) foi possível ver que da preparação de PMNs, as células infectadas tanto com rOROV (**Figura 20E a 20F**) quanto com OROV- Δ NSm (**Figura 20G a 20I**) que

eram positivas para MPO foram positivas para OROV, em comparação com células MPO+ tratadas com *mock*, que não apresentaram marcação para OROV, indicando que PMNs infectados por OROV são neutrófilos (**Figura 20A a 20C**). Foi possível verificar que não houve diferença nas quantidades de células infectadas comparando rOROV com OROV- Δ NSm, indicando que a infecção dessas células não depende da presença de NSm (**Figura 20J e 20K**).

Figura 20. OROV *wild type* e OROV- Δ NSm infectam neutrófilos *in vitro*. Células polimorfonucleares infectadas com *mock* (**A a C**) ou com rOROV (**D a F**), ou com OROV- Δ NSm (**G a I**). Às 24hpi as células foram fixadas e marcadas com anti-MPO (vermelho), anti-ORO (verde) e DAPI (azul). (**J e K**) Contagem de células MPO+ OROV+ do preparo de PMN infectadas com (J) rOROV ou (K) OROV- Δ NSm. As imagens são representativas de PMNs de três doadores saudáveis. Os dados dos gráficos foram obtidos da contagem de células de trezentas células de cada um dos doadores saudáveis.

Uma vez determinada a susceptibilidade de PMNs à infecção por OROV, avaliou-se o perfil de ativação dos neutrófilos frente à infecção por rOROV e OROV- Δ NSm. Foi realizado um zimograma para detectar a liberação de gelatinase granular de neutrófilos infectados com rOROV ou OROV- Δ NSm aos 30 e 60 minutos após a infecção. Foi possível detectar quatro regiões de atividade de gelatinase: bandas com 250 kDa, 95 kDa, 82 kDa e 72 kDa que correspondem aos pesos da MMP-9 dimerizada, MMP-9 conjugada com lipocalina associada a gelatinases (NGAL), MMP-9 monomérica ativada e MMP-2 monomérica ativada, respectivamente (**Figura 21A**). De modo geral, o perfil de degranulação de neutrófilos foi similar entre os vírus rOROV e OROV- Δ NSm, com base na quantificação de enzimas ativas liberadas (**Figura 21B**).

Figura 21. Desgranulação de neutrófilos infectados por rOROV ou OROV-ΔNSm. (A) Zimograma de atividade de gelatinase no sobrenadante de cultura primária de neutrófilos. Neutrófilos de dois pacientes

saudáveis foram isolados por gradiente de Fycoll e infectados com o vírus rOV OV ou OROV-ΔNSm em três diferentes MOIs (0.1, 1 e 10) em triplicata. 30 minutos e 60 minutos após a infecção o sobrenadante foi coletado e corrido em um gel não-desnaturante contendo 0,2% de gelatina. Após a contra-coloração, regiões claras que aparecem no gel demonstram onde a gelatina foi degradada pelas gelatinases. **(B)** Fold-change da quantificação das áreas das bandas em relação ao controle negativo das quatro bandas individuais. Ctrl: controle negativo (neutrófilos não tratados), PMA (ácido miristoil-forbol), fMLP (N-Formilmetionina-leucil-fenilalanina). Dados normalizados pelos níveis de desgranulação do controle negativo, analisados por ANOVA-one way e teste de Dunnet. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.01$, $p < 0.001$.

Além do perfil de desgranulação de neutrófilos, avaliamos outros parâmetros de ativação importantes dessas células, como a produção de neutrophil *extracellular traps* (NET), espécies reativas de oxigênio (ROS) e citocinas envolvidas com a resposta antiviral como TNF- α , IL-1 β e IL-12. Para isso, neutrófilos do sangue periférico de um doador saudável foram infectados com rOROV ou OROV-ΔNSm (MOI=1) e às 20 hpi foi avaliado o perfil de liberação das citocinas TNF- α , IL-1 β e IL-12, produção ROS e NET (**Figura 22**). Quanto às citocinas, a maior diferença encontrada foi na liberação de TNF- α no sobrenadante de neutrófilos infectados por OROV-ΔNSm ($46.45 \pm 1.861 \text{ pg/mL}$) quando comparada com a liberação desta citocina no sobrenadante de neutrófilos rOROV+ ($32.18 \pm 0.3219 \text{ pg/mL}$) ($p \leq 0.05$) (**Figura 22A**). Por outro lado, não houve diferença significativa nas quantidades de IL-12 e IL-1 β . A liberação de NET de neutrófilos infectados por OROV-ΔNSm foi 3 vezes maior que em neutrófilos infectados por rOROV (**Figura 22D**), enquanto que a liberação de ROS não mostrou diferença detectável (**Figura 22E**).

Figura 22. Perfil de resposta de neutrófilos ao vírus Oropouche é modificado na ausência de NSm. (A a C) Neutrófilos foram obtidos por centrifugação diferencial de densidade (Fycoll-Paque) de um doador saudável e infectados com rOROV ou OROV-ΔNSm em MOI 0,1, 1 ou 10. 20 hpi o sobrenadante foi coletado e avaliada a quantidade de citocinas liberadas (A) TNF-α, (B) IL-12 e (C) IL-1β por ELISA. (D) Liberação de DNA 20 horas após tratamento/infecção quantificada no sobrenadante por detecção fluorescente (Ex./Em. 480/520 nm) após reação com SYTOX green. (E) A produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) foi detectada em um luminômetro e a emissão de luz foi medida em contagem de fótons por segundo (CPS). AUC representa a área sobre a curva, que foi utilizada para determinar o total de ROS. Os dados estão expressos como a média da intensidade de fluorescência ± desvio padrão. **p<0.01; ***p<0.001; ****p<0.0001. Two way ANOVA seguido do teste de Bonferroni. Quantificação de DNA liberado foi realizado em triplicata e expressa como a média ± desvio padrão.

Portanto, este conjunto de dados indica a proteína NSm está envolvida com a resposta de neutrófilos e produção de NET. Inicialmente, foi avaliado que tanto rOROV quanto OROV-ΔNSm infectam e ativam os neutrófilos de forma similar (dados de infectividade e de zimografia). A maior diferença ocorreu na produção de NET, onde neutrófilos OROV-ΔNSm produziram mais NET que rOROV, sendo o inverso observado na produção de ROS. Este perfil de maior produção de NET e menor de ROS assemelha-se à via de produção aguda de NET, ou via vital, onde os neutrófilos liberam NET sem a ativação da enzima NADPH-oxidase, responsável pela produção de ROS (Jorch and Kubes, 2017).

Gelatinases são *matrix metalloproteinases* encontradas nos grânulos de PMNs. Essas proteases quando liberadas, são responsáveis pela degradação fisiológica da matriz extracelular, facilitando a migração de neutrófilos para sítios alvos, o que possivelmente colabora para a disseminação de OROV para órgãos alvos (Senior et al. 1991; Prudova et al. 2010).

Por mecanismos ainda desconhecidos, OROV infecta a medula espinhal e o cérebro de animais experimentalmente infectados mediante inoculação subcutânea periférica, indicando forte neurotropismo (Santos *et al.*, 2012). Estudos prévios do laboratório indicam que é provável que a entrada de OROV no SNC nesse modelo seja pela via neuronal ascendente, por nervos periféricos que fazem sinapse na medula espinhal, de onde OROV ascenderia para o cérebro (Santos *et al.*, 2014). Todavia, uma via alternativa de OROV chegar ao SNC seria mediante mecanismo de *Trojan horse*, em neutrófilos do sangue periférico infectados (Luna *et al.*, 2017). Por essa via, uma vez que o neutrófilo atinge o SNC ocorreria desgranulação e consequente liberação de gelatinases que degradam matriz extracelular na barreira hematoencefálica. De acordo com essa hipótese, a ausência da proteína NSm não interferiu na ativação de neutrófilos, corroborando experimentação *in vivo* que mostrou que animais infectados com OROV- Δ NSm continuaram apresentando sinais neurológicos e antígenos virais estavam presentes no SNC.

CONCLUSÕES

Conclusões

O presente estudo teve como principal conclusão que a proteína NSm do orthobunyavirus Oropouche atua no processo de montagem de fábricas virais e como fator de virulência *in vivo*.

No que se refere ao envolvimento de NSm na replicação viral, as evidências apontam que esta proteína está envolvida no remodelamento e integridade das fábricas virais, fornecendo o ambiente para a morfogênese de partículas virais pela via canônica.

Em relação ao fator de virulência, NSm parece estar envolvida com a atenuação da patogenicidade de OROV, sendo uma “antagonista” de virulência. Na interação com neutrófilos do hospedeiro, está relacionada com a supressão da formação de NET de fase aguda.

Por fim, a partir da execução deste trabalho foi possível desenvolver um vírus deletado simultaneamente das proteínas NSm e NSs atenuado em modelo de infecção experimental *in vivo*.

REFERÊNCIAS

Referências

- Acrani, G. O. *et al.* (2015) 'Establishment of a minigenome system for oropouche virus reveals the S genome segment to be significantly longer than reported previously', *Journal of General Virology*, 96(3), pp. 513–523. doi: 10.1099/jgv.0.000005.
- Anderson, C. R. *et al.* (1961) 'Oropouche Virus: a New Human Disease Agent from Trinidad, West Indies.', *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 10(4), pp. 574–578.
- Barbosa, N. S. *et al.* (2018) 'ESCRT machinery components are required for Orthobunyavirus particle production in Golgi compartments', *PLoS Pathogens*, 14(5), pp. 1–21. doi: 10.1371/journal.ppat.1007047.
- Barr, J. N. (2007) 'Bunyavirus mRNA synthesis is coupled to translation to prevent premature transcription termination', *Rna*, 13(5), pp. 731–736. doi: 10.1261/rna.436607.
- Bastos, M. D. S. *et al.* (2012) 'Identification of oropouche Orthobunyavirus in the cerebrospinal fluid of three patients in the Amazonas, Brazil', *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 86(4), pp. 732–735. doi: 10.4269/ajtmh.2012.11-0485.
- Bastos, M. S. *et al.* (2014) 'Detection of herpesvirus, enterovirus, and arbovirus infection in patients with suspected central nervous system viral infection in the Western Brazilian Amazon', *Journal of Medical Virology*, 86(9), pp. 1522–1527. doi: 10.1002/jmv.23953.
- Batista, P. M. *et al.* (2013) 'Detection of arboviruses of public health interest in free-living New World primates (*Sapajus* spp.; *Alouatta caraya*) captured in Mato Grosso do Sul, Brazil', *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 46(6), pp. 684–690. doi: 10.1590/0037-8682-0181-2013.
- Bird, B. H. *et al.* (2008) 'Rift valley fever virus lacking the NSs and NSm genes is highly attenuated, confers protective immunity from virulent virus challenge, and allows for differential identification of infected and vaccinated animals.', *Journal of virology*, 82(6), pp. 2681–2691. doi: 10.1128/JVI.02501-07.
- Bird, B. H., Albariño, C. G. and Nichol, S. T. (2007) 'Rift Valley fever virus lacking NSm proteins retains high virulence in vivo and may provide a model of human delayed onset neurologic disease', *Virology*, 362, pp. 10–15. doi: 10.1016/j.virol.2007.01.046.
- Blakqori, G. *et al.* (2007) 'La Crosse bunyavirus nonstructural protein NSs serves to suppress the type I interferon system of mammalian hosts.', *Journal of virology*, 81(10), pp. 4991–4999. doi: 10.1128/JVI.01933-06.
- Blakqori, G. and Weber, F. (2005) 'Efficient cDNA-Based Rescue of La Crosse Bunyaviruses Expressing or Lacking the Nonstructural Protein NSs', *Journal of Virology*, 79(16), pp. 10420–10428. doi: 10.1128/JVI.79.16.10420-10428.2005.
- Bridgen, a *et al.* (2001) 'Bunyamwera bunyavirus nonstructural protein NSs is a nonessential gene product that contributes to viral pathogenesis.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(2), pp. 664–669. doi: 10.1073/pnas.98.2.664.
- Briese, T. *et al.* (2016) 'Bunyavirales proposal', *ICTV - International Comittee of Taxonomy of Viruses*, pp. 1–45. Available at: https://talk.ictvonline.org/files/ictv_official_taxonomy_updates_since_the_8th_report/m/animal-dsrna-and-ssrna--viruses/6647/download.

- Cardoso, B. F. *et al.* (2015) 'Detection of oropouche virus segment s in patients and in culex quinquefasciatus in the state of mato grosso, Brazil', *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 110(6), pp. 745–754. doi: 10.1590/0074-02760150123.
- Da Carneiro Rocha, T. *et al.* (2015) 'Evaluation of arboviruses of public health interest in free-living non-human primates (*Alouatta* spp., *Callithrix* spp., *Sapajus* spp.) in Brazil', *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 48(2), pp. 143–148. doi: 10.1590/0037-8682-0024-2015.
- De Castro, I. F., Volonté, L. and Risco, C. (2013) 'Virus factories: Biogenesis and structural design', *Cellular Microbiology*, 15(1), pp. 24–34. doi: 10.1111/cmi.12029.
- Charlier, C. *et al.* (2017) 'Arboviruses and pregnancy: maternal, fetal, and neonatal effects', *The Lancet Child and Adolescent Health*, 1(2), pp. 134–146. doi: 10.1016/S2352-4642(17)30021-4.
- Elliot, R. M. and Schmaljohn, C. S. (2013) 'Bunyaviridae', in *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins Philadelphia, pp. 1581–1602.
- Elliott, R. M. (2009) 'Bunyaviruses and climate change', *Clinical Microbiology and Infection*. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 15(6), pp. 510–517. doi: 10.1111/j.1469-0691.2009.02849.x.
- Elliott, R. M. (2014) 'Orthobunyaviruses: recent genetic and structural insights.', *Nature reviews. Microbiology*. Nature Publishing Group, 12(10), pp. 673–85. doi: 10.1038/nrmicro3332.
- Feng, Z. *et al.* (2016) 'The ER-Membrane Transport System Is Critical for Intercellular Trafficking of the NSm Movement Protein and Tomato Spotted Wilt Tospovirus', *PLoS Pathogens*, 12(2), pp. 1–27. doi: 10.1371/journal.ppat.1005443.
- Ferron, F. *et al.* (2017) 'Transcription and replication mechanisms of Bunyaviridae and Arenaviridae L proteins', *Virus Research*, pp. 1–17. doi: 10.1016/j.virusres.2017.01.018.
- Findlater, A. and Bogoch, I. I. (2018) 'Human Mobility and the Global Spread of Infectious Diseases: A Focus on Air Travel', *Trends in Parasitology*. Elsevier Ltd, 34(9), pp. 772–783. doi: 10.1016/j.pt.2018.07.004.
- Fontana, J. *et al.* (2008) 'The unique architecture of Bunyamwera virus factories around the Golgi complex.', *Cellular microbiology*, 10(10), pp. 2012–28. doi: 10.1111/j.1462-5822.2008.01184.x.
- Fuller, F., Bhowan, A. S. and Bishop, D. H. L. (1983) 'Bunyavirus nucleoprotein, N, and a non-structural protein, NS(s), are coded by overlapping reading frames in the S RNA', *Journal of General Virology*, 64(8), pp. 1705–1714. doi: 10.1099/0022-1317-64-8-1705.
- Glass, G., Papin, J. A. and Mandell, J. W. (2009) 'SIMPLE: A sequential immunoperoxidase labeling and erasing method', *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 57(10), pp. 899–905. doi: 10.1369/jhc.2009.953612.
- Hoffmann, B. *et al.* (2012) 'Novel orthobunyavirus in cattle, Europe, 2011', *Emerging Infectious Diseases*, 18(3), pp. 469–472. doi: 10.3201/eid1803.111905.
- Hollidge, B. S. *et al.* (2012) 'Orthobunyavirus Entry into Neurons and Other Mammalian Cells Occurs via Clathrin-Mediated Endocytosis and Requires Trafficking into Early Endosomes', *Journal of Virology*, 86(15), pp. 7988–8001. doi: 10.1128/JVI.00140-12.
- ISHIHARA, Y. *et al.* (2016) 'Akabane virus nonstructural protein NSm regulates viral growth and pathogenicity in a mouse model', *Journal of Veterinary Medical Science*, (June). doi: 10.1292/jvms.16-0140.

- Jensen, S. and Thomsen, A. R. (2012) 'Sensing of RNA Viruses : a Review of Innate Immune Receptors Involved in Recognizing RNA Virus Invasion', *Journal of virology*, pp. 2900–2910. doi: 10.1128/JVI.05738-11.
- Jorch, S. K. and Kubes, P. (2017) 'An emerging role for neutrophil extracellular traps in noninfectious disease', *Nature Medicine*, 23(3), pp. 279–287. doi: 10.1038/nm.4294.
- Kading, R. C. *et al.* (2014) 'Deletion of the NSm Virulence Gene of Rift Valley Fever Virus Inhibits Virus Replication in and Dissemination from the Midgut of *Aedes aegypti* Mosquitoes', *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8(2), pp. 17–18. doi: 10.1371/journal.pntd.0002670.
- Klebanoff, S. J. *et al.* (2013) 'Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms', *Journal of Leukocyte Biology*. Bethesda, MD, USA: Society for Leukocyte Biology, 93(2), pp. 185–198. doi: 10.1189/jlb.0712349.
- Kohl, A. *et al.* (2003) 'Bunyamwera Virus Nonstructural Protein NSs Counteracts Interferon Regulatory Factor 3-Mediated Induction of Early Cell Death', *Journal of Virology*, 77(14), pp. 7999–8008. doi: 10.1128/JVI.77.14.7999.
- Kohl, A. *et al.* (2004) 'A Bunyamwera Virus Minireplicon System in Mosquito Cells', *Journal of Virology*, 78(11), pp. 5679–5685. doi: 10.1128/JVI.78.11.5679–5685.2004.
- Kraatz, F. *et al.* (2014) 'Deletion mutants of Schmallenberg virus are avirulent and protect from virus challenge.', *Journal of virology*, (November). doi: 10.1128/JVI.02729-14.
- Kraatz, F. *et al.* (2015) 'Deletion Mutants of Schmallenberg Virus Are Avirulent and Protect from Virus Challenge', *Journal of Virology*, 89(3), pp. 1825–1837. doi: 10.1128/JVI.02729-14.
- Kreher, F. *et al.* (2014) 'The Rift Valley fever accessory proteins NSm and P78/NSm-GN are distinct determinants of virus propagation in vertebrate and invertebrate hosts.', *Emerging microbes & infections*, 3(10), p. e71. doi: 10.1038/emi.2014.71.
- Krogh, a *et al.* (2001) 'Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes.', *Journal of molecular biology*, 305, pp. 567–580. doi: 10.1006/jmbi.2000.4315.
- Kurogi, H. *et al.* (1976) 'Epizootic congenital arthrogryposis-hydranencephaly syndrome in cattle: Isolation of Akabane virus from affected fetuses', *Archives of Virology*, 51(1–2), pp. 67–74. doi: 10.1007/BF01317835.
- Lappin, D. F. *et al.* (1994) 'Localization of Bunyamwera bunyavirus G1 glycoprotein to the Golgi requires association with G2 but not with NSm', *Journal of General Virology*, 75, pp. 3441–3451. doi: 10.1099/0022-1317-75-12-3441.
- Leastro, M. O. *et al.* (2015) 'The movement proteins (NSm) of distinct tospoviruses peripherally associate with cellular membranes and interact with homologous and heterologous NSm and nucleocapsid proteins', *Virology*. Elsevier, 478, pp. 39–49. doi: 10.1016/j.virol.2015.01.031.
- Lowen, A. C. *et al.* (2005) 'Attenuation of Bunyavirus Replication by Rearrangement of Viral Coding and Noncoding Sequences Attenuation of Bunyavirus Replication by Rearrangement of Viral Coding and Noncoding Sequences', *Journal of virology*, 79(11), pp. 6940–6946. doi: 10.1128/JVI.79.11.6940.
- Luna, L. K. de S. *et al.* (2017) 'Oropouche Virus Is Detected in Peripheral Blood Leukocytes From Patients', 1111(October 2016), pp. 1108–1111. doi: 10.1002/jmv.
- Mourão, M. P. G. *et al.* (2009) 'Oropouche fever outbreak, Manaus, Brazil, 2007–2008', *Emerging Infectious Diseases*, 15(12), pp. 2063–2064. doi: 10.3201/eid1512.090917.

- Musso, D. *et al.* (2018) 'Unexpected outbreaks of arbovirus infections: lessons learned from the Pacific and tropical America', *The Lancet Infectious Diseases*, 3099(18), pp. 1–7. doi: 10.1016/S1473-3099(18)30269-X.
- Musso, D., Cao-Lormeau, V. M. and Gubler, D. J. (2015) 'Zika virus: Following the path of dengue and chikungunya?', *The Lancet*. Elsevier Ltd, 386(9990), pp. 243–244. doi: 10.1016/S0140-6736(15)61273-9.
- Novoa, R. R., Calderita, G., Cabezas, P., *et al.* (2005) 'Key Golgi factors for structural and functional maturation of bunyamwera virus.', *Journal of virology*, 79(17), pp. 10852–10863. doi: 10.1128/JVI.79.17.10852-10863.2005.
- Novoa, R. R., Calderita, G., Arranz, R., *et al.* (2005) 'Virus factories: associations of cell organelles for viral replication and morphogenesis.', *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization*, 97(2), pp. 147–172. doi: 10.1042/BC20040058.
- Pinheiro, F. *et al.* (1981) 'Oropuche virus I A review of clinical, epidemiological and ecological findings', *The American journal of Tropical medicine and hygiene*, 30(1), pp. 149–160.
- Pinheiro, F. P. *et al.* (1962) 'Epidemia de vírus Oropouche em Belém.', *Revista do Serviço Especial de Saude Publica*, 12, pp. 15–23.
- Pinheiro, F. P. *et al.* (1982) 'Transmission of oropouche virus from man to hamster by the midge *Culicoides paraensis*', *Science*, 215(4537), pp. 1251–1253. doi: 10.1126/science.6800036.
- Pinheiro, F. P., Travassos da Rosa, A. P. and Vasconcelos (2004) 'Oropouche fever.', in Feigin, R. D. (ed.) *Textbook of Pediatric Infectious Diseases*. Philadelphia. Philadelphia: W.B. Saunders Co., pp. 2418–23.
- Prudova, A. *et al.* (2010) 'Multiplex N-terminome analysis of MMP-2 and MMP-9 substrate degradomes by iTRAQ-TAILS quantitative proteomics.', *Molecular & cellular proteomics : MCP*. United States, 9(5), pp. 894–911. doi: 10.1074/mcp.M000050-MCP201.
- Reed, L. J. and Muench, H. (1938) 'A simple method of estimating fifty percent endpoints', *The American Journal of Hygiene*, 27, pp. 493–497. Available at: <http://aje.oxfordjournals.org/content/27/3/493.full.pdf> (Accessed: 3 March 2015).
- Reguera, J. *et al.* (2016) 'Comparative Structural and Functional Analysis of Bunyavirus and Arenavirus Cap-Snatching Endonucleases', *PLoS Pathogens*, 12(6), pp. 1–24. doi: 10.1371/journal.ppat.1005636.
- Reguera, J., Weber, F. and Cusack, S. (2010) 'Bunyaviridae RNA polymerases (L-protein) have an N-terminal, influenza-like endonuclease domain, essential for viral cap-dependent transcription', *PLoS Pathogens*, 6(9). doi: 10.1371/journal.ppat.1001101.
- Rodrigues, A. H. *et al.* (2011) 'Oropouche virus experimental infection in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*)', *Virus Research*. Elsevier B.V., 155(1), pp. 35–41. doi: 10.1016/j.virusres.2010.08.009.
- Romero-Alvarez, D. and Escobar, L. E. (2018) 'Oropouche fever, an emergent disease from the Americas', *Microbes and Infection*. Elsevier Masson SAS, 20(3), pp. 135–146. doi: 10.1016/j.micinf.2017.11.013.
- da Rosa, J. F. T. *et al.* (2017) 'Oropouche Virus: Clinical, Epidemiological, and Molecular Aspects of a Neglected Orthobunyavirus', *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, (1), pp. 16-0672. doi: 10.4269/ajtmh.16-0672.
- Salanueva, J. *et al.* (2003) 'Polymorphism and Structural Maturation of Bunyamwera Virus in

- Golgi and Post-Golgi Compartments In', 77(2), pp. 1368–1381. doi: 10.1128/JVI.77.2.1368.
- Santos, R. I. *et al.* (2012) 'Experimental infection of suckling mice by subcutaneous inoculation with oropouche virus', *Virus Research*. Elsevier B.V., 170(1–2), pp. 25–33. doi: 10.1016/j.virusres.2012.07.006.
- Santos, R. I. *et al.* (2014) 'Spread of Oropouche Virus into the Central Nervous System in Mouse', *Viruses*, 6, pp. 3827–3836. doi: 10.3390/v6103827.
- Santos, R. I. M. *et al.* (2008) 'Oropouche virus entry into HeLa cells involves clathrin and requires endosomal acidification', *Virus Research*, 138, pp. 139–143. doi: 10.1016/j.virusres.2008.08.016.
- Sanz-Sánchez, L. and Risco, C. (2013) 'Multilamellar Structures and Filament Bundles Are Found on the Cell Surface during Bunyavirus Egress', *PLoS ONE*, 8(6). doi: 10.1371/journal.pone.0065526.
- Senior, R. M. *et al.* (1991) 'Human 92- and 72-kilodalton type IV collagenases are elastases.', *The Journal of biological chemistry*. United States, 266(12), pp. 7870–7875.
- Shi, X. *et al.* (2006) 'Requirement of the N-terminal region of orthobunyavirus nonstructural protein NSm for virus assembly and morphogenesis.', *Journal of virology*, 80(16), pp. 8089–8099. doi: 10.1128/JVI.00579-06.
- Shi, X. *et al.* (2010) 'Visualizing the replication cycle of bunyamwera orthobunyavirus expressing fluorescent protein-tagged Gc glycoprotein.', *Journal of virology*, 84(17), pp. 8460–9. doi: 10.1128/JVI.00902-10.
- Shi, X. *et al.* (2016) 'Bunyamwera orthobunyavirus glycoprotein precursor is processed by cellular signal peptidase and signal peptide peptidase.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(31), pp. 8825–30. doi: 10.1073/pnas.1603364113.
- Shi, X., Lappin, D. F. and Elliott, R. M. (2004) 'Mapping the Golgi targeting and retention signal of Bunyamwera virus glycoproteins.', *Journal of virology*, 78(19), pp. 10793–10802. doi: 10.1128/JVI.78.19.10793-10802.2004.
- Singh, P. and Savithri, H. S. (2015) 'GBNV encoded movement protein (NSm) remodels ER network via C-terminal coiled coil domain', *Virology*. Elsevier, 482, pp. 133–146. doi: 10.1016/j.virol.2015.01.030.
- Smituburn, K. C. and Haddow, A. J. (1943) 'A neurotropic virus isolated from aedes mosquitoes', pp. 189–208.
- Storms, M. M. H. *et al.* (1995) 'The Nonstructural NSm Protein of Tomato Spotted Wilt Virus Induces Tubular Structures in Plant and Insect Cells', *Virology*, 214, pp. 485–493. doi: 10.1006/viro.1995.0059.
- Streitenfeld, H. *et al.* (2003) 'Activation of PKR by Bunyamwera Virus Is Independent of the Viral Interferon Antagonist NSs', *Journal of Virology*, 77(9), pp. 5507–5511. doi: 10.1128/JVI.77.9.5507-5511.2003.
- Szemiel, A. M., Failloux, A.-B. and Elliott, R. M. (2012) 'Role of Bunyamwera Orthobunyavirus NSs Protein in Infection of Mosquito Cells', *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6(9), p. e1823. doi: 10.1371/journal.pntd.0001823.
- Teixeira Nunes, M. R. *et al.* (2005) 'Oropouche virus isolation, Southeast Brazil', *Emerging Infectious Diseases*, 11(10), pp. 1610–1613. doi: 10.3201/eid1110.050464.
- Tilston-Lunel, N. L. *et al.* (2015) 'Generation of recombinant Oropouche orthobunyaviruses

lacking the non-structural proteins NSm or NSs.', *Journal of virology*, 90(5). doi: 10.1128/JVI.02849-15.

Varela, M. *et al.* (2013) 'Schmallenberg Virus Pathogenesis, Tropism and Interaction with the Innate Immune System of the Host', *PLoS Pathogens*, 9(1). doi: 10.1371/journal.ppat.1003133.

Vasconcelos, P. F. *et al.* (1989) 'Primeiro registro de epidemias causadas pelo vírus Oropouche nos estados do Maranhão e Goiás, Brasil.', *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 31(1), pp. 271–278. doi: 10.1590/S0036-46651989000400011.

Wilder-smith, A. *et al.* (2017) 'Epidemic arboviral diseases : priorities for research and public health', *The Lancet Infectious Diseases*. Elsevier Ltd, 17(3), pp. e101–e106. doi: 10.1016/S1473-3099(16)30518-7.

ANEXOS

Anexos

- Comitê de ética animal
- Participação Congresso da American Society for Virology - ASV 2016
- Participação Congresso da American Society for Virology - ASV 2017
- Participação Congresso da American Society for Virology - ASV 2018
- Participação Congresso Brasileiro de Virologia - 2016
- Participação Congresso Brasileiro de Virologia - 2017
- Participação Simpósio BioCel 2016
- Participação Simpósio BioCel 2017