

Papel de IRF5 em células dendríticas para a infecção do vírus Mayaro em modelo murino

Palavras-Chave: Virologia, imunologia

Autores(as):

Bruno Brito Pereira da Silva, IB– UNICAMP

Prof. Dr. José Luiz Proença Módena (orientador), IB– UNICAMP

INTRODUÇÃO: O agravamento das mudanças climáticas e alterações ambientais intensificaram o contato de populações humanas com novos patógenos. No Brasil, as infecções por vírus transmitidos por artrópodes (arbovírus) representam um sério problema de saúde pública, e a dispersão de alguns desses arbovírus oriundos da Amazônia, como o vírus Mayaro (MAYV), é motivo de preocupação. O MAYV é membro da família *Togaviridae* que causa uma doença febril artritogênica semelhante à febre do Chikungunya. O controle da infecção por esses vírus é geralmente dependente da produção de interferon do tipo I e de outros componentes da imunidade inata, sendo que células dendríticas (DCs) e macrófagos (MOs) possuem, na maioria das vezes, um papel preponderante para a restrição ou patogênese associada a essas infecções. Dentre os componentes da resposta imune inata, o fator de transcrição IRF5 é considerado essencial para a resposta de diferentes células imunes, incluindo DCs e MO. Assim, o objetivo deste estudo é avaliar o perfil de replicação de MAYV em camundongos deficientes de *Irf5* em células CD11c⁺. Nesta primeira etapa do estudo foi verificado que animais nocautes condicionais CD11c-Cre⁺*Irf5*^{fl/fl} são suscetíveis à infecção acompanhados de alta carga viral em diversos tecidos, incluindo no sistema nervoso central, e indicam que MAYV pode se replicar cronicamente nesses animais.

METODOLOGIA:

ANIMAIS

Os animais foram obtidos a partir da Jackson; eles são animais transgênicos que apresentam uma enzima recombinante Cre que cliva em células específicas que apresentem a porção LOXP em alguma região do genoma que queira se nocautear

PCR

Para o procedimento de PCR de genotipagem dos animais C57BL/6 CD11c-Cre⁺ *Irf5*^{fl/fl} resultantes dos cruzamentos fêmeas C57BL/6 CD11c-Cre⁺ *Irf5*^{fl/fl} com machos C57BL/6 CD11c-Cre⁺ *Irf5*^{fl/fl}; fez-se necessário coletar tecido cartilaginoso da orelha dos animais para que fosse possível fazer a extração do material genético.

A extração ocorreu colocando 75ul de Tris-HCl por 15 minutos no termociclador e em seguida colocando 75ul de EDTA NaOH.

O mix de PCR para a genotipagem dos animais CD11c-Cre⁺ *Irf5*^{fl/fl} foi realizada usando kit da sinapse S1104 e com os primers:

IRF5 ^{fl/fl}	F: CGT GTA GCA CTC CAT GCT CT R: AGG GCC TGT CCA GAA TTA GG
-----------------------	--

Cre ⁺	F: CGA TGC AAC GAG TGA TGA GG R: GCA TTG CTG TCA CTT GGT CGT
------------------	---

No kit utilizamos a enzima Platus Taq DNA polymerase (Synapse) na seguinte condição de ciclagem: 1 ciclo de 95°C por 5 minutos, seguido de 35 ciclos das temperaturas 95°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, finalizando com 1 ciclo de 72°C por 10 minutos. O produto dessa reação de PCR foi submetido a uma eletroforese em gel de agarose à 2%, e as bandas foram observadas em fotodocumentador. O padrão de bandas esperadas foram: uma banda de 450 pb para *Irf5^{fl/fl}*, uma banda de 450 pb e uma de 269 pb para *Irf5^{fl/wt}*, uma banda de 269 pb para *Irf5^{w/wt}*, uma banda de 300 pb para *Cre⁺*, e ausência de banda para *Cre⁻* (Figura 1).



Figura 1: Padrões de bandas observadas para a genotipagem de camundongos CD11c-Cre⁻ Irf5^{fl/fl} por PCR convencional. Marcador de 100 pb (coluna 1, gel superior e inferior), detecção de Cre recombinase em 300 pb (colunas 2-11, gel superior), detecção de *Irf5^{fl/fl}* em 450 pb (colunas 12-14, gel superior, e colunas 3-5, gel inferior); controle negativo da PCR (coluna 2, gel inferior).

Infecção dos Animais

Os animais foram infectados com vírus da febre do Mayaro com título de 10^6 PFU/ml na região plantar da pata esquerda; eles foram acompanhados por um período de 42 dias e depois por 21 dias para realização da cinética viral.

Coleta dos tecidos e análise da carga viral

Os animais que passaram pelo experimento tiveram aprovação do CEUA em outubro de 2022 número 6120-1/2022. Os órgãos coletados foram: baço, fígado, rim, medula espinhal, cérebro, sangue, pata esquerda, coração, pulmão e linfonodo inguinal.

Esses órgãos foram armazenados em criotubos contendo bids de zircônio com meio DMEM ou MEM; esses órgãos foram macerados e acondicionados em biofreezer com temperatura de -80 °C até a titulação e/ou a realização de PCR real time das amostras.

TITULAÇÃO VIRAL

Foram feitas placas de 24 poços contendo 4×10^5 células/ml; cada poço contém 0,5ml de células. As células utilizadas são as vero CCL81.

As placas com as células foram incubadas em atmosfera contendo CO₂ a 5% (overnight) para a formação de uma monocamada de células; essas placas tiveram em seguida a adição de meio 270ul de DMEM zero.

Em duplicata fez-se a adição nos primeiros poços 30ul de tecido macerado e a diluição seriada desse volume; após uma hora de adsorção adicionou-se CMC completo 0,75% em seguida acondicionou-se as placas em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂; por 36 horas.

A revelação se deu após o período de 36 horas retirando o CMC e adicionou-se PFA(Paraformoldeído 8%) por 40 min e corou-se com azul de metileno.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Suscetibilidade dos animais CD11c-Cre+ Irf5^{fl/fl}: Nossos resultados mostraram que a expressão de *Irf5* em DCs é essencial para o controle da infecção de MAYV em camundongos. A deleção desse gene em células CD11c⁺ tornaram os animais parcialmente vulneráveis à infecção. Dos 18 camundongos CD11c-Cre+ Irf5^{fl/fl} infectados com MAYV, 5 deles (27,7%) mostraram ataxia e sucumbiram à infecção entre 6 e 11 dpi, acompanhados de manutenção do peso inicial (Figura 2).

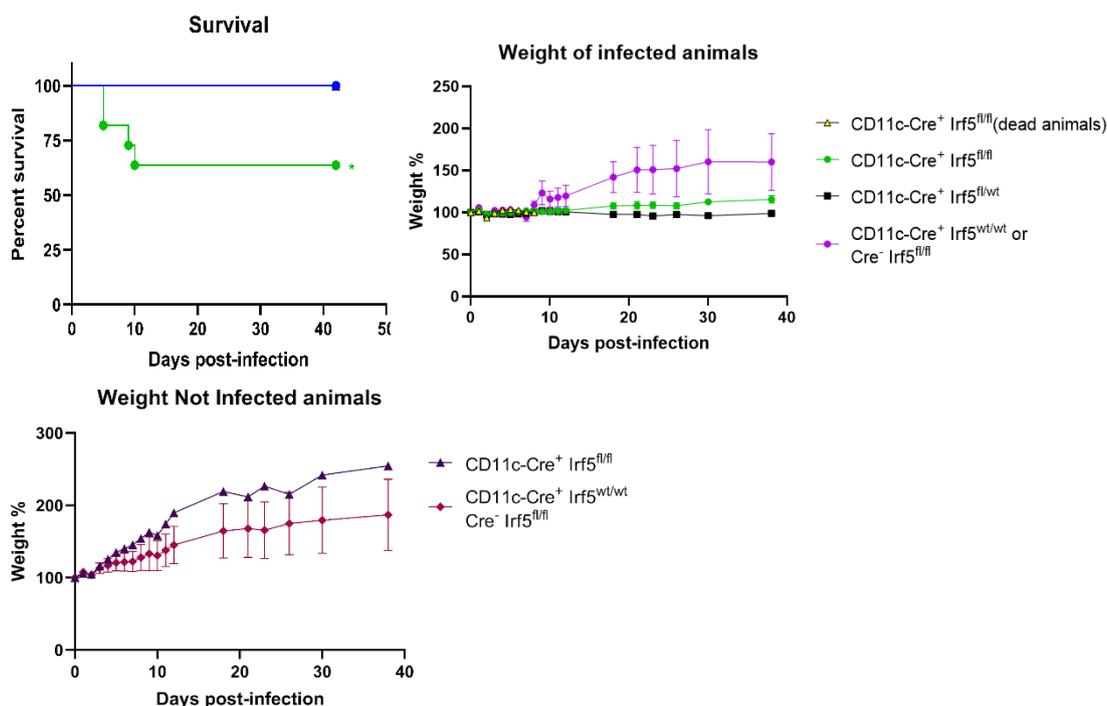


Figura 2. Camundongos CD11c-Cre+ Irf5^{fl/fl} são parcialmente suscetíveis à infecção por MAYV. Mortalidade e peso dos animais infectados e não infectados com MAYV. Símbolos representam eventos de morte ou média de peso ± erro padrão. Foram encontradas diferenças estatísticas pelo teste log-rank seguido de correção Bonferroni das curvas de sobrevivência * p value < 0,05. Também não foi encontrada diferença estatística pelo teste ANOVA das médias de peso diárias.

MAYV causa uma infecção disseminada em animais CD11c-Cre+ Irf5^{fl/fl} suscetíveis: A titulação de vírus viável nos animais CD11c-Cre+ Irf5^{fl/fl} infectados e que sucumbiram à infecção mostrou altos títulos virais em diferentes sítios de coleta, incluindo a pata, fígado, baço, cérebro e medula espinal (Figura 3).

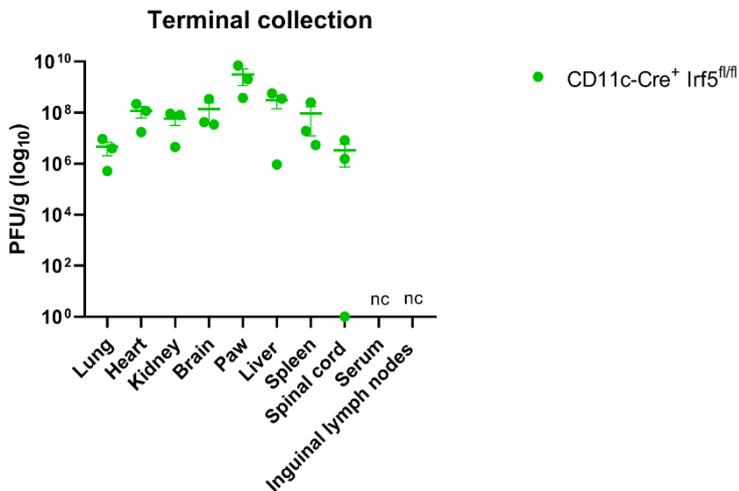


Figura 3. Suscetibilidade de animais CD11c-Cre+ Irf5^{fl/fl} é acompanhada de elevada carga viral disseminada. Ensaio de titulação por formação de placa de lise de amostras de animais CD11c-Cre+ Irf5^{fl/fl} suscetíveis na coleta terminal. Símbolos representam carga viral de animais individuais, e linhas representam média ± erro padrão. nc = não coletado.

Animais infectados desenvolvem artrite crônica: Para avaliar a presença de artrite nos animais infectados e não infectados, medimos diariamente o comprimento e largura da pata inoculada indicando seu inchaço [1]. Os animais infectados tiveram um aumento expressivo do tamanho da pata na fase aguda da doença em até 10 dpi. A área da pata dos animais CD11c-Cre+ Irf5^{fl/fl} infectados permaneceu maior até 30 dpi (Figura 4). Ainda que não tenhamos observado diferenças significativas entre o inchaço dos animais mutantes homocigotos, heterocigotos e WT até o momento, é indicativo de que o inchaço permanece em animais infectados (Figura 4), indicando que a deleção de Irf5 em DCs pode afetar o desenvolvimento e manutenção da cronicidade da doença nesses animais.

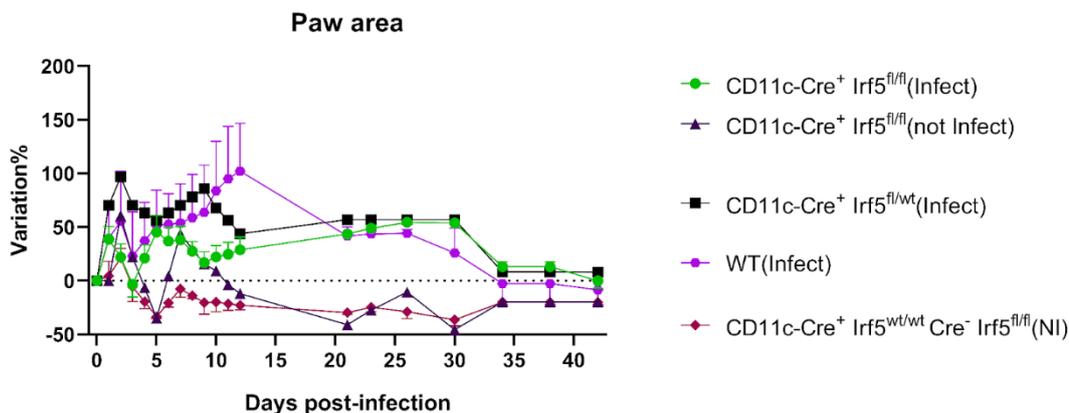
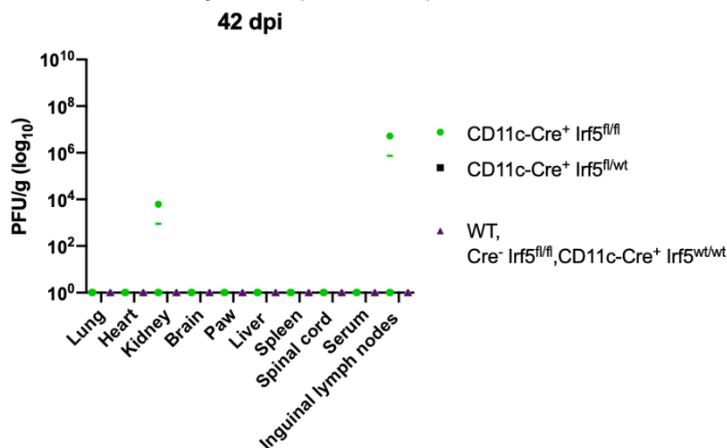


Figura 4: Mensuração do inchaço da pata inoculada dos animais infectados e não infectados com MAYV. Produto das medidas de comprimento e largura da pata inoculada de animais mutantes homocigotos, heterocigotos e WT durante a infecção de MAYV. Símbolos representam média de inchaço ± erro padrão. Não foi possível avaliar diferença estatística pelo teste de Kruskal-Wallis.

Parte dos animais CD11c-Cre+ Irf5^{fl/fl} desenvolvem uma infecção crônica por MAYV: Por fim, para avaliar a capacidade do MAYV persistir nos animais infectados, avaliamos a carga viral tecidos no dia 42 de infecção. Curiosamente, parte dos animais (20%) CD11c-Cre+ Irf5^{fl/fl} apresentaram vírus viável detectável em alguns tecidos, como linfonodos e rins (Figura 5), Embora não tenhamos encontrado diferença estatística entre a carga viral dos

animais no 42 dpi, fica claro a indicação de que MAYV pode estabelecer uma infecção crônica quando o gene *Irf5*



é deletado de DCs.

Figura 5. Carga viral viável em 42 dpi de camundongos CD11c-Cre- IRF5^{fl/fl} infectados. Ensaio de titulação por formação de placa de lise de amostras de animais CD11c-Cre⁺ Irf5^{fl/fl} resistentes na coleta do dia 42 dpi. Símbolos representam carga viral de animais individuais, e linhas representam média. Não foi possível avaliar diferença estatística pelo teste de Kruskal-Wallis na carga viral de 42 dpi.

BIBLIOGRAFIA

1-FUMAGALLI, M. J. et al. Chikungunya Virus Exposure Partially Cross-Protects against Mayaro Virus Infection in Mice. **Journal of Virology**, v. 95, n. 23, 9 nov. 2021.

2-Figueiredo CM, Neris RL da S, Gavino-Leopoldino D, da Silva MOL, Almeida JS, dos-Santos JS, et al. Mayaro Virus Replication Restriction and Induction of Muscular Inflammation in Mice Are Dependent on Age, Type-I Interferon Response, and Adaptive Immunity. **Front Microbiol**. 2019;10.