



Construção de um sistema retroviral para validação do papel de genes estimulados por interferon (ISGs) na infecção viral pelo vírus Oropouche (OROV)

Palavras-Chave: Vírus Oropouche, Retrovirus, Interferons

Autores/as:

Caroline Silveira Falleiros Silva, IB, LABORATORIA DE VIROLOGIA E BIOTECNOLOGIA APLICADA, UNICAMP

Supervisora: Dra. Soledad Palameta Miller, IB, LABORATORIA DE VIROLOGIA E BIOTECNOLOGIA APLICADA, UNICAMP

Prof^ª. Dra. Clarice Weis Arns, IB, LABORATORIA DE VIROLOGIA E BIOTECNOLOGIA APLICADA, UNICAMP

RESUMO CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNICAMP

INTRODUÇÃO

O vírus Oropouche (OROV), é um arbovírus, pertencente à família *Peribunyaviridae* e ao gênero *Orthobunyavirus*. OROV é um vírus com característica neurotrópica que causa febres debilitantes, além de sintomas como: calafrio, cefaléia, mialgia, artralgia, prostração irradiação cutânea e em alguns casos podem apresentar sinais e sintomas de meningite asséptica.

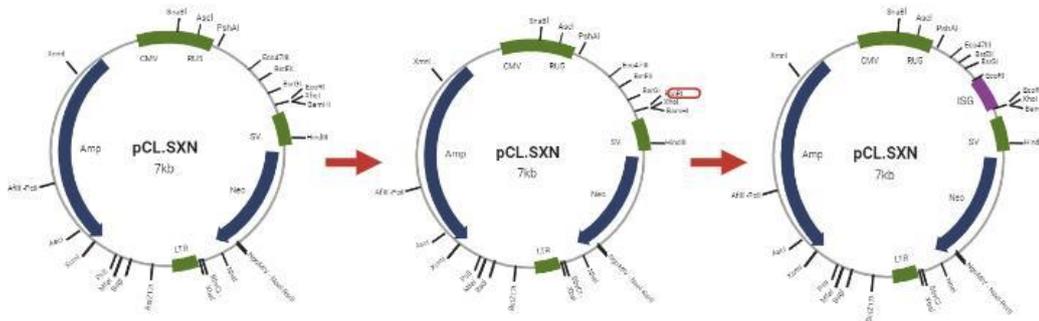
O sistema de interferon é um componente crítico do sistema imunológico inato, que fornece a primeira linha de defesa contra infecções virais. Os interferons (IFNs) são um grupo de proteínas sinalizadoras que são liberadas por células infectadas em resposta a infecções virais e podem induzir um estado antiviral nas células não infectadas vizinhas para impedir a propagação do vírus. Além disso, induzem a expressão de genes estimulados por interferon (ISGs), os quais, codificam proteínas antivirais com diferentes funções, incluindo inibição da replicação viral, indução de apoptose em células infectadas e ativação de células imunes. Neste sentido, um trabalho do nosso grupo investigou o papel de 12 ISGs (IFIT1, IFITM1, IFIT2, IFITM2, IFIT3, IFITM3, IFIT5, ADAR, IRF1, LY6E, ISG20 e BST2) para o controle da infecção por OROV em células humanas. Para tal fim, uma biblioteca de vetores lentivirais foi utilizada para superexpressar ISGs em linhagens de células humanas e avaliar por citometria de fluxo através de um gene repórter os graus de infecção do vírus. Os resultados indicaram que os genes IFITM1, Ly6E, BST2 e ADAR poderiam ter uma ação antiviral durante a infecção pelo OROV. No entanto, os dados precisam ser validados utilizando um outro sistema que permita apenas a superexpressão de ISGs candidatos sem o uso de um gene repórter.

Para tal fim, o projeto de Iniciação científica teve como objetivo a construção de um vetor e o estabelecimento de células que superexpressam os ISGs candidatos.

METODOLOGIA E RESULTADOS

Neste sentido, foram desenvolvidas e executadas três estratégias de clonagem para os genes candidatos utilizando vetores lentivirais (FUW) e retrovirais (pCL-XSN e PBABE) disponíveis no

laboratório (dado não mostrado). O sistema retroviral que se mostrou mais apropriado foi o vetor retroviral pCL-XSN utilizando a estratégia de clonagem como mostra a Figura 1.



Created in BioRender.com bio

Figura 1. Estratégia de clonagem para a construção do vetor retroviral PCL-XSN-ISG.

Durante o período, foi realizada a clonagem dos ISGs IFITM2 e IFITM3 obtendo os plasmídeos pCL-IFITM2 e IFITM3. Os clones obtidos no processo foram analisados por PCR convencional utilizando oligos do vetor e oligos específicos para o ISG correspondente. Também, foi utilizada uma reação enzimática com a enzima de restrição empregada na clonagem para confirmação dos clones (Figura 2).

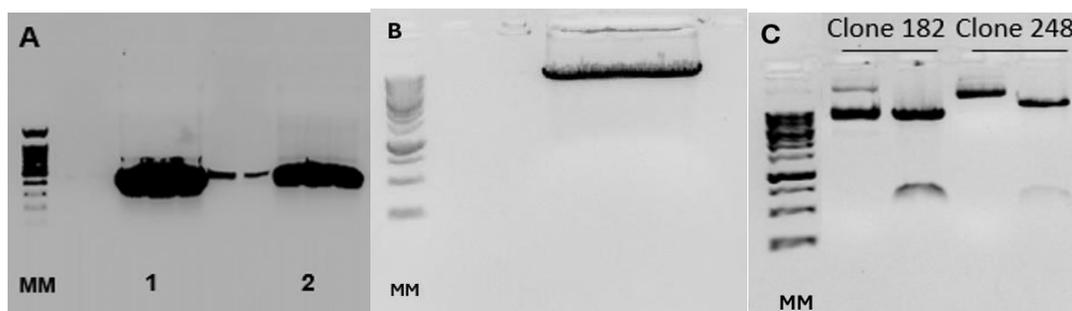


Figura 2. A- Eletroforese dos insertos (1) IFITM2 e (2) IFITM3. MM: Marcador de peso molecular PCR BIO Ladder IV (100bp – 1500bp). B- Eletroforese do plasmídeo pCLXSN digerido com a enzima de restrição EcoRI. MM: Marcador de peso molecular PCR BIO Ladder II (250bp - 10kb) C- Confirmação da clonagem dos plasmídeos pCL-XSN-IFITM2 (clone 182) e pCL-IFITM3 (clone 248) com a enzima de restrição EcoRI mostrando os insertos clonados. MM: Marcador de peso molecular PCR BIO Ladder II (250bp - 10kb).

A seguir, foi iniciada a produção dos retrovírus no Laboratório de Biossegurança Nível 2 do Laboratório de Virologia e Biotecnologia Aplicada. A preparação foi realizada através da transfecção transiente de células HEK293T (CRL-3216™ ATCC) de acordo com o protocolo adaptado mostrado na Figura 3.

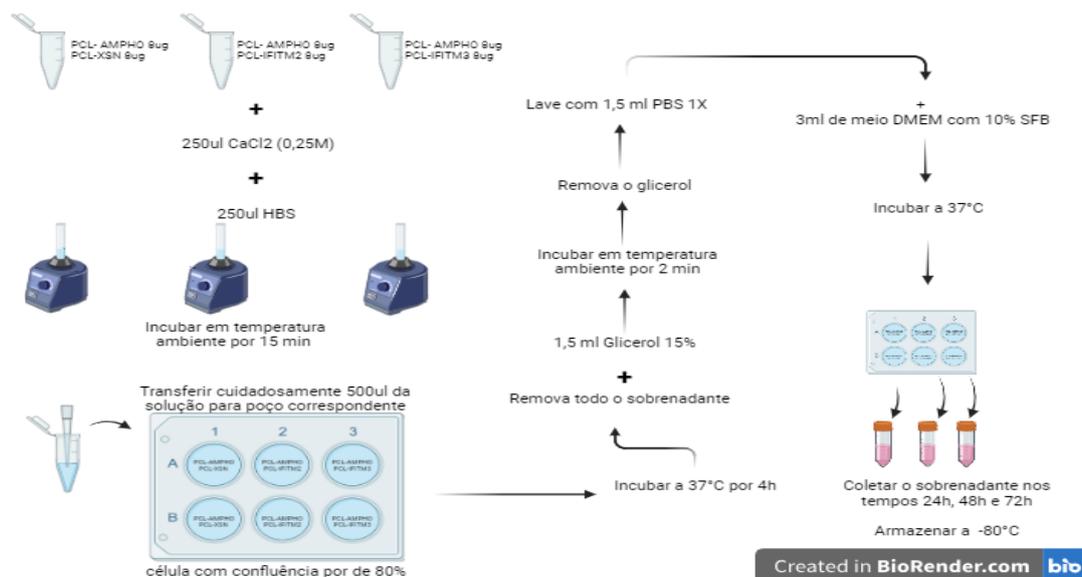


Figura 3. Preparação dos retrovírus para geração de linhagens celulares que superexpressam ISGs humanos.

Para o estabelecimento de células que superexpressam os genes IFITM2 e IFITM3 foram empregadas células da linhagem HT1080 (Células de Fibrosarcoma Humano - HT-1080 CCL-121™ ATCC). Inicialmente, foi testada nas células a toxicidade para o antibiótico G418 (Gentamicina) devido a que os retrovírus apresentam o gene de resistência para este antibiótico o qual permitirá a seleção da população de células que incorporarem o transgene ou ISGs candidatos. Para isso, foi efetuada a curva de morte do antibiótico G418, na qual foi avaliada a resposta à dose em que células alvo são submetidas a quantidades crescentes de antibiótico de seleção (0; 50; 100; 200; 400 e 800 µg/ml G418) para determinar a concentração mínima que o antibiótico pode matar todas as células em um período específico de tempo. Após o período de 5 dias de incubação foi determinado que a concentração de trabalho nas linhagens celulares HT1080 seria de 800 µg/ml. Com isso, foi iniciada a expansão das células para o congelamento das linhagens celulares modificadas para expressar os ISGs IFITM2 e IFITM3. Atualmente, está sendo avaliada por PCR em tempo real a expressão relativa dos ISGs IFITM2 e IFITM3 nas linhagens de células estabelecidas comparando com a linhagem de célula parental HT1080. Subsequentemente, as linhagens celulares HT1080-IFITM2 e HT1080-IFITM3 serão desafiadas com o vírus OROV para avaliar o nível de infecção viral buscando validar os possíveis mecanismos de defesa proporcionados por essas proteínas da imunidade inata. Além disso, os ISGs IFITM1, ISG20 e Ly6E se encontram no processo de clonagem e estabelecimento de retrovírus que permitam a geração de outras linhagens celulares para serem avaliadas durante a infecção pelo vírus OROV.

REFERÊNCIAS

- (1) Bastos Mde S, Figueiredo LT, Naveca FG, Monte RL, Lessa N, Pinto de Figueiredo RM, Gimague JB, Pivoto João G, Ramasawmy R, Mourão MP. **Identification of Oropouche Orthobunyavirus in the cerebrospinal fluid of three patients in the Amazonas, Brazil.** Am J Trop Med Hyg. 2012 Apr;86(4):732-5. doi: 10.4269/ajtmh.2012.11-0485. PMID: 22492162; PMCID: PMC3403753.
- (2) Saeed MF, Nunes M, Vasconcelos PF, Travassos Da Rosa AP, Watts DM, Russell K, Shope RE, Tesh RB, Barrett AD. **Diagnosis of Oropouche virus infection using a recombinant nucleocapsid protein-based enzyme immunoassay.** J Clin Microbiol. 2001 Jul;39(7):2445-52. doi: 10.1128/JCM.39.7.2445-2452.2001. PMID: 11427552; PMCID: PMC88168.
- (3) Rojas A, Stittleburg V, Cardozo F, Bopp N, Cantero C, López S, Bernal C, Mendoza L, Aguilar P, Pinsky BA, Guillén Y, Páez M, Waggoner JJ. **Real-time RT-PCR for the detection and quantitation of Oropouche virus.**

- Diagn Microbiol Infect Dis.** 2020 Jan;96(1):114894. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2019.114894. Epub 2019 Sep 9. PMID: 31727377; PMCID: PMC6906250.
- (4) MILLER Michael. Tese de Mestrado **Ação reguladora de genes estimulados por Interferon (ISGs) na infecção pelo vírus Oropouche (OROV)**. UNICAMP. Campinas, 2019.
- (5) Machado, Paulo R. L. et al. **Mecanismos de resposta imune às infecções**. Anuais Brasileiros de Dermatologia [online]. 2004, v. 79, n. 6 [Acessado 16 Fevereiro 2023], pp. 647-662. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0365-05962004000600002>>. Epub 30 Mar 2005. ISSN 1806-4841. <https://doi.org/10.1590/S0365-05962004000600002>.
- (6) Schneider WM, Chevillotte MD, Rice CM. **Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses**. Annu Rev Immunol. 2014;32:513-45. doi: 10.1146/annurev-immunol-032713-120231. Epub 2014 Feb 6. PMID: 24555472; PMCID: PMC4313732.
- (7) Liu Y, Nie H, Mao R, Mitra B, Cai D, Yan R, et al. (2017) **Interferon-inducible ribonuclease ISG20 inhibits hepatitis B virus replication through directly binding to the epsilon stem-loop structure of viral RNA**. PLoS Pathog 13(4): e1006296
- (8) Lenschow DJ, Lai C, Frias-Staheli N, Giannakopoulos N V, Lutz A, Wolff T, Osiak A, Levine B, Schmidt RE, García-Sastre A, Leib DA, Pekosz A, Knobeloch K, Horak I, Virgin HW. 2007. **IFN-stimulated gene 15 functions as a critical antiviral molecule against influenza, herpes, and Sindbis viruses**. Proc Natl Acad Sci U S A 104:1371–6.
- (9) Bochkov YA, Palmenberg AC. **Translational efficiency of EMCV IRES in bicistronic vectors is dependent upon IRES sequence and gene location**. Biotechniques. 2006 Sep;41(3):283-4, 286, 288 passim. doi: 10.2144/000112243. PMID: 16989088
- (10) Mizuguchi H, Xu Z, Ishii-Watabe A, Uchida E, Hayakawa T. **IRES-dependent second gene expression is significantly lower than cap-dependent first gene expression in a bicistronic vector**. Mol Ther. 2000 Apr;1(4):376-82. doi: 10.1006/mthe.2000.0050. PMID: 10933956
- (11) Lois C, Hong EJ, Pease S, Brown EJ, Baltimore D. **Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors**. Science. 2002 Feb 1;295(5556):868-72. doi: 10.1126/science.1067081. Epub 2002 Jan 10. PMID: 11786607
- (12) HANAHAN, D. **Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids**. Journal of molecular biology. v.166, n.4, p.557-580, 1983
- (13) Bajgelman, MC. et al. **Exploration of critical parameters for transient retrovirus production**. J. Biotechnol. 103, 97-106, 2003.) (Strauss, BE. et al. A lentiviral vector with expression controlled by E2F-1: A potential tool for the study and treatment of proliferative diseases. Biochem Biophys Res Commun. 348, 1411-1418, 2006.
- (14) Schoggins JW, Wilson SJ, Panis M, Murphy MY, Jones CT, Bieniasz P, Rice CM. 2011. **A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response**. Nature 472:481–5. 108
- (15) Zhang Y, Bliska JB. **Role of Toll-like receptor signaling in the apoptotic response of macrophages to Yersinia infection**. Infect Immun. 2003 Mar;71(3):1513-9. doi: 10.1128/IAI.71.3.1513-1519.2003. PMID: 12595470; PMCID: PMC148878.
- (16) Tilston-Lunel NL, Hughes J, Acrani GO, da Silva DE, Azevedo RS, Rodrigues SG, Vasconcelos PF, Nunes MR, Elliott RM. **Genetic analysis of members of the species Oropouche virus and identification of a novel M segment sequence**. J Gen Virol. 2015 Jul;96(Pt 7):1636-50. doi: 10.1099/vir.0.000108. Epub 2015 Mar 3. PMID: 25735305; PMCID: PMC4635451.
- (17) Acrani, Gustavo Olszanski., Tilson-Lunel, Natasha., Spiegel, Martin., Weismann, Manfred., et al. **Establishment of a minigenome system for Oropouche virus reveals the S genome segment to be significantly longer than reported previously**. Journal of General Virology, Volume 96, issue. March, 2015. <https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/jgv/10.1099/jgv.0.000005>
- (18) Cardoso, Belgath Fernandes et al. **Detection of Oropouche virus segment S in patients and in Culex quinquefasciatus in the state of Mato Grosso, Brazil**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz [online]. 2015, v. 110, n. 6 [Accessed 3 March 2023], pp. 745-754. Available from: <<https://doi.org/10.1590/0074-02760150123>>. Epub Sept 2015. ISSN 1678-8060. <https://doi.org/10.1590/0074-02760150123>
- (19) Melo, Karla Fabiane Lopes de., Pereira, Cláudio Renan de Souza., Neto, Walter Felix Franco., Amorim, Murilo Tavares., Ferreira, Jardel Fábio Lopes, Araújo, Ana Paula Sousa Araújo., et.al. **O vírus oropouche e o seu contexto epidemiológico na América Latina no período de 2009 a 2019**. Revista Eletrônica Acervo Saúde. August 2020. DOI:10.25248/reas.e4138.2020.
- (20) Secretaria Municipal da Saúde. Diretoria de Vigilância em Saúde Centro de Informações Estratégicas em Vigilância à Saúde. **Informe para situação epidemiológica da febre do oropouche em Salvador-BA**. Boletim Informativo SMS/DVIS/CIEVS N. 13/2017 de 18 de dezembro de 2017.
- (21) MOURA, Eduardo. **Conheça a nova arbovirose: Febre do Oropouche**. Pebmed, 16 de Janeiro de 2018. Infectologia. Disponível em: <https://pebmed.com.br/febre-do-oropouche-porque-e-o-que-voce-precisa-saber/>. Acesso em 16 de Fevereiro de 2023.
- (22) Travassos da Rosa JF, de Souza WM, Pinheiro FP, Figueiredo ML, Cardoso JF, Acrani GO, Nunes MRT. **Oropouche Virus: Clinical, Epidemiological, and Molecular Aspects of a Neglected Orthobunyavirus**. Am J

- Trop Med Hyg. 2017 May;96(5):1019-1030. doi: 10.4269/ajtmh.16-0672. Epub 2017 Feb 6. PMID: 28167595; PMCID: PMC5417190.
- (23) Files, M.A., Hansen, C.A., Herrera, V.C. et al. **Baseline mapping of Oropouche virology, epidemiology, therapeutics, and vaccine research and development.** npj Vaccines 7, 38 (2022).
- (24) PIMENTEL Alexa. **Revisão da análise filogenética dos segmentos L, M e S do vírus oropouche.** Universidade do Rio Grande do Norte. Natal, Junho de 2019.
- (25) KORSMAN Stephen, ZYL Gert, NUTT Louise, ANDERSSON Monique, PREISER Wolfgang. **Virologia. Guanabara Koogan.** Elsevier Editora Ltda. 2014.
- (26) PEREIRA, Rosangela, COLANGELO Julia, SOUZA Patrícia, CARVALHO Larissa, NIZER Waleska, LIMA William. **Epidemiological aspects of the Oropouche virus (Orthobunyavirus) in South America: A systematic review.** Rev. Colomb. Cienc. Quím. Farm., Vol. 51(1), 166-184, 2022.
- (27) Liu Z, Chen O, Wall JBJ, Zheng M, Zhou Y, Wang L, Vaseghi HR, Qian L, Liu J. **Systematic comparison of 2A peptides for cloning multi-genes in a polycistronic vector.** Sci Rep. 2017 May 19;7(1):2193. doi: 10.1038/s41598-017-02460-2. PMID: 28526819; PMCID: PMC5438344
- (28) Dirac AM, Bernards R. **Reversal of senescence in mouse fibroblasts through lentiviral suppression of p53.** J Biol Chem. 2003 Apr 4;278(14):11731-4. doi: 10.1074/jbc.C300023200. Epub 2003 Jan 27. PMID: 12551891.