

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

DANIELA MÉRIA RAMOS RODRIGUES

Persistência do Vírus Sincicial Respiratório em modelo animal: o papel de IL-10.

Ribeirão Preto
2023

DANIELA MÉRIA RAMOS RODRIGUES

Persistência do Vírus Sincicial Respiratório em modelo animal: o papel da IL-10

Versão Original

Dissertação apresentada a Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e
Molecular

Área de Concentração: Virologia

Orientador: Prof. Dr. Eurico Arruda

Ribeirão Preto

2023

2

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Rodrigues, Daniela Méria Ramos

**Persistência do Vírus Sincicial Respiratório em modelo animal:
o papel da IL-10.**

Ribeirão Preto, 2023.

32 páginas

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Virologia.

Orientador: Arruda, Eurico de.

**1. Virologia. 2. Persistência 3. Vírus Sincicial Respiratório.
4. Camundongo.**

DANIELA MÉRIA RAMOS RODRIGUES

**Persistência do Vírus Sincicial Respiratório em modelo animal: o papel da
IL-10**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Microbiologia-Virologia

Aprovado em: ____/____/____.

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Dedico esse Trabalho á meu eu de 2019 que, numa maca de hospital, decidiu recomeçar a vida e lutar pelo sonho de fazer ciência no Brasil e ao meu eu de 2021 que deixou sua vida em Salvador para fazer essa pesquisa em Ribeirão Preto.

Agradecimentos

Eu gostaria de agradecer primeiramente aos órgãos financiadores Capes, CNPq e FAPESP (processo nº: 2022/01238-0) que fizeram esse projeto ser possível. Adicionalmente, gostaria de agradecer ao Dr. Ronaldo Bragança Júnior que esteve presente durante todas as etapas do projeto, ao oferecer direcionamento, traçar metas e objetivos, além de sempre estar disponível para conversar sobre assuntos diversos. Preciso agradecer também ao Dr. Juliano de Paula, quem me ajudou com toda a parte do modelo animal, desde pedir animais do biotério a coletar os órgãos da forma correta. Não posso deixar de agradecer ao Prof. Dr. Eurico Arruda que me acolheu em seu laboratório, me permitindo realizar esse projeto e concluir o mestrado.

Agradeço hoje e sempre ao meu pai científico, Prof. Dr. Ricardo Wagner Portela, quem me ensinou tanta coisa sobre métodos, escrita e sobre ser cientista. Ele me inspira a ser uma pessoa que pensa no outro e cresce junto, não às custas dele. O Prof. Ricardo consegue fazer tanto com tão pouco de infraestrutura e verba, além de mesmo não sendo mais meu orientador sempre está disponível para dar conselhos.

Porém a realização do trabalho não seria possível sem as ajudas dos meus amigos virológicos queridos: Gabriela Condé, Thais Melquiades, Brenda Vitti, Matheus Dias, Murilo Cassiano, Maria Vitória, Roger Rodrigues, Rosa Mendes e tantos outros que colocaram a mão na massa, ou que me ajudaram com protocolos e burocracias, muito obrigada! Além deles, a Maria Lúcia Silva, minha Pitiquinha, que sempre esteve disponível para ajudar com a realização de experimentos, dando conselhos e alento. Também devo agradecer às pessoas que me acolheram aqui em Ribeirão Preto, a maioria já citadas, Vitor Caleffo, Alexia Polo e Leticia Bassi, que fizeram eu me sentir em casa.

Por último, tenho que agradecer a todas as pessoas que me ajudaram a estar sã, feliz e forte para poder fazer o mestrado. Dentre essas pessoas, preciso agradecer primeiramente aos meus pais que me deram todo o suporte financeiro, emocional e motivacional para que eu viesse fazer mestrado em outro estado, conseguir me manter e não desistir. Logo em seguida, agradeço a meu amorzão, João Medrado Gondim, que durante uma parte do namoro esteve me dando apoio moral e emocional, mas desde março tem sido quem me faz sair da cama mesmo nos dias mais difíceis e que me movimenta para que eu consiga continuar. A todos os meus amigos de Salvador, Bruna Pravatti, Beatriz Campos, Adalberto, Clara, Júlia, Thiago, Bianca, Fernanda, Amanda, Livia, Isabella, Maria, Caio e outros vários que não consigo citar aqui, por torcerem por mim e sendo verdadeiros fãs, me fizeram tentar ser metade do que eles pensam que sou. Finalmente, agradeço aos profissionais que me ajudaram a manter ou recuperar a sanidade: minha psicóloga, Márcia Tourinho, minha psiquiatra de Salvador, Dra. Ana Clara Barros, meu psiquiatra, Dr. Sérgio Ishara e por último e mais recente, minha professora de Yoga, Karina Azevedo.

Resumo

RODRIGUES, D. M. R. **Persistência do Vírus Sincicial Respiratório em modelo animal: o papel da IL-10**. 2023. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

O vírus sincicial respiratório (RSV) é um dos patógenos de maior importância em saúde infantil, e até os 5 anos de idade, praticamente 100% das crianças já foram infectadas pelo menos uma vez pelo agente. Estudos do nosso grupo de pesquisa detectaram RSV em tonsilas de crianças assintomáticas e em linfonodos de pacientes adultos com hiperplasia linfoide benigna, sugerindo que RSV causa infecção prolongada e/ou persistente. É também conhecida a importância de IL-10 no estabelecimento de infecções virais persistentes. No presente estudo investigamos a persistência de RSV em modelo murino, comparando animais normais e knock out para IL-10. Camundongos C57BL6 wild type e knock out para o gene de IL-10 com 3 a 5 dias de vida foram infectados intranasalmente com 10^4 pfu de RSV num volume de 6,6 μ L. Foram coletados pulmão, rim, cérebro, baço, timo e fígado nos tempos de 7, 15, 40, 80, 120 e 150 dias pós infecção. Encontramos genoma de RSV 150 dias após a infecção no fígado, timo, baço, rim e cérebro nos animais selvagens, mas não nos animais knock out para IL-10. Nestes últimos, aos 15 dias pós infecção não foi detectado vírus. A carga viral diminuiu ao longo do tempo, o que confirma o papel essencial de IL-10 para a persistência. Ambos os grupos, tanto o knock out para IL-10 quanto selvagem, os animais infectados apresentaram dano tecidual compatível com pneumonia e bronquiolite. Além disso, a expressão alterada de IFN γ na fase aguda nos animais sem IL-10 indicam o início da eliminação viral, compatível com a diminuição nas cópias de genoma nesse grupo. Assim, o modelo murino de RSV torna-se útil para estudar mecanismos de persistência de RSV e o papel de IL-10 na infecção prolongada.

Palavras-chave: Virologia, Persistência, Vírus Sincicial Respiratório, Camundongo

Abstract

RODRIGUES, D. M. R. **Persistence of Respiratory Syncytial Virus in an animal model: the role of IL-10**. 2023. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2023.

Respiratory syncytial virus (RSV) is one of the most important pathogens in child health, and by the age of 5, practically 100% of children have already been infected at least once by the agent. Studies from our research group detected RSV in asymptomatic children's tonsils and in lymph nodes from adult patients with benign lymphoid hyperplasia, suggesting that RSV causes prolonged and/or persistent infection. IL-10 is an important molecule in the establishment of persistent viral infections. In the present study we investigated the RSV persistence in a murine model, comparing wild type and knock out of IL-10 animals. C57BL6 wild type and knock out mice aged 3 to 5 days were infected intranasally with 10^4 pfu of RSV in a volume of 6.6 μ L. The Lung, kidney, brain, spleen, thymus and liver were collected at 7, 15, 40, 80, 120 and 150 days post infection. We found RSV genome 150 days after infection in the liver, thymus, spleen, kidney, and brain in wild-type animals, but not in IL-10 knock out animals. In the latter, 15 days after infection no virus was detected. The viral load decreased over time, which confirms the essential role of IL-10 for persistence. In both groups, both IL-10 knock out and wild-type, infected animals showed tissue damage compatible with pneumonia and bronchiolitis. Furthermore, the altered expression of IFN γ in the acute phase in animals without IL-10 indicates the beginning of viral elimination, compatible with the decrease in genome copies found in this group. Thus, the RSV murine model becomes useful for studying mechanisms of RSV persistence and the role of IL-10 in prolonged infection.

Key-words: Virology, Persistence, Respiratory Syncytial Virus, Mice

SUMÁRIO

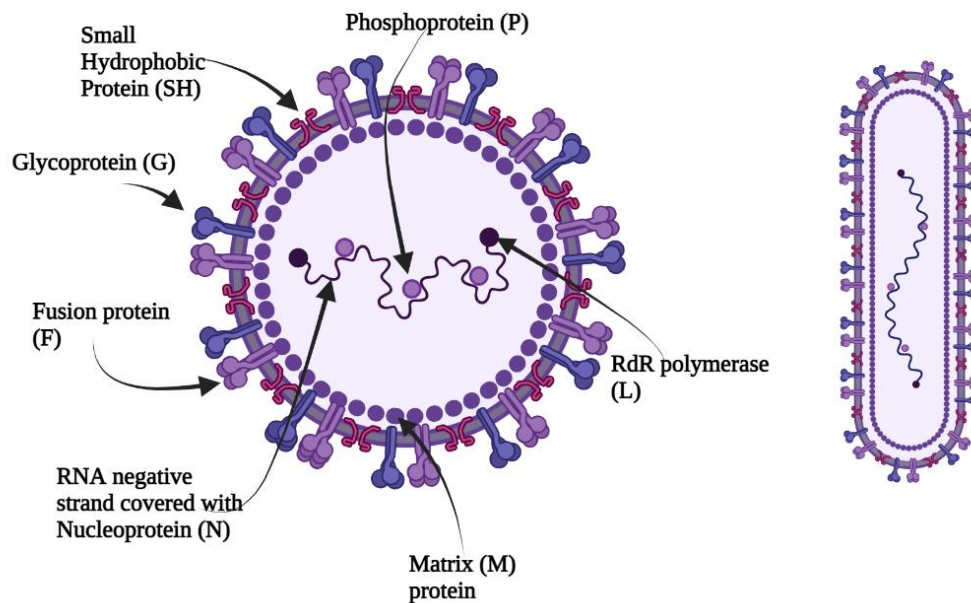
1 INTRODUÇÃO.....	10
2 OBJETIVO GERAL.....	16
2.1 Objetivos específicos.....	16
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1. Modelo animal.....	17
3.2. Vírus e infecção.....	18
3.3. RT-qPCR.....	18
3.4 Coloração de hematoxilina e eosina.....	19
3.5 Análise estatística.....	19
4 RESULTADOS.....	20
4.1. Detecção de genoma de RSV ao longo do tempo pós-infecção.....	20
4.2. Carga viral.....	20
4.3. Avaliação da histologia dos tecidos.....	23
4.5. Expressão de Citocinas.....	25
5 DISCUSSÃO.....	27
6 CONCLUSÕES.....	29
REFERÊNCIAS.....	30
ANEXO.....	32

1- Introdução

O vírus sincicial respiratório (RSV) é um dos agentes patogênicos de maior importância na infância (HAN; TAKEDA; GELFAND, 2011) e estima-se que até os 2 anos de idade 100% das crianças já tiveram infecção por esse vírus (MALINCZAK; LUKACS; FONSECA, 2020). O grupo mais afetado por RSV são crianças de menos de 2 anos de idade (GRIFFITHS; DREWS; MARCHANT, 2017).

Há dois grupos de RSV: A e B, ambos do gênero *Orthopneumovirus*, da família *Pneumoviridae* e da ordem *Mononegavirales* (GRIFFITHS; DREWS; MARCHANT, 2017). O RSV é envelopado, tem como genoma RNA de polaridade negativa, e é visto em duas formas: a forma esférica, com aproximadamente 150nm, e a filamentosa, que pode chegar a poucos micrometros de comprimento (**Figura 1**) (GRIFFITHS; DREWS; MARCHANT, 2017; KNIPE; HOWLEY, 2016). O RSV codifica 11 proteínas estruturais e não estruturais, sendo as proteínas G e F imuno-dominantes (RAGHUNANDAN; HIGGINS; HOSKEN, 2021). O viri3n tem envelope contendo a proteína de fus3o (F), a glicoprote3na (G) e a prote3na hidrof3bica pequena (SH). Abaixo do envelope h3a a prote3na de matriz (M). O genoma 3e recoberto da prote3na N, formando o nucleocaps3deo, ao qual est3o ligadas a fosfoprote3na (P) e a RNA polimerase RNA-dependente (L) (**Figura 1**) (KNIPE; HOWLEY, 2016).

Figura 1: Representa3o esquem3tica da estrutura do V3rus Sincicial Respirat3rio (RSV).



Fonte: Knipe e Howley (2016)

A entrada do RSV na célula é dependente de dois eventos: inicialmente, a proteína G se liga a CXCR1 ou, CX3CL1, anexina ou TLR-4, o que culmina com a ligação da proteína F a nucleolina, TLR4, EGFR, ICAM-1, IGFR-1 ou lectinas do tipo C. Ao se ligar, a proteína F muda de conformação, permitindo a fusão da membrana celular com o envelope viral, gerando o poro de fusão (BERGERON; TRIPP, 2021). RSV infecta principalmente células epiteliais de brônquios e do pulmão (MALINCZAK; LUKACS; FONSECA, 2020), e pode causar infecções graves e até mesmo letais (LAUDANNO; SÁNCHEZ YANOTTI; POLACK, 2020).

HRSV é frequentemente associado, sozinho ou em coinfeções, com doença grave do trato respiratório inferior no Brasil (ARRUDA et al., 2014). Em estudo prévio do nosso grupo, vimos que HRSV foi isolado em cultura de células a partir de 63% de amostras de crianças de menos de 5 anos com atendidas no Hospital das Clínicas por infecção respiratória aguda, e em 74% delas havia coinfeção por pelo menos um vírus adicional (GAGLIARDI et al., 2013).

A ocorrência de HRSV é fortemente sazonal, predominando nos meses mais frios do ano em climas temperados (GRIFFITHS; DREWS; MARCHANT, 2017), o que também é observado no estado de São Paulo (BOTOSSO et al., 2009), e inclusive em regiões mais quentes do norte do estado, como Ribeirão Preto (CINTRA et al., 2001). Um estudo longitudinal de 10 anos realizado no estado de São Paulo entre crianças de menos de 5 anos mostrou que múltiplos genótipos de HRSV A e B co-circulam num mesmo surto sazonal, com substituição de genótipos dominantes em anos consecutivos, com adaptação evolutiva por seleção positiva seguida de reversão em anos subsequentes. Essa adaptação ocorre num padrão filogenético do tipo "flip-flop" em certos códons, refletindo mudanças no estado imune da população e um repertório limitado de aminoácidos possíveis nessas posições (BOTOSSO et al., 2009).

Há poucos dados oficiais sobre a epidemiologia de RSV no Brasil e os dados disponíveis no sistema DATASUS, provavelmente muito subestimados, mostra que foram registradas 4.096 mortes de crianças com menos de 1 ano, e 1635 em pessoas com mais de 60 anos, por bronquiolite aguda por RSV (J21) de 2000 a 2021, foram registradas 4.096 mortes de crianças com menos de um ano e de 1635 pessoas com 60 anos ou mais (Departamento de Informática do SUS, 2023).

O recorte de mortes apresentados na **Figura 2**, mostra como durante o período da pandemia (2020 a 2022) o número de mortes diminuiu comparando com 2018 e 2019. A diminuição de óbitos por bronquiolite de 2019 para 2020 foi de 72%, muito provavelmente pelas medidas de distanciamento social adotadas nesse período, como fechamento de escolas e creches. Já em

2021, as mortes aumentaram 145% em relação a 2020, porém, ainda foram menos que em 2018 e 2019. Já em 2023 até julho, as mortes aumentaram 16,3% das ocorridas no mesmo período de 2018 e 2019. Com base nesses dados, sugere-se que no ano de 2023, devido ao fim por completo das medidas de isolamento o comportamento do vírus se assemelha com o anterior a pandemia. Talvez até um pouco mais grave por razões ainda não investigadas.

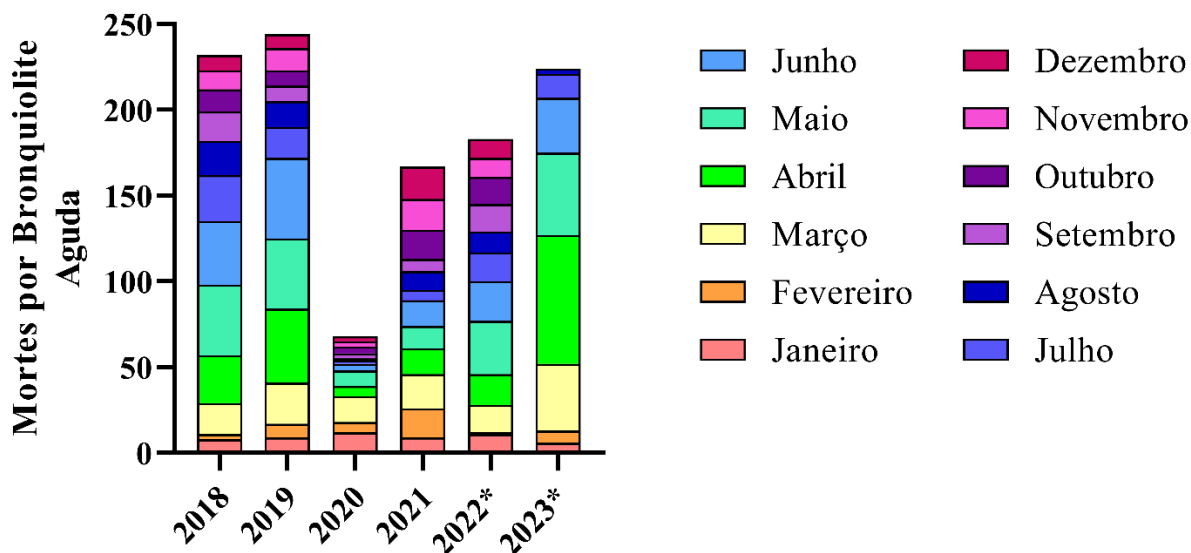


Figura 2. Mortalidade por Bronquiolite Aguda causada por RSV no Brasil em crianças menores que 1 ano de idade através dos meses do ano. Os dados foram retirados do DATASUS (até 2021) e das secretarias estaduais de saúde (de 2022 e 2023) e plotados em gráfico pela autora. Os anos 2022 e 2023 estão marcados com asterisco porque contém apenas os dados dos estados: BA, CE, ES, MT, MG, PB, PR, PE, RJ, RO, RR, SC, SE e SP. Os demais estados não disponibilizam os dados atualizados nas secretarias estaduais de saúde.

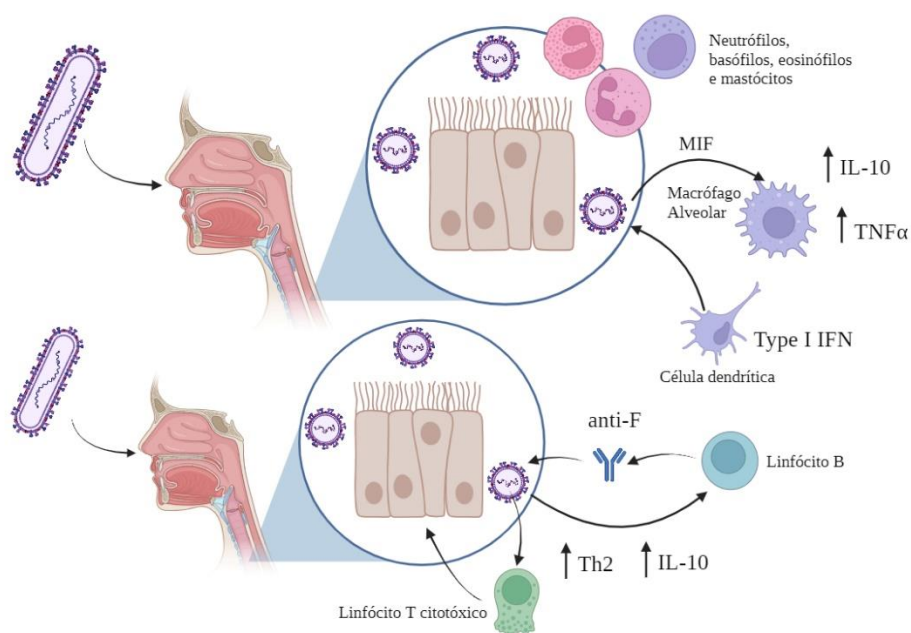
Existe uma imunoterapia passiva para RSV feita com um anticorpo monoclonal humanizado, o Palivizumab, que tem como alvo a glicoproteína F, administrado pela via intramuscular como profilaxia em crianças de grupos de risco, no período sazonal de maior ocorrência do vírus. Incorporado ao SUS em 2012, o Palivizumab reduz o risco de internação em 39% a 78% entre os mais susceptíveis (MINISTÉRIO DA SAÚDE, SECRETARIA DE CIÊNCIA, TECNOLOGIA, 2022).

Em 2023, duas vacinas para o Vírus Sincicial Respiratório com base na glicoproteína F pré-fusão (WALSH et al., 2023) foram aprovadas pelo FDA: a ABRYSSVO (FDA, 2023) desenvolvida pela Pfizer, e a Arexvy (FDA, 2023) pela GlaxoSmithKline Biologicals SA. As duas vacinas têm administração aprovada para indivíduos com 60 anos ou mais, e a da Pfizer também foi aprovada para gestantes com 32 a 36 semanas, como forma de imunizar recém-nascidos. As duas vacinas têm eficácia semelhante: 82,3% para Arexvy e 85,7% para a

ABRYSVO, para pacientes acima de 60 anos de idade. Com relação à eficácia da vacina da Pfizer em prevenir doença em recém-nascidos mediante vacinação materna, houve redução no risco de infecção grave do trato respiratório inferior em 91,1% aos 90 dias, e 76,5% aos 180 dias após o nascimento.

O trabalho de Bergeron e Tripp (2021) traz uma descrição abrangente da resposta imune ao RSV e as informações a seguir foram retiradas dele. A resposta imune inata ao RSV é caracterizada inicialmente pela ação de neutrófilos, eosinófilos, basófilos e mastócitos, e neutrófilos são as células imunes inatas mais encontradas no lavado bronco-alveolar de crianças com bronquiolite grave causada por RSV (SEBINA; PHIPPS, 2020). Este vírus modula a expressão de citocinas por macrófagos alveolares, aumenta a expressão do fator de inibição de migração (MIF), $TNF-\alpha$ e IL-10. Também são importantes as células dendríticas plasmocitoides, que secretam interferon do tipo I durante a infecção (**Figura 3**). Na fase de resposta adaptativa, linfócitos B produzem anticorpos anti-F com boa afinidade e capacidade de neutralização viral, mas o RSV consegue infectar essas células, levando a uma maior gravidade na doença e o aumento na expressão de IL-10 e na resposta do tipo Th2. Linfócitos T citotóxicos têm papel essencial no controle do RSV e na imunopatologia causada por ele, a proteína G do vírus pode ser reconhecida por MHC do tipo I, estimulando a produção de $IFN-\gamma$ e o recrutamento de células T para os pulmões por uma resposta do tipo Th2.

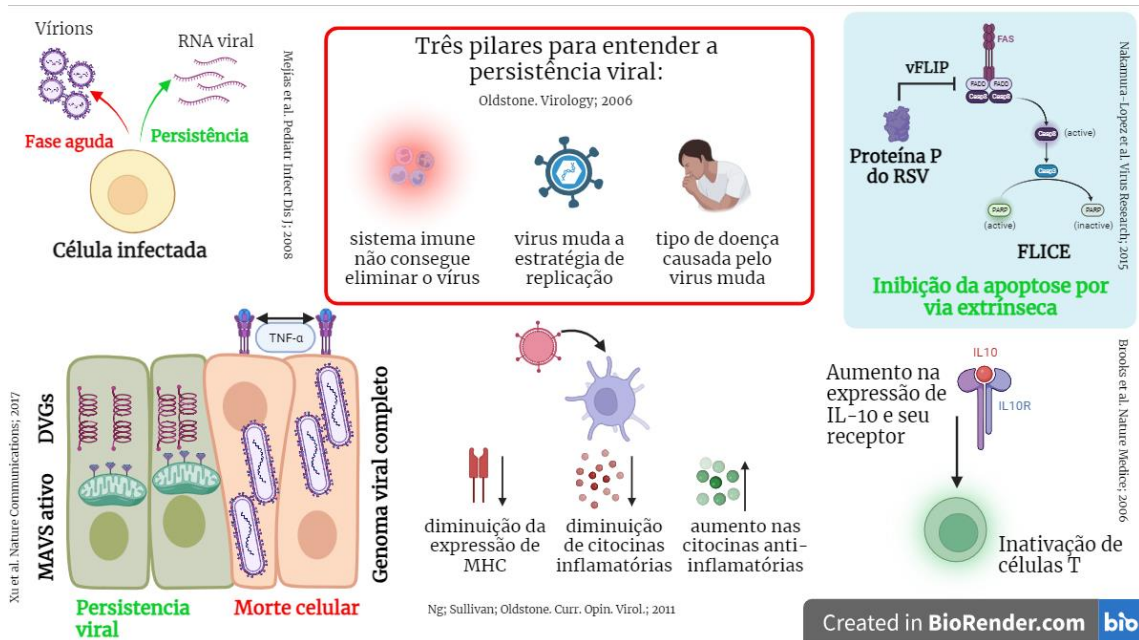
Figura 3: Representação esquemática da resposta imune ao vírus sincicial respiratório. Detalhes no texto. Figura criada utilizando o biorender.com.



A persistência viral se caracteriza pela presença do vírus por muito tempo depois da fase aguda da infecção, o que requer uma relação especial do vírus com a célula e com o hospedeiro. Os pilares nos quais se baseia a persistência são que 1) o sistema imune não consegue eliminar o vírus; 2) a replicação do vírus e sua expressão gênica são diferentes na persistência; e 3) os padrões de doença mudam e podem ser até inesperados (**Figura 4**) (OLDSTONE, 2006). A citocina anti-inflamatória IL-10 e seus receptores estão mais expressos nas células apresentadoras de antígeno nos animais onde o vírus conseguiu persistir, e isso leva a inativação de células T impedindo a eliminação viral (BROOKS et al., 2006). Na persistência viral, o vírus consegue desviar a função de células dendríticas, diminuindo a expressão de moléculas de MHC, reduzindo a apresentação de antígenos e ativação das células T, e de citocinas inflamatórias, ao passo que aumenta a expressão de citocinas anti-inflamatórias (NG; SULLIVAN; OLDSTONE, 2011).

Mejías e colaboradores (2008) definiram em seus estudos que durante a fase aguda da infecção experimental é possível isolar RSV de órgãos e secreções de camundongos, enquanto após esta fase, apenas podemos encontrar RNA viral. Foi também evidenciado que a proteína P do RSV tem capacidade de agir como um inibidor protéico viral da enzima do tipo FADD conversora de interleucina-1 β , impedindo a apoptose pela via extrínseca e, conseqüentemente, a eliminação viral (NAKAMURA-LOPEZ; VILLEGAS-SEPÚLVEDA; GÓMEZ, 2015). Há também um componente bastante conhecido da estratégia de persistência que são os Genomas Virais Defectivos (DVGs), que mais recentemente vêm sendo chamados “genomas virais não padrão”. O estudo de Xu e colaboradores (2017) mostrou que células com alta concentração de DVGs conseguem ativar a sinalização mitocondrial antiviral (MAVS), em contraste com as células com alta concentração de genomas virais completos, nas quais o TNF- α protegida apoptose.. Assim, vários estudos propõem mecanismos pelos quais os vírus conseguem persistir.

Figura 4: Conceitos e evidências de persistência viral. Na imagem, os dados são retirados de diferentes artigos científicos sobre persistência de vírus em geral e de RSV. Detalhes no texto. Imagem criada utilizando o biorender.com.



Fonte: Brooks et al., (2006); Mejías et al., (2008); Nakamura-López et al., (2011); Ng; Sullivan e Oldstone, (2011); Oldstone, (2006); Xu et al., (2017b)

2- Objetivo Geral

O nosso objetivo geral é estudar a infecção experimental persistente por HRSV em camundongos na ausência de IL-10.

2.1. Objetivos Específicos

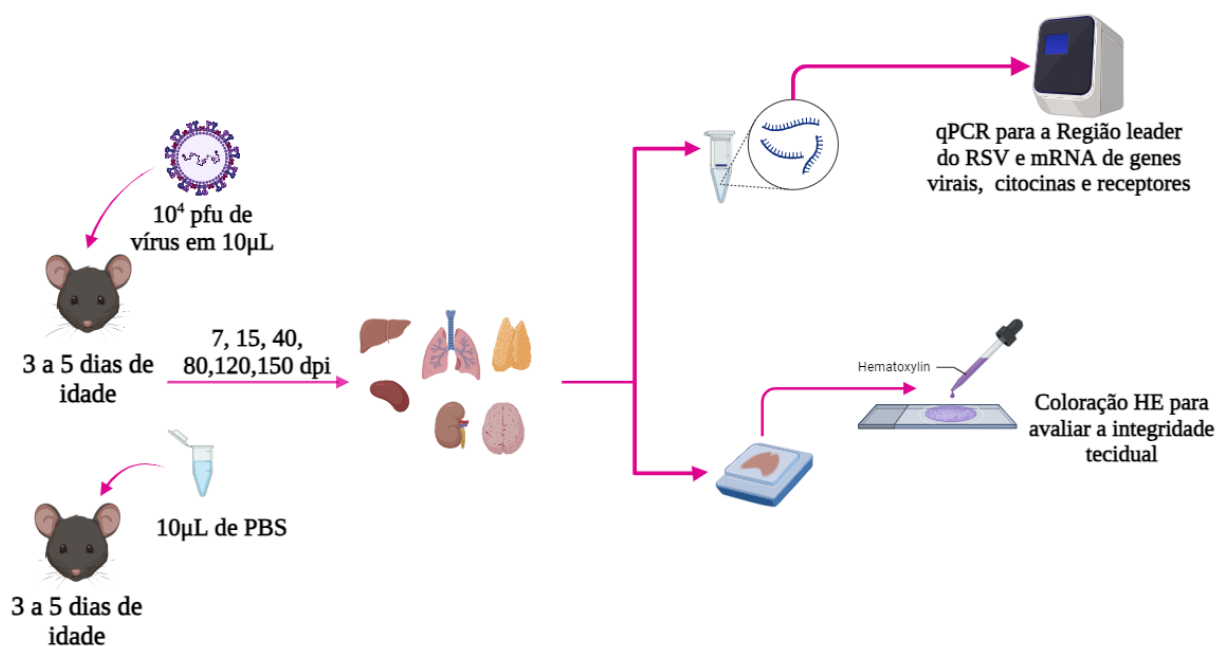
- Detectar RSV (genoma e proteína) em tecidos e secreções de animais wild type e knockout para IL-10, experimentalmente infectados, aos 7, 15, 40, 80, 120 e 150 dias pós infecção;
- Quantificar IL-10 (mRNA) nos tecidos dos animais com infecção persistente;
- Quantificar a expressão de citocinas (mRNA) nos animais infectados e não infectados e avaliar se há aumento de alguma delas nos animais infectados com e sem IL-10;
- Avaliar integridade do tecido pulmonar de camundongos wild type e knockout infectados por RSV.

3 – Material e Métodos

3.1. Modelo animal

Camundongos do tipo C57Bl6 neonatos (3 a 5 dias de idade) utilizados nesse trabalho foram comprados no Biotério Geral da USP de Ribeirão Preto e os camundongos knockout para a IL-10 adultos foram comprados do Centro de Criação de Camundongos Especiais da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Esse trabalho teve autorização do Comitê de Ética no Uso de Animais com número: 1038/2022R.1 (anexo). Camundongos neonatos (3 a 5 dias de idade) foram infectados pela via intranasal com 6,6 μ L de inóculo diluído em PBS. O grupo mock foi inoculado com diluição de meio de cultura de células não-infectadas em PBS. Os animais foram mantidos em caixas com maravalha, ração e água à vontade em rack ventilado, e as caixas eram trocadas 2 vezes na semana. Após os tempos de 7, 15, 40, 80, 120 e 150 dias pós-infecção, 4 animais infectados com RSV e 1 que recebeu inóculo mock foram anestesiados com excesso de anestésico (Quetamina e Xilazina) para eutanásia. Com o coração ainda batendo, 1 mL de PBS foi injetado no ventrículo esquerdo para perfundir o animal. Após esse processo, o pulmão, fígado, baço, timo, rins e cérebro foram coletados. Uma parte de cada órgão foi transferida para um tubo contendo Trizol e beads de metal, e a outra para um tubo contendo paraformaldeído a 4%.

Figura 5: Representação esquemática dos métodos. Figura elaborada no biorender.com.



3.2. Vírus e infecção

O RSV utilizado foi a cepa Long e o estoque foi propagado em células Hep-2. A titulação obtida por ensaio de formação de placas de lise em Hep-2 e Vero CCL81. Para as infecções, o estoque foi diluído para chegar à concentração de 10^4 pfu por inoculação.

3.3. RT-qPCR

Para a realização de PCR em tempo real, um pequeno pedaço de tecido foi macerado em Trizol com uma bead metálica no Tissue Lyser (QIAGEN) por 10 minutos na velocidade de 50 oscilações por segundo. A amostra macerada no Trizol foi usada para extração de RNA de acordo com a recomendação do fabricante. A amostra foi eluída em água ultrapura, quantificada em Nanodrop e usada para a reação de transcrição reversa na concentração de no máximo 1000ng de RNA por 10 μ L de amostra. As amostras passaram por duas reações de transcriptase reversa diferentes: Uma com primers específicos para a região leader do genoma do RSV e outra com Random primers, a fim de aumentar a detecção do vírus em amostras positivas e diminuir reações inespecíficas. Após a normalização da concentração, 2 μ L de primer foi adicionado a cada tubo e as amostras passaram pelo Hot Start (5 minutos a 95°C). Depois do hot start, as amostras foram tiradas do termociclador direto para o gelo e foi adicionado o mix contendo a enzima RT Applied Biosystems, o tampão e os dNTPs, e devolvidas ao termociclador para a ciclagem de 25°C a 10 minutos, 37°C a 120 minutos e por último 85°C a 5 minutos. Ao final, as amostras foram armazenadas em freezer -20°C. A enzima utilizada na PCR em tempo real foi a Sybr Green e os primers estão listados na **Tabela 1**. O cDNA foi diluído numa proporção 1:20 para ser utilizado na reação. O mix foi preparado de acordo com a recomendação do fabricante e a reação foi feita em One Step Plus da Applied Biosystems. A reação teve a seguinte ciclagem: 95°C por 2 minutos, 40 ciclos de 5 segundos a 95°C e 30 segundos a 60°C, 15 segundos a 95°C e por último a curva de melting. A RT-qPCR foi utilizada para medir níveis de expressão de citocinas ao comparar aos níveis de expressão do gene endógeno β actina utilizando o Ct da PCR. Para calcular a carga viral, foi utilizado um cDNA de estoque viral titulado que foi diluído de forma seriada e adicionado na reação, foi inserido no programa StepOne quantas partículas virais foram adicionadas no primeiro ponto da curva e o cálculo da quantidade de genoma por cada amostra foi feito ao final da reação estar completa. Para confirmar que o amplificou na reação era realmente genoma viral, a temperatura de melting de cada amostra foi comparada com a temperatura do controle positivo.

Tabela 1: Sequências dos Oligonucleotídeos utilizados como Primers.

Alvo	Sequência foward	Sequência reverse
IFN γ	GAGGAACTGGCAAAGGATGGT	CGCTTATGTTGTTGCTGATGGC
IL-10	GCAGGACTTTAAGGGTACTTGGG	GATTTCTGGGCCATGCTTCTC
β actina	AGCTTCTTTGCAGCTCCTTCG	CATCCATGGCGAACTGGTG

3.4 Coloração de hematoxilina e eosina

Para coloração por hematoxilina e eosina, as lâminas foram levadas à estufa por 30 minutos ou mais para derreter a parafina, depois foram desparafinizadas no xilol em 3 passagens de 4 minutos. Posteriormente, as lâminas foram hidratadas em série decrescente de concentração de álcool por 2 minutos cada, depois passaram por lavagem em água corrente. Após isso, as lâminas foram coradas em Hematoxilina de Harris por 3 minutos, lavadas em água da torneira e diferenciadas em álcool ácido, com troca da solução 4 vezes. Depois as lâminas foram lavadas, azuladas em água amoniacal por 5 minutos, lavadas novamente, passar álcool 80% 3 ou 5 vezes na cubeta, corar na solução de Eosina-Floxina por 3 minutos, retirar o excesso de corante em álcool 70%, desidratar em álcool e diafanizar com xilol. Por últimos as lâminas foram secadas e montadas com lamínula e Entellan™.

3.5 Análise estatística

Os dados foram tratados no excel, para fazer cálculos de $\Delta\Delta CT$ e consequente fold-change e, posteriormente, foram passados para o GraphPad Prism 8 para cálculos estatísticos e plotagem dos dados.

4 Resultados

4.1. Detecção de genoma de RSV ao longo do tempo pós-infecção

Houve detecção do RSV por RT-qPCR nos diferentes órgãos dos animais do tipo selvagem (WT) e no knock out para IL-10 (KO). Na fase aguda da infecção (7 e 15 dias pós infecção) 100% dos animais WT tiveram RNA do vírus detectado no pulmão. Nos animais KO para IL-10 também houve detecção do vírus no pulmão na fase aguda, mas em menores frequências do que nos WT. Assim, podemos constatar que o modelo de infecção aguda por RSV funcionou. Após 15 dias, não foi possível detectar vírus em nenhum órgão dos animais KO para IL-10. Isso contrasta com os animais WT, nos quais foi possível detectar vírus até 150 dias, que foi o último tempo de coleta. Tanto nos animais WT quanto KO para IL-10, foi observado que a infecção por RSV foi sistêmica, já que foi encontrado vírus no timo, fígado, baço, rim e cérebro.

Tabela 2: Positividade para RNA de RSV no camundongos WT e KO para IL-10 ao longo do tempo. As percentagens se referem a N=4. Os dados dos animais WT foram parte da Tese de Bruna Laís de Jesus, 2019.

Dias pós infecção	Pulmão		Timo		Fígado		Baço		Rim		Cérebro	
	WT	KO	WT	KO	WT	KO	WT	KO	WT	KO	WT	KO
7	100%	50%	50%	0%	25%	25%	25%	25%	0%	0%	0%	50%
15	100%	25%	25%	25%	0%	25%	50%	0%	0%	25%	0%	50%
40	0%	0%	25%	0%	25%	0%	25%	0%	100%	0%	25%	0%
80	50%	0%	25%	0%	0%	0%	25%	0%	50%	0%	50%	0%
120	0%	0%	25%	0%	25%	0%	25%	0%	50%	0%	50%	0%
150	0%	0%	25%	0%	50%	0%	75%	0%	50%	0%	25%	0%

4.2. Carga viral

A carga viral nos pulmões foi de cerca de 10^5 genomas por 1000 ng de RNA, mostrando que o modelo funciona, e tanto os animais WT quanto os KO para IL-10 são susceptíveis à infecção pelo vírus. As cargas virais nos pulmões dos animais WT e KO para IL-10 não diferiram entre si nos dias 7 e 15 pós-infecção (**Figura 6A**), sugerindo que a carga viral no pulmão não sofre influência de IL-10. Também no cérebro (**Figura 6B**) não houve diferença de cargas entre animais WT e KO para IL-10, mas com valor mais baixo, próximo a 10^4 genomas por 1000 ng de RNA.

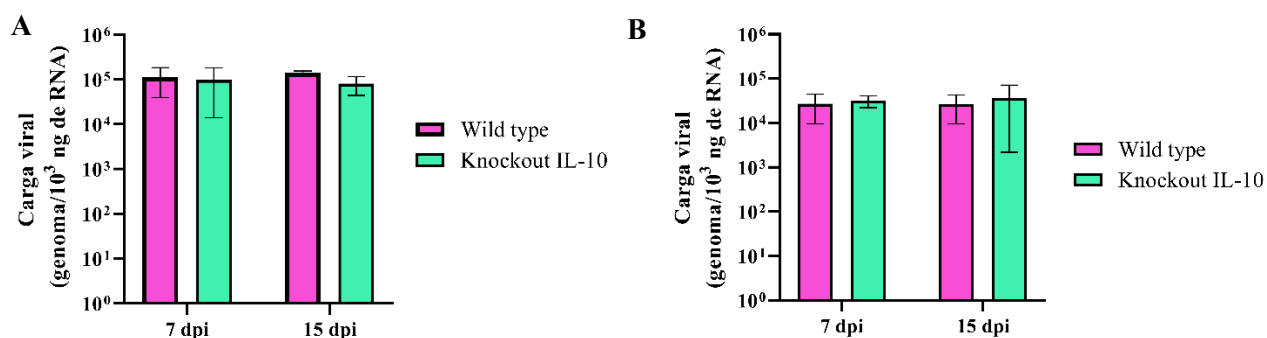


Figura 6: Carga de RSV no pulmão e cérebro dos animais nos tempos de 7 e 15 dias pós- infecção. A: Carga viral no Pulmão. B: Carga Viral no Cérebro. A carga viral está representada como cópias de genoma por 1000 ng de RNA.

A infecção do baço, um órgão linfóide secundário, indica fortemente que a infecção aguda é sistêmica (**Figura 7**). Pode-se observar que aos 7 dias pós-infecção a carga viral nos animais KO para IL-10 foi maior em quase 1 log, porém diminuiu significativamente já no tempo de 15 dias pós-infecção. Esse dado indica que em 8 dias o animal sem IL-10 já está eliminando o vírus do organismo, enquanto o animal com IL-10 não apresenta diminuição significativa da carga viral no Baço.

Já com relação à carga viral nos tempos mais tardios (**Figura 8**), o órgão com maior carga no tempo de 80 dias pós-infecção foi o baço, com aproximadamente $10^{2,5}$ genomas virais por 1000 ng de RNA. A carga viral menor em relação à fase aguda é compatível com a hipótese de persistência viral. Viu-se diminuição significativa da carga de 80 para 150 dias, mas é importante destacar que mesmo tanto tempo pós-infecção foi detectada carga viral no rim, fígado, timo e cérebro, embora em níveis diferentes entre órgãos. Outro ponto importante (**Figura 8**) é a variação na carga de 80 para 150 dpi no timo e cérebro, mostrando que mesmo em baixo nível, o vírus ainda mantém seu genoma nos tecidos do animal.

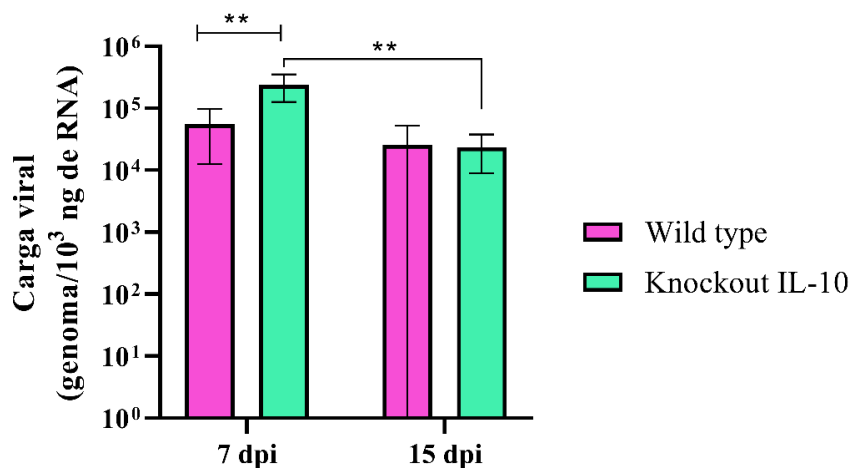


Figura 7: Carga de RSV no baço dos animais nos tempos de 7 e 15 dias pós-infecção. A carga viral está representada como cópias de genoma por 1000 ng de RNA. “***” significa $p < 0,0065$.

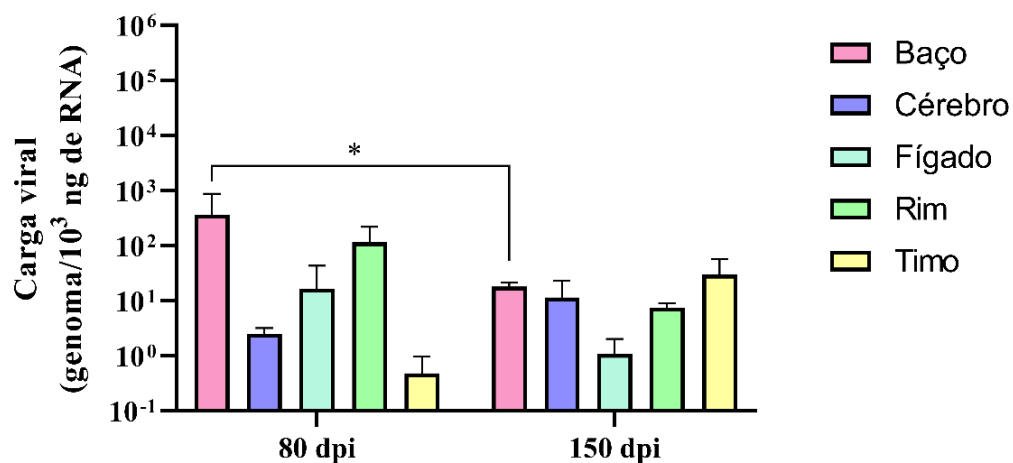


Figura 8: Carga de RSV nos diferentes órgãos de animais WT nos tempos de 80 e 150 dias pós-infecção. A carga viral está representada como cópias de genomas por 1000 ng de RNA. * $p = 0,0244$.

Ao comparar a carga viral no baço ao longo do tempo, observa-se redução significativa, compatível com a hipótese da persistência (**Figura 9**), de aproximadamente 10^5 genomas por 1000 ng de RNA aos 7 dias para 10 genomas por 1000 ng de RNA aos 150 dias pós-infecção.

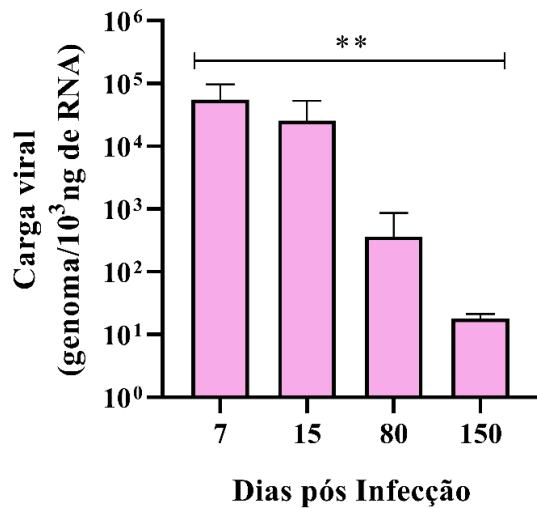


Figura 9: Carga de RSV no baço ao longo do tempo pós-infecção. A carga viral está representada como cópias de genoma por 1000 ng de RNA. **p = 0,0066.

4.3. Avaliação da histologia dos tecidos

Ao avaliar os tecidos dos pulmões de animais ao 7 dias pós-infecção foi visto espessamento septal periférico e consolidação pulmonar com uma intensidade de 1 nos animais WT (**Figura 11**) em comparação com o animal não infectado (**Figura 10**). O pulmão do animal KO para IL-10 não infectado (**Figura 12**) apresenta discreto espessamento septal quando comparado ao do animal WT não infectado, mas de menor intensidade do que no pulmão do animal KO para IL-10 infectado (**Figura 13**).

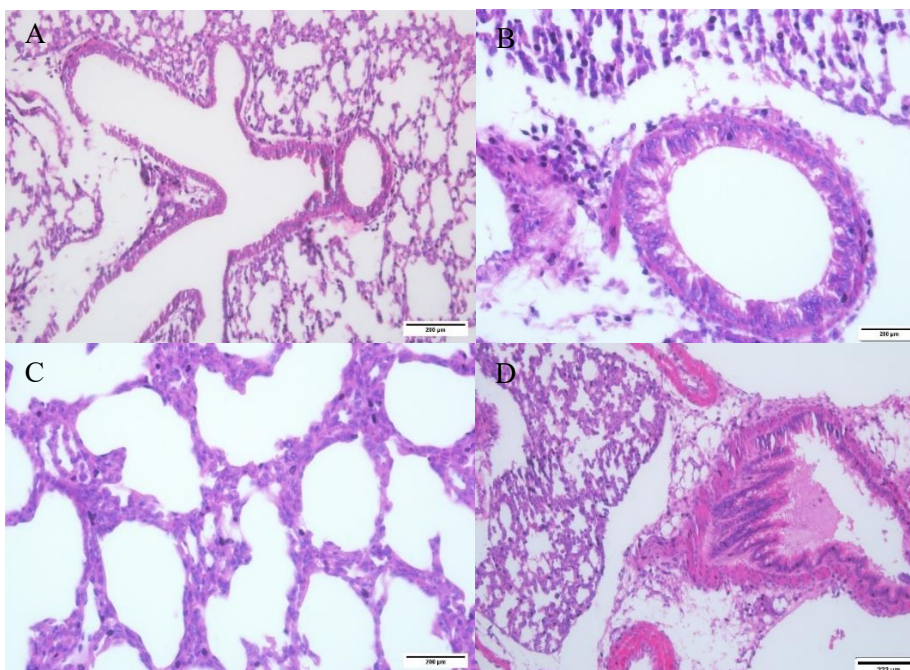


Figura 10: Cortes de tecido pulmonar de camundongos selvagens não infectados corados com HE. A- via aérea com bronquilo respiratório, B- via aérea menor normal, C – alvéolo, D- bronquíolo primário.

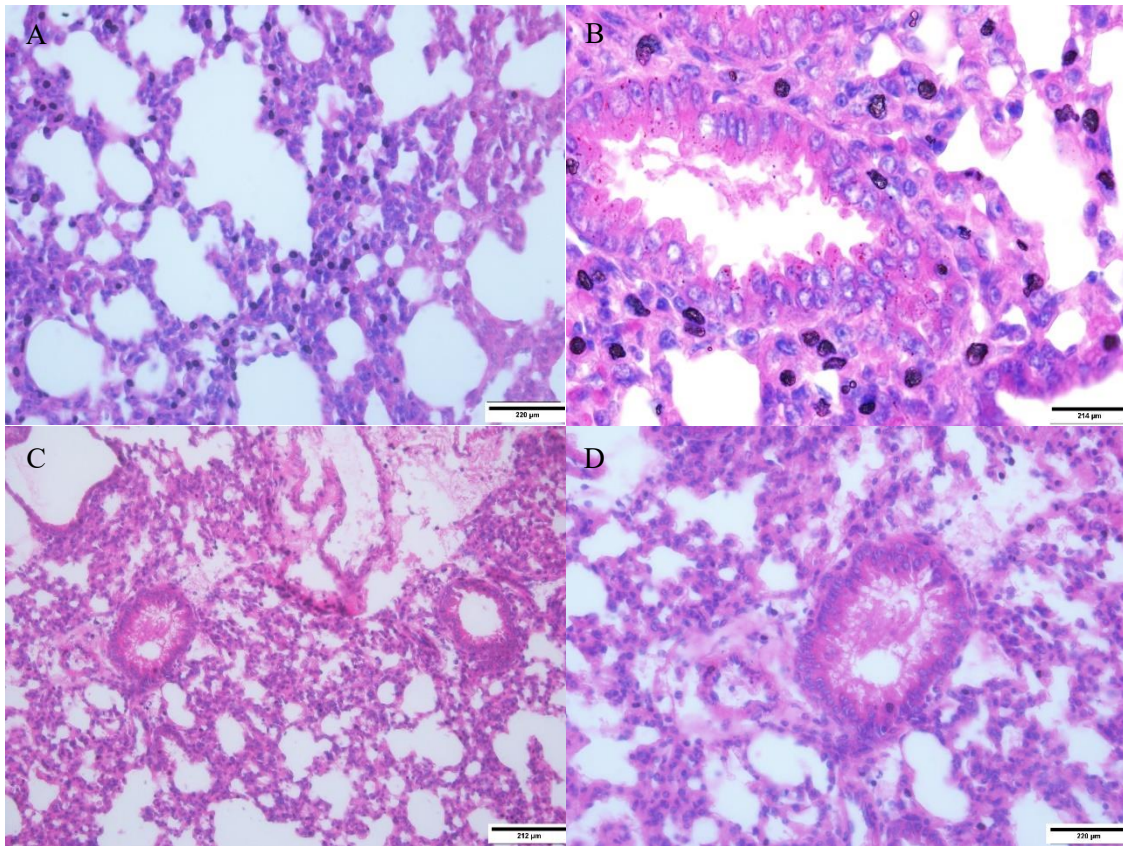


Figura 11: Cortes de tecido pulmonar de camungondos selvagens infectados com RSV. A- dutos alveolares com espessamento septal, **B-** bronquíolo respiratório, **C-** bronquíolo com infiltrado espumoso e eosinofílico e ao seu lado uma artéria bronquial **D** – visão aproximada de C.

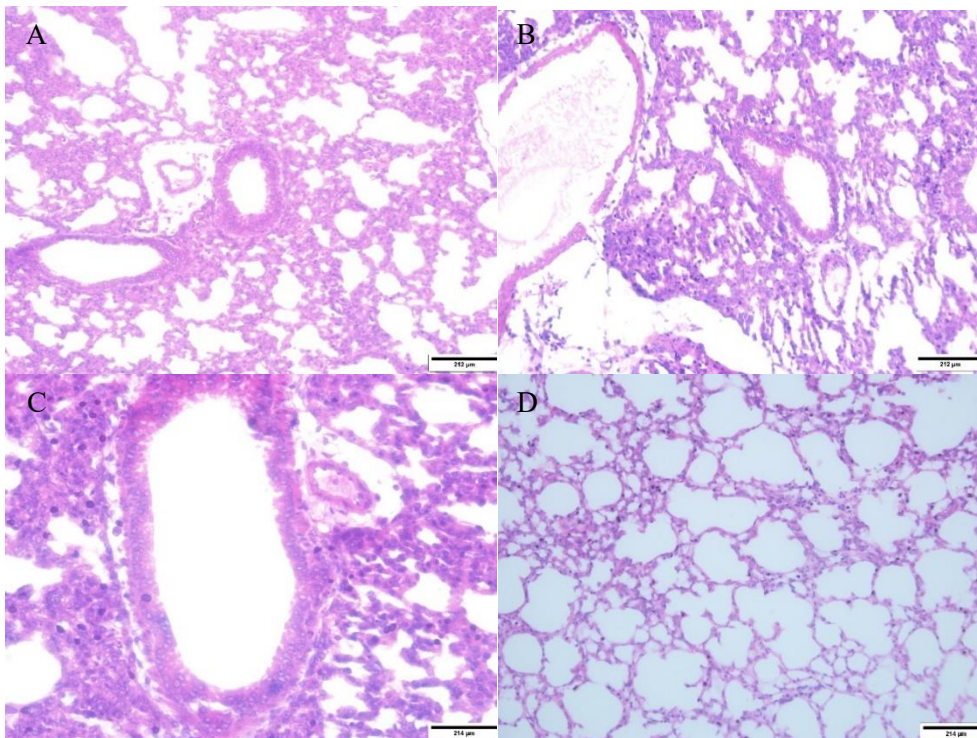


Figura 12: Cortes de tecido pulmonar de camungondos knock out para IL-10 não infectados. A- bronquíolos e dutos alveolares, **B-** via aérea, bronquíolo e alveolos, **C** – bronquíolo e artéria bronquial, **D-** dutos alveolares.

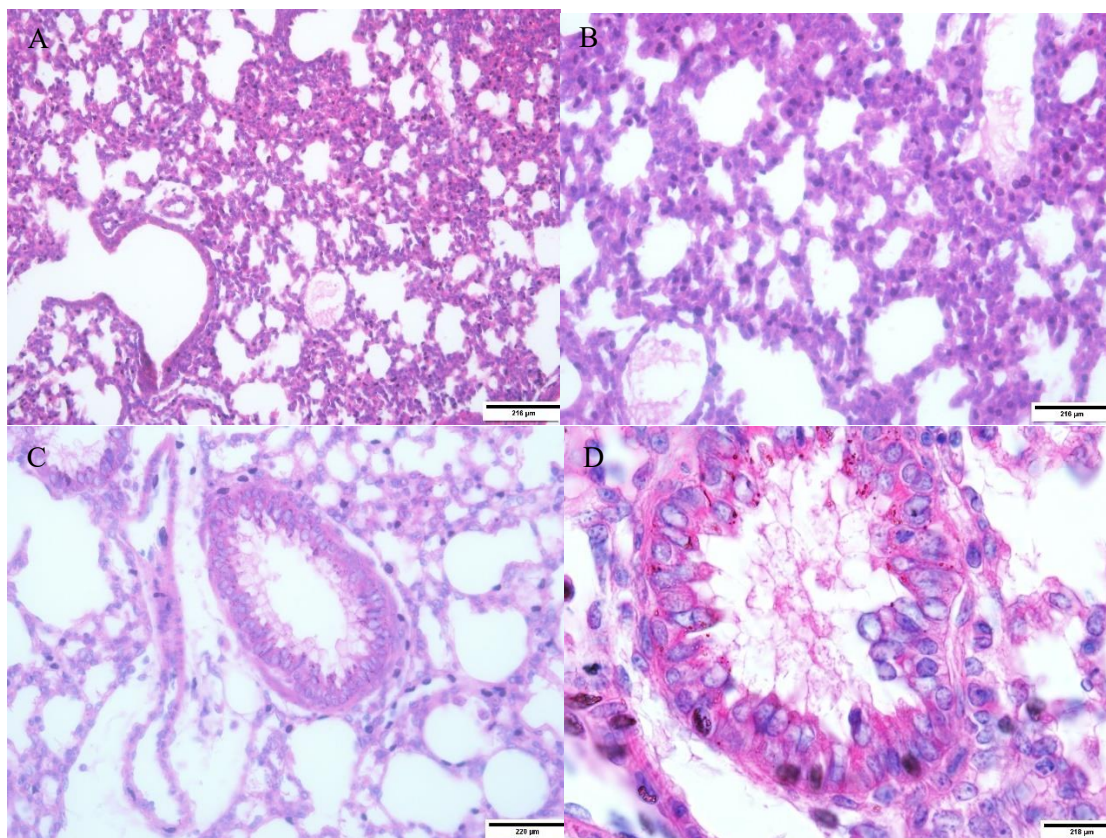


Figura 13: Cortes de tecido pulmonar de camungondos knock out para IL-10 infectados com RSV. A- alvéolos apresentando dano alveolar difuso, via aérea com presença de macrófagos e infiltrado eosinofílico, B- maior aumento em A, C – bronquíolo respiratório associado a alveolos, D- Maior aumento em um bronquíolo com infiltrado eosinofílico.

4.5. Expressão de Citocinas

A expressão de IFN- γ aos 15 dias pós-infecção estava quase 10 vezes maior no pulmão do animal sem IL-10 com relação ao WT (**Figura 14**). No cérebro houve aumento dessa expressão, mas em menor escala. Esses resultados sugerem que o aumento da expressão de IFN- γ estava ligado à eliminação viral nos animais sem IL-10.

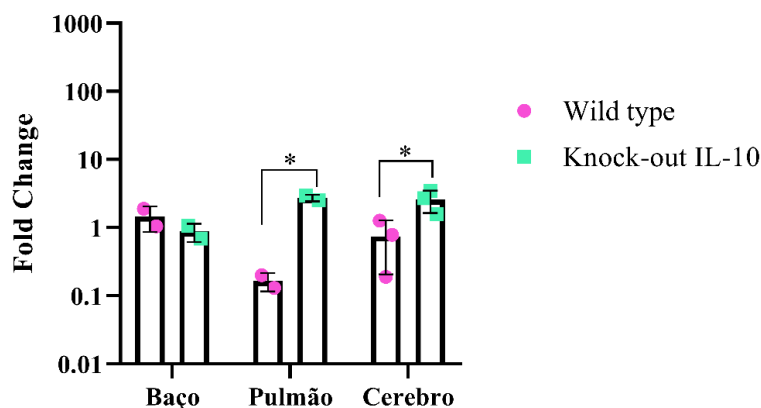


Figura 14: Expressão de interferon- γ aos 15 dias pós-infecção nos animais WT e KO para IL-10. Os dados apresentados foram calculados a partir do Ct da RT-qPCR. O gene endógeno utilizado foi o de β actina. * $p < 0,0432$.

A expressão de interferon- γ no timo dos camundongos C67Bl/6 WT infectados (**Figura 15**) mostrou-se 100 vezes maior que nos animais não infectados no tempo de 80 dpi, e diminuiu de forma significativa aos 150 dpi. Observamos também que aos 150 dias pós-infecção a expressão de interferon- γ no fígado dos animais infectados tendeu a um aumento de quase 10 vezes em relação a expressão dos não infectados.

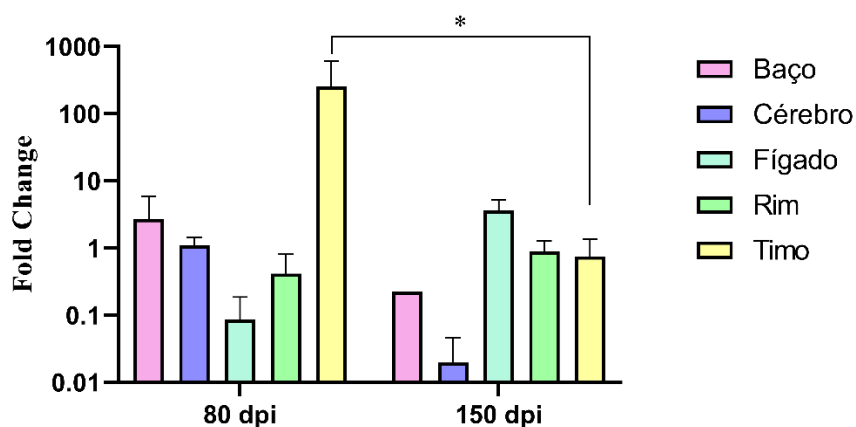


Figura 15: Expressão de interferon- γ nos animais WT infectados com relação aos animais não infectados nos tempos de 80 e 150 dias pós infecção. Os dados apresentados foram calculados a partir do Ct da RT-qPCR. O gene endógeno utilizado foi o de β actina. * $p = 0,0447$.

Observamos que no timo aos 80 dias pós-infecção a expressão de IL-10 foi mais de 1000 vezes maior nos animais infectados (**Figura 16**). IL-10 também estava aumentada no fígado e no rim nesse mesmo tempo. Aos 150 dias pós-infecção houve forte redução na expressão de IL-10 no timo.

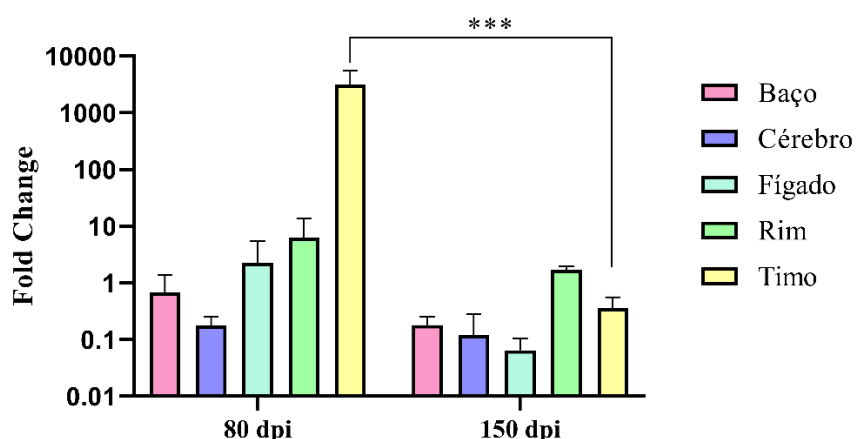


Figura 16: Expressão de IL-10 nos animais WT infectados com relação aos animais não infectados nos tempos de 80 e 150 dias pós-infecção. Os dados apresentados foram calculados a partir do Ct da RT-qPCR. O gene endógeno utilizado foi o de β actina. *** $p = 0,0005$.

5- Discussão

O presente estudo reitera observações prévias feitas por grupos de pesquisa, inclusive o nosso, sobre a susceptibilidade de camundongos C57/Bl6 à infecção intranasal por RSV, com o desenvolvimento de alterações histopatológicas pulmonares agudas, e acúmulo de carga viral (ESTRIPEAUT et al., 2008; JESUS, B.L.S., 2019). Além disso, dados obtidos com este modelo experimental mostram que a infecção aguda por RSV pela via intranasal não se restringe ao trato respiratório, mas tem caráter sistêmico, uma observação importante no contexto de persistência, pois na fase aguda o vírus atinge diferentes órgãos e tecidos nos quais poderá persistir.

Em estudo anterior do nosso grupo, mostramos que RSV causa infecção persistente em camundongos C57Bl/6, inclusive com detecção de RNA e antígenos virais em diferentes órgãos (JESUS, B.L.S., 2019). Dando continuidade àquela investigação sobre a infecção persistente, o presente estudo mostra de modo inequívoco que o estabelecimento de infecção prolongada por RSV depende de IL-10, pois o vírus não persistiu em animais knockout para IL-10. Este resultado corrobora estudo prévio feito com outro vírus por Brooks e colaboradores (2006), que trabalharam com o arnavírus da coriomeningite linfocitária (LCMV). O LCMV, que tem camundongo como hospedeiro natural, é um arnavírus e, portanto, tem mecanismo de replicação muito diferente de RSV. O estudo de Brooks e colaboradores (2006) foi feito no grupo de Michael Oldstone, no Scripps Research Institute, e mostrou que a infecção persistente por LCMV reagudizou quando a IL-10 foi neutralizada. Portanto, o presente estudo expande o papel de IL-10 na manutenção de infecção experimental persistente por RSV, sugerindo que os mecanismos subjacentes a este efeito podem ser comuns a infecções por diferentes vírus. O achado de RNA viral até 150 dias após a infecção aguda em órgãos como fígado, rim, cérebro, e especialmente nos órgãos linfoides timo e baço, mesmo na ausência de detecção de RNA de RSV nos pulmões, indica fortemente o caráter sistêmico da persistência. Este achado abre campo para investigação de situações em que possa haver reagudização ou recrudescência da infecção, como por exemplo em situações de imunossupressão, seja ela iatrogênica ou não.

IL-10 é uma citocina predominantemente anti-inflamatória, produzida por linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ nas vias áreas de camundongos experimentalmente infectados com RSV, e modula a inflamação aguda nesses animais, especialmente durante a fase de recuperação da doença pulmonar aguda (LOEBBERMANN et al., 2012). É importante que, no presente estudo, não houve diferença muito importante nas cargas virais na fase aguda entre animais WT e KO para IL-10, em diversos órgãos, indicando que a presença de IL-10 não afeta diretamente a produção de progênie viral. Esta observação corrobora observações de Loebbermann e colaboradores (2012) sobre carga viral nos pulmões aos 4 dias pós-infecção.

Com relação à carga tecidual de RSV em tempos mais tardios, foi marcante a redução de 4 log₁₀ no baço entre os dias 7 e 150 pós-infecção, mostrando que a persistência viral se dá em vigência de baixa produção de progênie, como esperado em infecções virais prolongadas ou persistentes (OLDSTONE, 2006).

Em estudo feito com outro vírus, o meta-pneumovírus humano (HMPV), cuja estratégia de replicação é semelhante à de RSV, Alvarez e colaboradores (2004) relataram a presença de

HMPV nos pulmões até 180 dias pós-infecção, mas não em rins e cérebro em nenhum tempo. Um estudo mais antigo relatou a presença de proteína e RNA de RSV nos pulmões até 60 dias pós infecção, em modelo experimental diferente do nosso, feito em cobaia (HEGELE et al., 1994).

No presente estudo, foi observada inflamação nos pulmões infectados, mas ficou evidente o significativo aumento de mRNA de interferon gama em pulmões e cérebro aos 15 dias da inoculação, nos animais knockout para IL-10 em comparação com os animais WT, como esperado, confirmando relato de Loebberman e colaboradores (1012).

Importantemente, houve aumento na expressão de mRNA de interferon gama mesmo 80 dias após a infecção, com redução para níveis normais 150 dias pós-infecção. Com a relação à expressão de citocinas nos tempos mais tardios da infecção, observamos no fígado um aumento na expressão de interferon gama, o que pode ser normal em indivíduos em idade avançada (SINGH et al., 2011), que inclusive leva à regeneração tecidual (HORRAS; LAMB; MITCHELL, 2011).

Observamos um aumento na expressão de mRNA de IL-10 no timo e no baço, o que pode decorrer da produção de o aumento es órgãos tem um aumento decorrente das suas populações celulares, já que linfócitos T e B podem responder a RSV com produção de IL-10 (LAUBRETON et al., 2020). No caso do timo, a expressão maior de IL-10 e interferon gama pode se dever também à atrofia tímica, um mecanismo utilizado por diversos vírus, como o sarampo, para reduzir a resposta imune (LUO et al., 2021).

O presente estudo mostra que a infecção experimental prolongada de camundongo por RSV é dependente de IL-10, não acontecendo em animais knock out para esta citocina, um resultado que fortemente ressoa dados da literatura, que podem ser epitomizados nos estudos do grupo de Oldstone e colaboradores (2006).

6- Conclusões

Com base nos nossos dados e em estudos publicados, concluimos que o vírus sincicial respiratório persiste no organismo de forma sistêmica após infecção experimental, por mecanismos dependentes de IL-10, e possivelmente envolvendo persistência no timo.

8- Referências

- ARRUDA, E. et al. The burden of single virus and viral coinfections on severe lower respiratory tract infections among preterm infants a prospective birth cohort study in Brazil. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 33, n. 10, p. 997–1003, 2014.
- BERGERON, H. C.; TRIPP, R. A. Immunopathology of rsv: An updated review. **Viruses**, v. 13, n. 12, 2021.
- BOTOSO, V. F. et al. Positive selection results in frequent reversible amino acid replacements in the G protein gene of human respiratory syncytial virus. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 1, 2009.
- BROOKS, D. G. et al. Interleukin-10 determines viral clearance or persistence in vivo. **Nature Medicine**, v. 12, n. 11, p. 1301–1309, 2006.
- CINTRA, O. A. L. et al. Occurrence and severity of infections caused by subgroup A and B respiratory syncytial virus in children in Southeast Brazil. **Journal of Medical Virology**, v. 65, n. 2, p. 408–412, 2001.
- DATASUS. **Departamento de Informática do SUS - Ministério da Saúde**. 2023
- DE JESUS, B. L. S. **Infecção de linfonodos humanos por vírus sincicial respiratório**. 2019. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.
- ESTRIPEAUT, D. et al. Respiratory syncytial virus persistence in the lungs correlates with airway hyperreactivity in the mouse model. **Journal of Infectious Diseases**, v. 198, n. 10, p. 1435–1443, 2008.
- GAGLIARDI, T. B. et al. Concurrent detection of other respiratory viruses in children shedding viable human respiratory syncytial virus. **Journal of Medical Virology**, v. 85, n. 10, p. 1852–1859, 2013.
- GRIFFITHS, C.; DREWS, S. J.; MARCHANT, D. J. Respiratory syncytial virus: Infection, detection, and new options for prevention and treatment. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 30, n. 1, p. 277–319, 2017.
- HAN, J.; TAKEDA, K.; GELFAND, E. W. The role of RSV infection in asthma initiation and progression: Findings in a mouse model. **Pulmonary Medicine**, v. 2011, 2011.
- KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. Respiratory Syncytial Virus and Metapneumovirus. In: **Fields Virology, 6th edition**. [s.l: s.n.]. p. 1602–1646.
- LAUBRETON, D. et al. Regulatory B lymphocytes colonize the respiratory tract of neonatal mice and modulate immune responses of alveolar macrophages to RSV infection in IL-10-dependant manner. **Viruses**, v. 12, n. 8, p. 1–17, 2020.
- LAUDANNO, S. L.; SÁNCHEZ YANOTTI, C. I.; POLACK, F. P. RSV Lower Respiratory Tract Illness in Infants of Low- and Middle-income Countries. **Acta medica academica**, v. 49, n. 2, p. 191–197, 2020.
- LOEBBERMANN, J. et al. IL-10 Regulates Viral Lung Immunopathology during Acute Respiratory Syncytial Virus Infection in Mice. **PLoS ONE**, v. 7, n. 2, 2012.
- LUO, M. et al. Infection-Associated Thymic Atrophy. **Frontiers in Immunology**, v. 12, n.

May, p. 1–21, 2021.

MALINCZAK, C.-A.; LUKACS, N. W.; FONSECA, W. Early-Life Respiratory Syncytial Virus Infection, Trained Immunity and Subsequent Pulmonary Diseases. **Viruses**, v. 12, n. 505, p. 297–315, 2020.

MEJÍAS, A. et al. Respiratory syncytial virus persistence: Evidence in the mouse model. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 27, n. SUPPL. 10, p. 60–62, 2008.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, SECRETARIA DE CIÊNCIA, TECNOLOGIA, I. E I. E. EM S. **Uso do anticorpo monoclonal Palivizumabe durante a sazonalidade do Vírus Sincicial Respiratório - VSR [recurso eletrônico].** [s.l.: s.n.].

NAKAMURA-LÓPEZ, Y. et al. Intrinsic apoptotic pathway is subverted in mouse macrophages persistently infected by RSV. **Virus Research**, v. 158, n. 1–2, p. 98–107, 2011.

NAKAMURA-LOPEZ, Y.; VILLEGAS-SEPÚLVEDA, N.; GÓMEZ, B. RSV P-protein impairs extrinsic apoptosis pathway in a macrophage-like cell line persistently infected with respiratory syncytial virus. **Virus Research**, v. 204, p. 82–87, 2015.

NG, C. T.; SULLIVAN, B. M.; OLDSTONE, M. B. The role of dendritic cells in viral persistence. **Current Opinion in Virology**, v. 1, n. 3, p. 160–166, 2011.

OLDSTONE, M. B. A. Viral persistence: Parameters, mechanisms and future predictions. **Virology**, v. 344, n. 1, p. 111–118, 2006.

RAGHUNANDAN, R.; HIGGINS, D.; HOSKEN, N. RSV neutralization assays – Use in immune response assessment. **Vaccine**, v. 39, n. 33, p. 4591–4597, 2021.

SEBINA, I.; PHIPPS, S. The contribution of neutrophils to the pathogenesis of RSV bronchiolitis. **Viruses**, v. 12, n. 8, 2020.

WALSH, E. E. et al. Efficacy and Safety of a Bivalent RSV Prefusion F Vaccine in Older Adults. **New England Journal of Medicine**, v. 388, n. 16, p. 1465–1477, 2023.

XU, J. et al. Replication defective viral genomes exploit a cellular pro-survival mechanism to establish paramyxovirus persistence. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, 2017a.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto



São Paulo, 28 de Março de 2022

Ilmo(a)
Dr(a). Eurico de Arruda Neto

Certificamos que a proposta intitulada "**Persistência de vírus sincicial respiratório em modelo experimental**", registrada com o nº **1038/2022R1**, sob a responsabilidade de **Eurico de Arruda Neto** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do/a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, em reunião realizada em 28 de Março de 2022.

Vigência da Autorização: 18/04/2022 a 18/04/2024						
Finalidade	Pesquisa					
Espécie	Linhagem	Idade	Peso	Quantidade		
				M	F	M+F
Camundongo	C57Bl6	3 dias	2.0 g	40	40	80
Camundongo	C57Bl6	42 dias	25.0 g	0	10	10
Origem: biotério - Instalação Animal da Prefeitura da USP do Campus de Ribeirão Preto				TOTAL		90

Vigência da Autorização: 18/04/2022 a 18/04/2024						
Finalidade	Pesquisa					
Espécie	Linhagem	Idade	Peso	Quantidade		
				M	F	M+F
Camundongo Knockout	KO IL-10	3 dias	2.0 g	40	40	80
Camundongo Knockout	KO IL-10	42 dias	25.0 g	0	10	10
Origem: biotério - Centro de Criação de Camundongos Especiais				TOTAL		90

Atenciosamente,

Prof. Dr. Luiz Carlos Carvalho Navegantes
Coordenador/a da Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa

Prof. Dr. Alceu Afonso Jordão Junior
Vice-Cordenador/a da Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa