



# 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* e 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 MOs. Assim, o objetivo deste estudo é avaliar o perfil de replicação de MAYV em camundongos deficientes de *Irf5* em células CD11c<sup>+</sup>. Nesta primeira etapa do estudo foi verificado que animais nocautes condicionais CD11c-Cre<sup>+</sup> *Irf5*<sup>fl/fl</sup> são suscetíveis à infecção acompanhados de inchaço articular e alta carga viral em diversos tecidos, incluindo no sistema nervoso central. Nossos resultados evidenciam que MAYV pode se replicar cronicamente nesses animais e que IRF5 em DCs é essencial para o pleno controle da replicação viral e da doença causada por MAYV em modelo murino.

## METODOLOGIA:

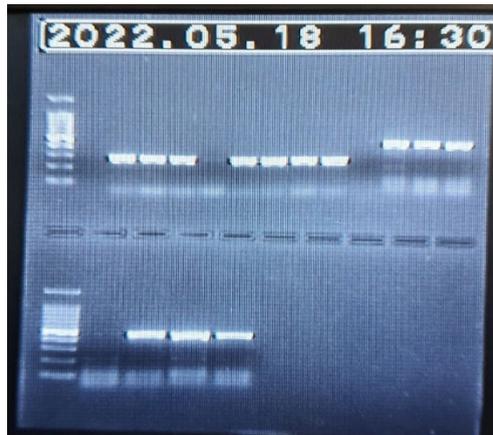
### ANIMAIS

Os animais C57BL/6 CD11c-Cre<sup>+</sup> e C57BL/6 *Irf5*<sup>fl/fl</sup> foram importados da Jackson Laboratory. Os animais foram mantidos e tiveram seus cruzamentos realizados no biotério do Departamento de Genética, Evolução, Microbiologia e Imunologia (IB-Unicamp) com aprovação no CEUA-Unicamp #6120-1/2022. Os animais obtidos são transgênicos que apresentam o gene da enzima bacteriana *Cre recombinase* localizado sob ação do promotor do gene CD11c, enzima a qual excisa do genoma as sequências LoxP que flanqueiam o gene *Irf5* levando à deleção condicional de *Irf5* em células CD11c<sup>+</sup>.

### GENOTIPAGEM

A genotipagem dos animais CD11c-Cre<sup>+</sup> *Irf5*<sup>fl/fl</sup> resultantes dos cruzamentos foi realizada a partir da coleta de tecido cartilaginoso da orelha dos animais para extração de ácidos nucleicos pela digestão com 75 µL de NaOH 25mm/EDTA 0,2mm por 15 minutos à 98°C e estabilização com 75 µL de Tris HCl 40mM. Em seguida, reações de PCR foram preparadas utilizando *primers* para detecção molecular de *Cre* (*Forward*: CGA TGC AAC GAG TGA TGA GG; *Reverse*: GCA TTG CTG TCA CTT GGT CGT) e de *Irf5*<sup>fl/fl</sup> (*Forward*: CGT GTA GCA CTC CAT GCT CT; *Reverse*: AGG GCC TGT CCA GAA TTA GG) seguindo as instruções do fabricante do kit Platus Taq DNA Polymerase (Sinapse Biotecnologia). Resumidamente, foi seguido a 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 dessas reações foram submetidos à eletroforese em gel de agarose à 2% e os géis

foram observados em fotodocumentador para visualização das bandas. 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  $Irf5^{wt/wt}$ , 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<sup>+</sup> Irf5<sup>fl</sup> 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

Todas as infecções foram realizadas com  $10^6$  PFU do vírus Mayaro em 50  $\mu$ L de volume final. As inoculações foram feitas na região plantar da pata esquerda. Os animais foram acompanhados diariamente por 42 dias pós-infecção quanto à sinais de doença neurológica, pesagens e medição do inchaço da pata inoculada através da mensuração de sua área.

## COLETA DOS TECIDOS E ANÁLISE DA CARGA VIRAL

Em qualquer momento dos 42 dias de infecção ou ao término do experimento, os animais foram eutanasiados com superdose de cetamina e xilazina, e os tecidos foram coletados pela dissecação em condições assépticas em fluxo laminar. Os tecidos coletados foram baço, fígado, rim, medula espinal, cérebro, sangue, pata esquerda, coração, pulmão e linfonodos inguinais. Os Tecidos foram armazenados em criotubos contendo beads de zircônia com meio DMEM suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de penicilina e estreptomicina. Os tecidos foram macerados à 6000 rpm por 40 segundos em MagNA Lyser e armazenados à  $-80^{\circ}\text{C}$  até o uso.

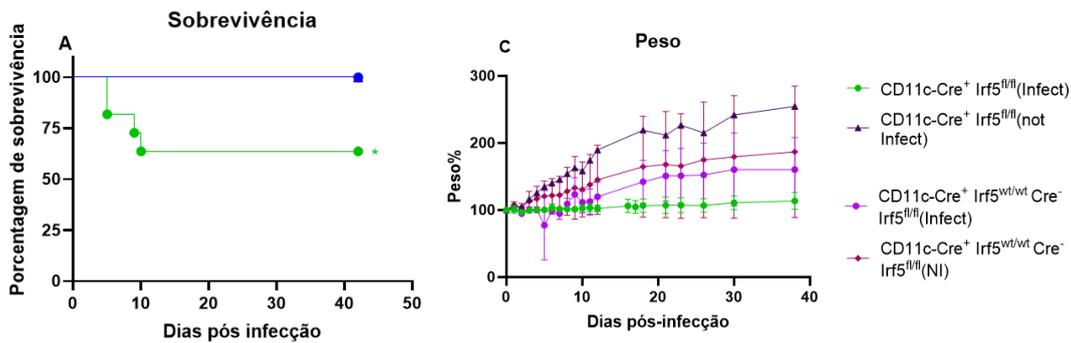
## TITULAÇÃO VIRAL

Células Vero CCL-81 foram semeadas em placas de 24 poços na quantidade de  $2 \times 10^5$  células/poço

As placas com as células foram incubadas à  $37^{\circ}\text{C}$  com atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  *overnight* para a formação da monocamada celular. Cada tecido foi clarificado por centrifugação à  $12.000 \times g$  previamente à inoculação nas células. O sobrenadante das amostras de tecidos foi diluído em DMEM em diluições seriadas decimais e inoculados em duplicata sobre as células plaqueadas. Após 1 hora de adsorção, foi adicionado meio semissólido contendo DMEM e carboximetilcelulose (CMC) 0,75% suplementado com 5% de SFB e 1% de antibióticos. As placas foram então incubadas em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  e atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  por 36 horas. As células foram então fixadas com 8% de paraformaldeído por 40 minutos e coradas com 0,1% de azul de metileno por 1 hora. As placas de lise formadas foram contadas visualmente.

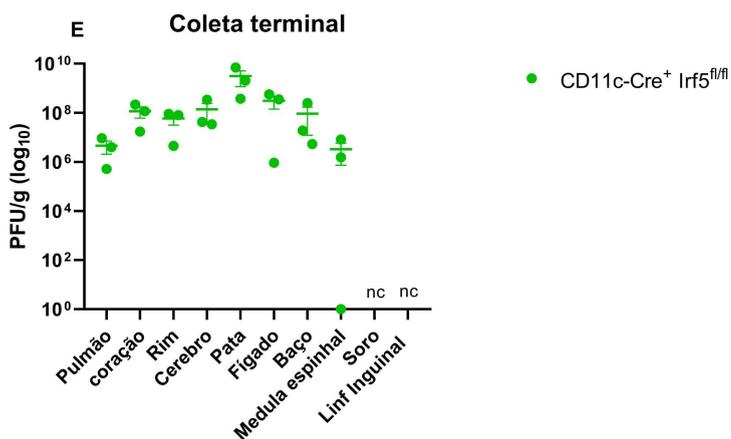
## RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Suscetibilidade dos animais CD11c-Cre<sup>±</sup> Irf5<sup>fl/fl</sup>: Observamos que animais com deleção condicional de *Irf5* em DCs tiveram 27,7% de mortalidade (5 de 18 indivíduos CD11c-Cre<sup>+</sup> Irf5<sup>fl/fl</sup>) com os eventos de morte ocorrendo entre 6 e 11 dias pós-infecção (dpi), acompanhados da manutenção do peso inicial mas com evidente ataxia (Figura 2).



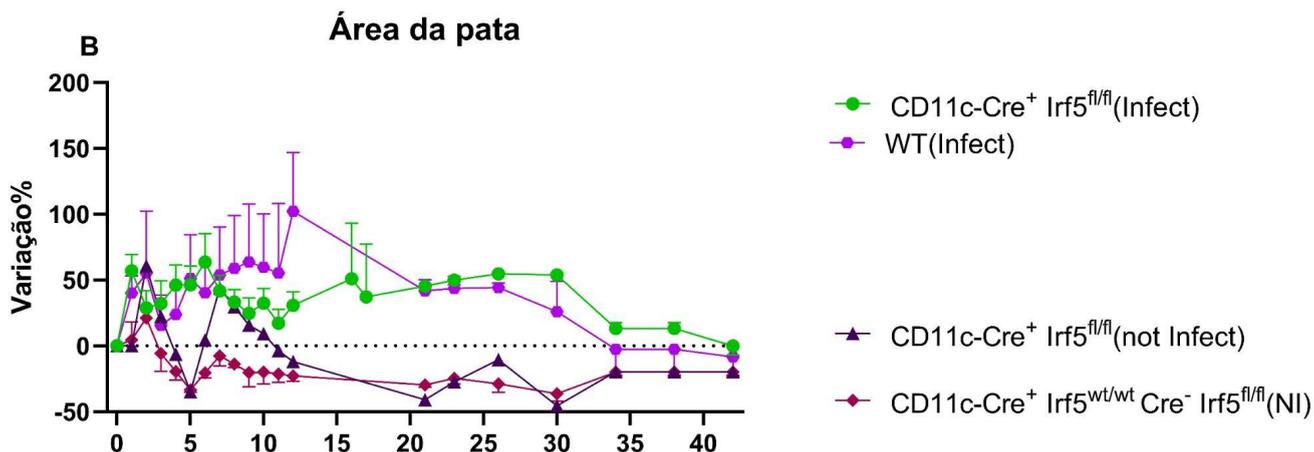
**Figura 2. Camundongos CD11c-Cre<sup>+</sup> Irf5<sup>fl/fl</sup> são parcialmente suscetíveis à infecção por MAYV.** Mortalidade e peso dos animais infectados e não infectados com MAYV. Símbolos representam eventos de morte ou média de peso ± SEM. Diferença estatística pelo teste log-rank seguido de correção Bonferroni das curvas de sobrevivência estão indicados. \* p value < 0,05.

MAYV causa infecção disseminada em animais CD11c-Cre<sup>±</sup> Irf5<sup>fl/fl</sup> suscetíveis: A titulação de vírus viável nos animais CD11c-Cre<sup>+</sup> Irf5<sup>fl/fl</sup> infectados e que sucumbiram à infecção mostrou altos títulos virais em diferentes tecidos coletados, incluindo na pata inoculada, fígado, baço, cérebro e medula espinal (Figura 3).



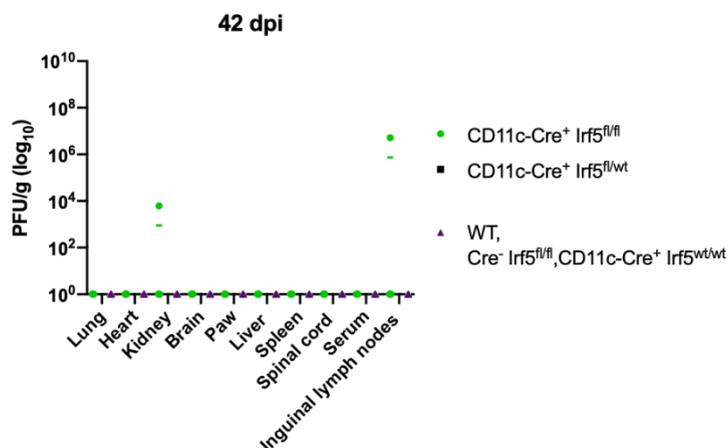
**Figura 3. Suscetibilidade de animais CD11c-Cre<sup>+</sup> Irf5<sup>fl/fl</sup> é acompanhada de elevada carga viral disseminada.** Ensaio de titulação por formação de placas de lise de amostras de animais CD11c-Cre<sup>+</sup> Irf5<sup>fl/fl</sup> suscetíveis na coleta terminal. Símbolos representam carga viral de animais individuais, e linhas representam média ± SEM. nc = não coletado.

Animais CD11c-Cre<sup>±</sup> Irf5<sup>fl/fl</sup> 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 inchaço da pata na fase aguda da doença em até 10 dpi. O inchaço da pata dos animais CD11c-Cre<sup>+</sup> Irf5<sup>fl/fl</sup> infectados permaneceu maior até 30 dpi (Figura 4). Ainda que não tenhamos observado diferenças significativas entre o inchaço dos animais mutantes e selvagens (WT) até o momento, é indicativo de que o inchaço permanece em animais infectados (Figura 4). Em conjunto, nossos resultados indicam que a deleção de *Irf5* em DCs pode levar ao 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 (CD11c-Cre<sup>+</sup> Irf5<sup>fl/fl</sup>), heterocigotos (CD11c-Cre<sup>+</sup> Irf5<sup>fl/wt</sup>) e WT durante a infecção por MAYV. Símbolos representam média de inchaço ± SEM..

Parte dos animais CD11c-Cre<sup>±</sup> Irf5<sup>fl/fl</sup> desenvolvem infecção crônica por MAYV: Para avaliar a capacidade de MAYV persistir nos animais infectados, avaliamos a carga viral tecidos no dia 42 pós-infecção. Curiosamente, 20% dos animais (2 de 10 indivíduos CD11c-Cre<sup>+</sup> Irf5<sup>fl/fl</sup>) apresentaram vírus viável detectável em alguns tecidos, como linfonodos e rins (Figura 5). Embora o número de animais não seja suficiente para testes estatísticos, fica clara a indicação de que MAYV pode estabelecer infecção crônica quando o gene *Irf5* é deletado de DCs.



**Figura 5. Carga viral viável em 42 dpi de camundongos CD11c-Cre<sup>+</sup> Irf5<sup>fl/fl</sup> infectados.** Ensaio de titulação por formação de placa de lise de amostras de animais CD11c-Cre<sup>+</sup> Irf5<sup>fl/fl</sup> resistentes na coleta em 42 dpi. Símbolos representam carga viral de animais individuais, e linhas representam média.

## CONCLUSÃO

Até o momento foi possível observar que *Irf5* em DCs foi essencial para a total proteção de animais contra a infecção por MAYV, controlando a replicação viral e prevenindo a cronicidade da doença e do inchaço articular; tal fato pode ser visto pela mortalidade parcial desses animais ~30%; além disso percebe-se que no período analisado cerca de 20% dos animais acompanhados por 42 dpi apresentaram carga viral mostrando assim uma certa cronicidade neste modelo.

## **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.