

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

Cristina Santos da Costa

**AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DA PROTEÍNA CELULAR RAB27A NO
BROTAMENTO E LIBERAÇÃO DE ORTHOBUNYAVIRUS UTILIZANDO O VÍRUS
OROPOUCHE COMO MODELO**

Porto Alegre

2017

Cristina Santos da Costa

**AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DA PROTEÍNA CELULAR RAB27A NO
BROTAMENTO E LIBERAÇÃO DE ORTHOBUNYAVIRUS UTILIZANDO O VÍRUS
OROPOUCHE COMO MODELO**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharela em Biomedicina.

Área de habilitação: Virologia

Orientador: Prof. Dr. Luis Lamberti Pinto da Silva

Porto Alegre

2017

CIP - Catalogação na Publicação

Costa, Cristina Santos da
Avaliação do envolvimento da proteína celular
Rab27a no brotamento e liberação de orthobunyavirus
utilizando o vírus Oropouche como modelo / Cristina
Santos da Costa. -- 2017.
43 f.
Orientador: Luis Lamberti Pinto da Silva.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto
de Ciências Básicas da Saúde, Curso de Biomedicina,
Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Virologia. 2. Biologia celular. 3. Virus
Oropouche. 4. Proteína Rab27a. I. Silva, Luis Lamberti
Pinto da, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

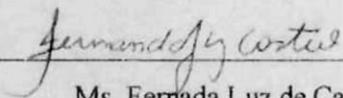
Cristina Santos da Costa

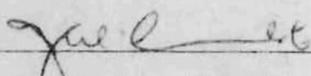
**AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DA PROTEÍNA CELULAR RAB27A NO
BROTAMENTO E LIBERAÇÃO DE ORTHOBUNYAVIRUS UTILIZANDO O VÍRUS
OROPOUCHE COMO MODELO**

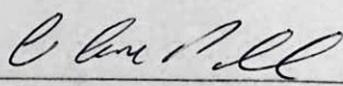
Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel(a) em Biomedicina.

Aprovado em: 22 de dezembro de 2017.

BANCA EXAMINADORA


Ms. Fernanda Luz de Castro (UFRJ)


Drª Juliana Comerlato (UFCSPA)


Prof. Dr. Luis Lamberti Pinto da Silva – FMRP-USP (orientador)

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer a Deus: Aquele que inspira meu coração e ilumina meu caminho.

Agradeço enormemente a minha família, por todo o apoio e sacrifícios dedicados para que eu tivesse acesso a uma educação de qualidade. Em especial, gostaria de agradecer a minha mãe, Cleusa, por me ensinar que tudo pode ser possível para quem tem amor e determinação pelo que faz. Vocês são tudo para mim!

Obrigada, professor Luis Lamberti, por acreditar no meu potencial e me orientar nesse trabalho. Sempre me auxiliando e motivando, o senhor é um exemplo de pesquisador para mim.

Agradeço aos meus colegas do Laboratório de Tráfego Intracelular de Proteínas pelo companheirismo, aprendizagem e muitos momentos de descontração que tornaram tudo mais leve. Em especial, gostaria de agradecer à Andréia e à Érika por toda colaboração e paciência, por me inspirarem a ver toda a beleza que a ciência oferece.

Agradeço às agências de fomento CNPq e FAPESP que permitiram que esse trabalho fosse realizado. E a todos os funcionários e servidores da FMRP-USP e UFRGS que me auxiliaram de alguma forma.

Gostaria de dizer um muito obrigada com muito carinho às minhas amigas Andréia, Ana Paula, Neiva e Teresinha, e ao meu amigo Marcus por todo o apoio, palavras de incentivo e afeto dedicadas a mim. Vocês são muito importantes na minha formação!

Por último, e muito importante, gostaria de agradecer ao meu namorado Leonardo por toda a dedicação e suporte, pela paciência durante meus momentos estressados, pelo amor dedicado a mim, por se fazer presente em minha vida mesmo há 1400 km de distância.

RESUMO

O vírus Oropouche (OROV) pertence à família *Bunyaviridae*, gênero *Orthobunyavirus*, e é considerado o causador de uma das arboviroses com maior importância em saúde pública no Brasil. Responsável por grandes surtos em diferentes países da região equatorial da América, demonstra um elevado potencial emergente. Apesar de sua relevância, pouco se conhece quanto aspectos específicos do ciclo replicativo do OROV, pois a maior parte do conhecimento gerado sobre o gênero *Orthobunyavirus* provém de estudos do vírus Bunyamwera, protótipo do gênero. O presente estudo tem por objetivo elucidar mecanismos utilizados pelo OROV para a liberação de sua progênie viral, hipotetizando-se que o vírus seja capaz de manipular o sistema de secreção celular, e utilizar proteínas como Rab27a para externalizar novas partículas virais. Para testar tal hipótese, a expressão de Rab27a foi suprimida por siRNA em células HeLa anteriormente a infecção. Análises do sobrenadante dessas células 18h pós-infecção demonstraram uma diminuição do percentual de vírus liberado em relação às células não silenciadas, sugerindo que a presença de Rab27a deve ser importante para a liberação da progênie viral. Além disso, análises por imunofluorescência confocal apresentaram a proteína Rab27a em regiões adjacentes a proteínas virais na periferia das células, o que pode ser um indício de uma possível interação direta ou indireta entre tais proteínas. Para confirmar essa hipótese e compreender como ocorre essa possível relação, mais testes serão realizados.

Palavras-chave: OROV. Arbovirose. Rab27a. siRNA.

ABSTRACT

The Oropouche virus (OROV) belongs to the *Bunyaviridae* family, gender Orthobunyavirus, and it causes an arboviral illness with great public health relevance in Brazil. OROV is responsible for large disease outbreaks in several countries within equatorial America and has high emerging potential. Despite its relevance, there is little knowledge concerning specific aspects of OROV replication cycle, as most of what is known about the Orthobunyavirus gender is related to Bunyamwera virus, the gender prototype. The present study aims at elucidating the mechanisms used by OROV for the release of its viral progeny, assuming that this virus is able to manipulate the cellular secretion system and use proteins such as Rab27a to externalize new viral particles. To test this hypothesis, Rab27a expression was inhibited by siRNA in HeLa cells before infection. Cell supernatant analysis 18h following infection revealed a reduction in the percentage of released virus as compared to non-silenced cells, suggesting that Rab27a might be important for viral progeny release. Furthermore, confocal immunofluorescence analyses showed that Rab27a was located in adjacent regions to viral proteins in the cell periphery, which could indicate a possible direct or indirect interaction between such proteins. Further experiments should be done in order to confirm this hypothesis and understand the relation between those proteins.

Keywords: OROV. Arboviral. Rab27a. siRNA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Distribuição geográfica do vírus OROV (retirado de Travassos et. al., 2017).....	10
Figura 2 – Estrutura viral dos Bunyavirus (retirado de Elliott, 2014).....	12
Figura 3 – Modelo do ciclo replicativo dos <i>Orthobunyavirus</i> (retirado de Elliott, 2014).....	14

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	9
1.1	JUSTIFICATIVA	17
1.2	OBJETIVOS.....	18
1.2.1	Objetivo geral.....	18
1.2.2	Objetivos específicos.....	18
2	Artigo científico.....	19
3	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	35
	REFERÊNCIAS	36
	ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA	39

1. INTRODUÇÃO

Família *Bunyaviridae*

A família *Bunyaviridae* foi determinada em 1975, com o intuito de agrupar vírus com similaridades estruturais e morfológicas, inicialmente contendo apenas o gênero *Bunyavirus* (Fenner, 1976). Considerada a maior e mais diversificada família viral, atualmente é composta por mais de 300 vírus sorologicamente distintos e com distribuição mundial, divididos em cinco gêneros: *Orthobunyavirus*, *Hantavirus*, *Nairovirus*, *Phlebovirus* e *Tospovirus*. Os *Tospovirus* são capazes de infectar plantas, enquanto que os demais infectam animais, com ciclos de transmissão – a exceção dos *Hantavirus* – entre artrópodes hematófagos e hospedeiros vertebrados suscetíveis (Calisher, 1996). Além de causar doenças em animais durante seu ciclo selvagem, alguns destes vírus podem causar doenças graves, e até fatais, em seres humanos, possuindo grande importância em saúde pública. Dentre os seus representantes mais conhecidos estão o vírus da febre do Vale Rift (*Phlebovirus*), o vírus da encefalite de La Crosse (LACV), o vírus Bunyamwera (BUNV), o vírus Oropouche (OROV) (*Orthobunyavirus*), e o vírus Hantaan (*Hantavirus*) (Revisado por Gonzalez-Scarano e Soldan, 2005).

Orthobunyavirus é o maior gênero de vírus de RNA, constituído por mais de 170 espécies virais (Elliott et al., 2011). Muitos desses vírus são responsáveis por diversas patologias em seres humanos, destacando-se encefalite (LACV), febre hemorrágica (vírus Ngari) e febre aguda (OROV). A maioria dos estudos moleculares desse gênero são conduzidos utilizando como modelo o BUNV (modelo de estudo também para a família *Bunyaviridae*) e LACV (revisado por Elliott, 2014). Devido ao seu elevado número de representantes, e aos sintomas que muitas vezes se confundem ou passam despercebidos, pouco se sabe ainda sobre aspectos específicos de seus integrantes, o que dificulta o planejamento de ações eficazes contra esses causadores de síndromes e doenças emergentes em humanos e animais.

Epidemiologia e importância clínica do vírus Oropouche

O vírus Oropouche, OROV, é um arbovírus emergente com grande importância epidemiológica no Brasil e em países tropicais da América Central e do Sul, como Peru, Venezuela e Panamá. Desde seu primeiro isolamento em 1955 no vilarejo Vega de Oropouche em Trinidad e Tobago (Anderson et al., 1961), o vírus, com quatro genótipos já identificados (Figura 1), foi responsável por grandes surtos epidêmicos na região Amazônica, infectando

mais de 500 mil pessoas (Travassos et. al., 2017). Tendo em vista a sintomatologia semelhante a outras infecções virais, como febre alta com início abrupto, cefaléia, artralguas, fotofobia, e, eventualmente, meningite, torna-se difícil seu diagnóstico preciso e, conseqüentemente, estima-se que o número de casos deva ser ainda maior.

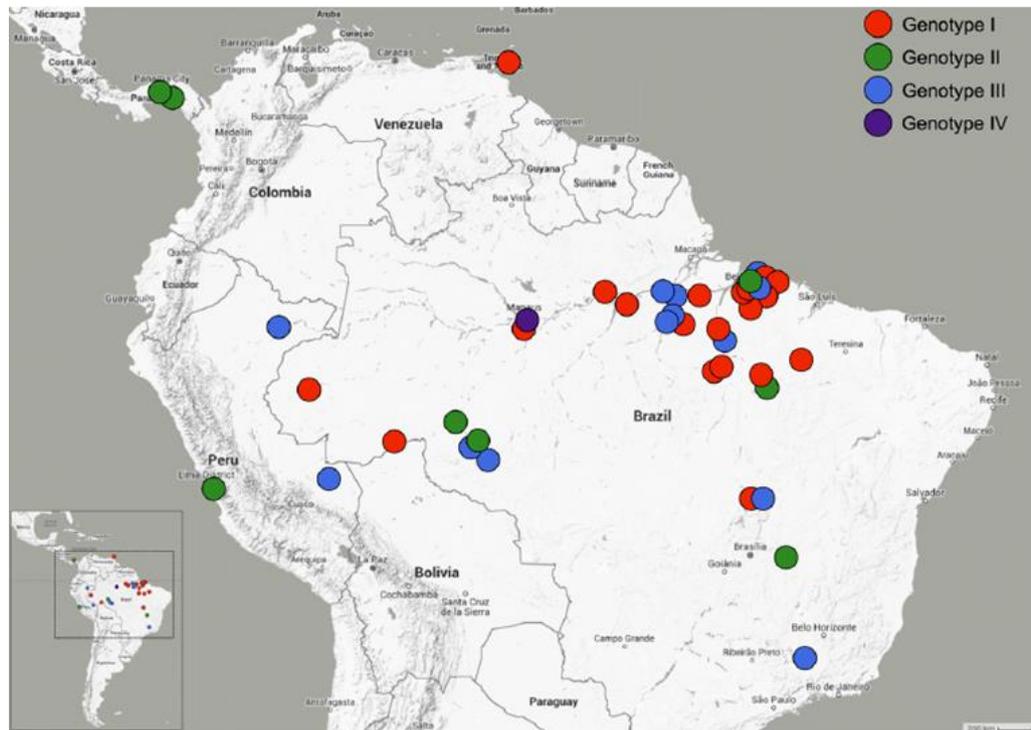


Figura 1: Distribuição geográfica do vírus OROV (retirado de Travassos et. al., 2017). Quatro genótipos do vírus Oropouche foram descritos a partir de 114 seqüências do gene N, distribuídos entre os países equatoriais do continente americano. Atenção especial ao Brasil, país com a presença dos quatro genótipos.

No Brasil, a primeira epidemia de Febre do Oropouche ocorreu no ano de 1961, na cidade de Belém do Pará, com estimativa de 11 mil casos (Pinheiro et al., 1962). No ano anterior, o vírus havia sido encontrado pela primeira vez no país, isolado do sangue de uma preguiça (*Bradypus trydactylus*) e em um *pool* de mosquitos (*Ochlerotatus serratus*) em uma mesma região florestal no estado do Pará (Pinheiro et al., 2004), caracterizando sua provável entrada no país através do ciclo silvestre. A partir de então, diversas epidemias desse arbovírus já foram notificadas em estados como Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Pará, Rondônia, e Tocantins (Pinheiro et. al., 1994, Azevedo et. al., 2007, Vasconcelos et. al., 2009).

A alternância entre os ciclos silvestres e urbanos é um fator determinante para a manutenção dos arbovírus na natureza, e no caso do OROV, acredita-se que o ciclo silvestre ocorra através do mosquito *Aedes (Ochlerotatus) serratus* (possível vetor de transmissão) e

animais como macacos, preguiças e aves silvestres. Já no ciclo urbano, em que ocorrem as extensas epidemias, o homem é infectado através da picada do mosquito *Culicoides paraensis*, popularmente conhecido por maruim ou borrachudo (Figueiredo, 1999). Nos últimos anos, devido às mudanças climáticas e ações antropológicas, tais como o desmatamento da floresta Amazônica, o mosquito *Culicoides paraensis* tem se disseminado para todo o continente americano, acarretando em risco eminente para o surgimento de novas epidemias do vírus Oropouche em grandes centros urbanos.

Estrutura viral

Embora a ultra-estrutura das partículas de OROV ainda não tenha sido caracterizada, acredita-se que seja muito semelhante a outros vírus do gênero *Orthobunyavirus*. As partículas virais desse gênero são esféricas e pleomórficas, medindo, em média, 90 nm de diâmetro. Espículas projetadas a partir de uma membrana dupla, o envelope viral, são formadas por trímeros de heterodímeros das glicoproteínas Gc e Gn, em um arranjo tripodal (revisado por Elliott, 2014).

Envolto pelo envelope lipídico, o genoma viral é composto de três segmentos de RNA fita-simples e polaridade negativa. Recentemente, foram descritos por meio de sequenciamento os três segmentos do protótipo de OROV brasileiro (linhagem BeAN 19991), apresentando 958 nucleotídeos para o segmento menor (S), 4.385 nucleotídeos para o segmento médio (M), e 6.852 nucleotídeos para o segmento maior (L) (Acrani et al., 2015). Cada segmento de RNA é flanqueado por 3' e 5' UTRs (do inglês: “*untranslated region*”, região não transcrita), que possuem complementariedade de bases, fazendo com que o RNA se arranje em uma forma circular. Além de servir como promotor da transcrição e replicação do genoma viral, a região UTR é importante para a encapsidação do RNA viral em complexos de ribonucleocapsídeo (RNP). Muitos monômeros da proteína do nucleocapsídeo (proteína N) envolvem o genoma do vírus através de reconhecimento dessa região (revisado por Elliott, 2014). O genoma dos *Bunyavirus* codifica quatro proteínas estruturais e duas não-estruturais. Além da proteína N (25-30 KDa), o segmento S codifica a proteína não estrutural NSs, que pode estar envolvida na montagem e brotamento do vírus (Lappin, 1994). O segmento M codifica as glicoproteínas de superfície Gc (110-120 KDa) e Gn (32-35 KDa), e a proteína não estrutural NSm; por fim, o segmento L codifica a RNA-polimerase RNA-dependente (RdRp), que, associada a cada RNP, é responsável pela transcrição e replicação do genoma viral (revisado por Elliott, 2014) (Figura 2).

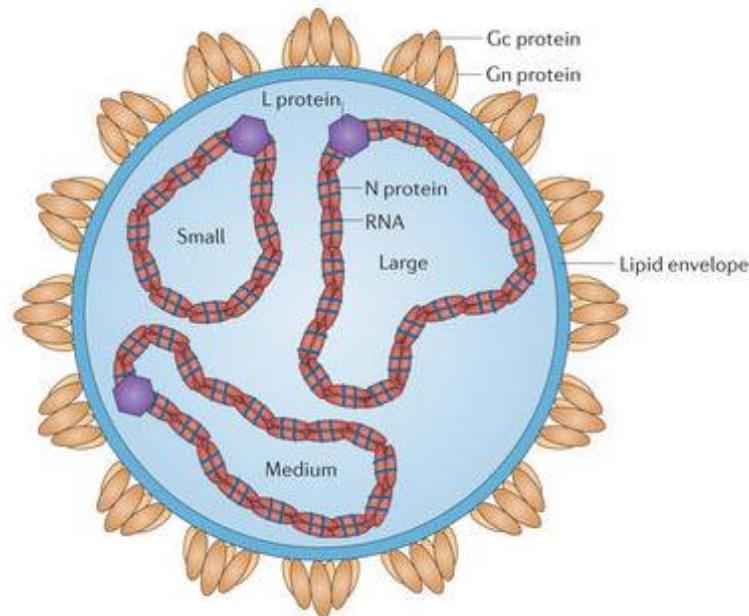


Figura 2: Estrutura viral dos Bunyavirus (retirado de Elliott, 2014). Desenho esquemático apresentando a estrutura de uma partícula de *Bunyavirus*, na qual os ribonucleocomplexos são formados pelos segmentos de RNA genômico recobertos por proteínas N e a associação de uma proteína L em cada. Os três complexos (S, M e L) são envoltos pelo envelope lipídico com heterodímeros das glicoproteínas Gc e Gn, formando as espículas, por meio das quais os vírion interagem com a célula alvo.

O ciclo replicativo dos *Orthobunyavirus*

Assim como outros vírus do gênero *Orthobunyavirus*, o vírus Oropouche entra nas células hospedeiras por meio de interação entre suas glicoproteínas, Gc e Gn, com receptores de superfície da célula alvo. Apesar de haver algumas proteínas candidatas para outros *Bunyavirus* (Lozach et. al., 2011), ainda não foi esclarecido qual é o receptor (ou receptores) envolvido no processo de adsorção desses vírus, mas sabe-se que uma grande variedade de tipos celulares pode ser infectada por OROV (Travassos et. al., 2017). Após a interação com o receptor celular, o vírus entra na célula por endocitose mediada por vesículas de clatrina, e, em menos de 1h, é direcionado a endossomos tardios (Santos et. al., 2008). A acidificação intraluminal decorrente da maturação dos endossomos iniciais a endossomos tardios, modifica a conformação estrutural da glicoproteína Gc, expondo um peptídeo de fusão hidrofóbico que leva à fusão do envelope viral com a membrana endossomal, liberando as ribonucleoproteínas virais no citosol (Bowden et. al., 2013; Schmaljohn et. al., 2007).

Após o desnudamento do genoma viral, este RNA de polaridade negativa é utilizado como molde pela enzima viral RdRp para a síntese de RNA de polaridade positiva. A transcrição do mRNA de cada segmento só ocorre após a inserção de sequências ligadas ao quepe (advindas de mRNAs da célula hospedeira) na extremidade 5' do RNA viral, processo catalisado pelo domínio de endonuclease da enzima RdRp (Patterson et. al., 1984). Os mRNAs dos segmentos S e L são traduzidos em ribossomos citosólicos, enquanto que o mRNA do segmento M é traduzido em ribossomos associados ao retículo endoplasmático rugoso (RER), em que a proteína precursora M nascente é translocada para o lúmen do RER, e posteriormente clivada em Gc, Gn e NSm por proteases celulares. As proteínas Gc e Gn formam heterodímeros já no RER, processo essencial para que as glicoproteínas virais sejam transportadas para o complexo de golgi (CG), no qual serão glicosiladas (Shi et. al., 2004).

A replicação do genoma viral ocorre nas fábricas virais, regiões modificadas pelo vírus, nas quais organelas e outros componentes celulares são recrutados para centralizar e otimizar a produção de partículas virais. A proteína N, após ser sintetizada no citosol, interage com o RNA viral de polaridade positiva, também chamado de antigenoma. Tal passo é importante para evitar que o RNA seja usado como molde na transcrição, bem como impede a formação de RNA dupla-fita (molécula capaz de sinalizar para uma resposta imunológica) (revisado por Elliott, 2014). A presença de uma quantidade significativa de proteínas N associadas ao antigenoma sinaliza para a replicação do mesmo, reação catalizada pela polimerase viral RdRp. Os segmentos genômicos associados às proteínas N e L (ribonucleoproteínas) são imediatamente transportados para a membrana modificada do CG, onde estão inseridas as glicoproteínas transmembranas Gc e Gn. Os complexos de ribonucleoproteínas interagem com as caudas citoplasmáticas das glicoproteínas através da proteína N (Shi et. al., 2007) e, então, a partícula viral montada brota em vesículas com membrana derivada do CG. Acredita-se que essas vesículas sejam direcionadas à superfície pela via de exocitose celular (Shi et. al., 2010), por meio da qual estruturas membranosas contendo as partículas virais fusionam-se com a membrana plasmática, liberando os vírions no meio extracelular. Os detalhes do tráfego da progênie viral até sua liberação da célula hospedeira ainda não foram elucidados (Figura 3).

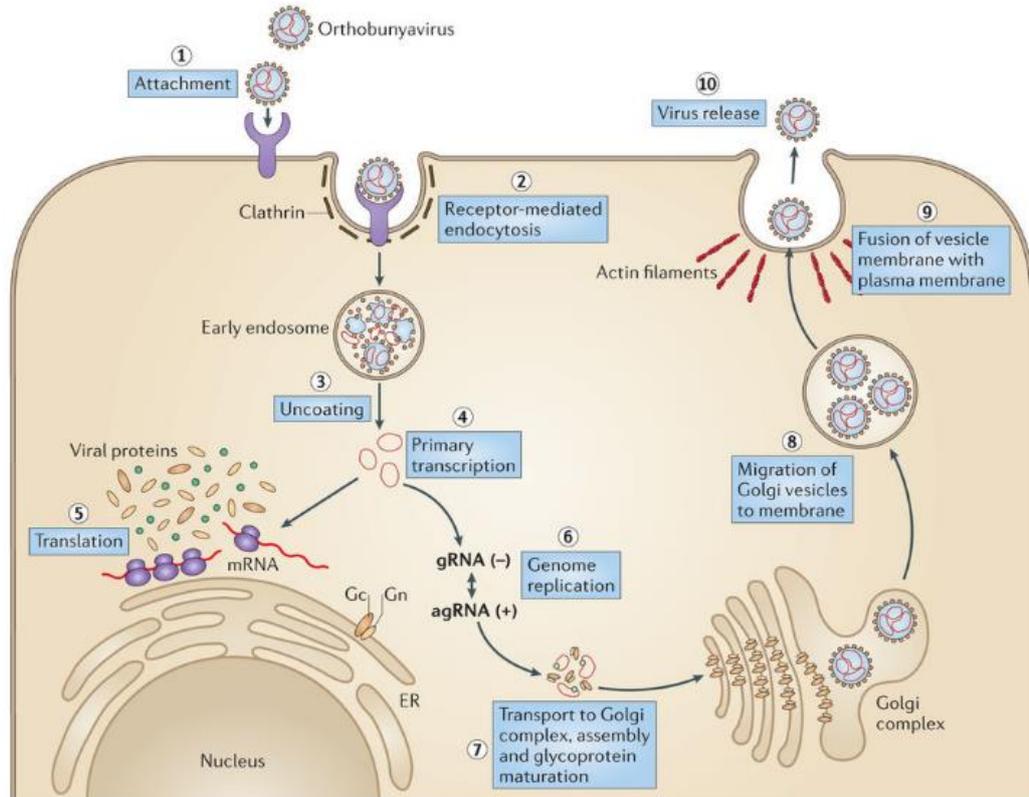


Figura 3: Modelo do ciclo replicativo dos *Orthobunyavirus* (retirado de Elliott, 2014). A interação entre as glicoproteínas do envelope viral com receptores celulares inicia o ciclo replicativo do vírus (1). Os vírions entram na célula hospedeira através de endocitose mediada por clatrina (2), e seguem pela via de amadurecimento desses endossomos, com progressiva acidificação de seu lúmen, processo que resulta na fusão das membranas do envelope viral e do endossomo, liberando as ribonucleoproteínas no citosol (3), onde o genoma segmentado será transcrito pela polimerase viral (4). Os mRNAs S e L são traduzidos em ribossomos citosólicos, enquanto que M é traduzido em ribossomos associados ao Retículo Endoplasmático Rugoso (5). O genoma viral é replicado a partir de uma fita positiva intermediária de cada segmento, denominada antígenoma (6), e então transportado, associado às proteínas N e L, para regiões do Complexo de Golgi modificadas pela inserção das proteínas Gn e Gc (7). As partículas virais são montadas nessa região, e, após brotamento para dentro de grandes vesículas (MVE), direcionadas à membrana plasmática (8). A fusão da membrana dos MVE com a membrana plasmática resulta na liberação da progênie viral (9).

Apesar do uso do BUNV como modelo de estudo para o gênero *Orthobunyavirus*, alguns aspectos do seu ciclo podem divergir em relação ao ciclo do OROV, o que torna importante estudos específicos da biogênese do OROV para melhor entendê-lo.

Manipulação da via tardia de secreção por *Bunyavirus*

Os vírus envelopados trafegam na célula infectada através do sistema de endomembranas. Manipulando a seu favor a organização de organelas e proteínas intracelulares, o vírus estabelece as chamadas fábricas virais, onde monta sua progênie, e utiliza a bicamada lipídica da membrana plasmática ou da organela relacionada para brotar e adquirir seu envelope viral (Novoa et. al., 2005). As fábricas virais são estruturas tubulares que utilizam filamentos de actina para se estabilizar, as quais permitem uma maior eficiência na montagem dos vírions. Em células infectadas com o BUNV, foi visto um acúmulo de mitocôndrias próximas às cisternas do complexo de Golgi na região perinuclear, provavelmente recrutadas pelo vírus, para a formação das fábricas virais (Salanueva et al., 2003, Fontana et al., 2012). A primeira maturação da partícula viral é dependente da região *trans*-Golgi, enquanto que a segunda ocorre após a liberação das partículas no meio extracelular, em que as glicoproteínas assumem a forma de espículas (Salanueva et al., 2003).

Os *Bunyavirus* utilizam a via secretória a partir do complexo de Golgi como trajetória para promover a liberação das partículas virais da célula hospedeira (Rowe et al., 2008; Salanueva et al., 2003). Nessa via de transporte intracelular, vesículas específicas brotam do *trans*-Golgi e são direcionadas para a membrana plasmática, processo que envolve diversas proteínas reguladoras e acessórias para seleção da carga transportada, marcação e endereçamento da vesícula para a região alvo. No entanto, ainda não foram elucidados os fatores celulares envolvidos na liberação dos *Bunyavirus*.

O papel da proteína Rab27a na liberação de vesículas secretoras

A família de proteínas Rab é composta de pequenas GTPases monoméricas citosólicas que utilizam a permutação entre GDP/GTP para serem ativadas e coordenarem, junto a seus efetores, diferentes etapas do transporte vesicular intracelular, incluindo o brotamento de vesículas e estruturas tubulares, a motilidade dessas através do citoesqueleto, e a entrega e fusão dessas estruturas nas membranas aceptoras dos compartimentos alvos (Zerial & McBride, 2001). Sua variedade é maior em organismos mais complexos devido a elevada necessidade de regular o transporte entre compartimentos intracelulares com especificidade, mostrando-se essenciais para os processos de endo e exocitose. Tal especificidade é alcançada através da compartimentalização das diferentes proteínas Rab em cada etapa do processo, servindo como marcadores moleculares no tráfego de vesículas.

Existem duas isoformas de proteínas Rab27, denominadas Rab27a e Rab27b, codificadas por dois genes em cromossomos diferentes, com cerca de 70% de identidade em suas sequências de aminoácidos (Pastural et. al., 2000 , Ramalho et. al., 2001). As duas proteínas homólogas são importantes na biologia de endossomos multivesiculares (MVE), mas possuem papéis não redundantes (Ostrowski et. al., 2009). Os MVE são estruturas grandes, de 400-500 nm, com vesículas intraluminas que brotam a partir de sua membrana; definidos como intermediários na via entre endossomos iniciais e tardios, os MVE trafegam pelo interior da célula com o auxílio de microtúbulos (revisado por Gruenberg1 e Harald Stenmark, 2004). Enquanto Rab27b está localizada em MVE perinucleares e parece estar envolvida no endereçamento deles para a membrana plasmática, Rab27a se mostra necessária para a entrega e fusão dessas estruturas com a membrana plasmática e, assim, liberação de suas vesículas intraluminas no meio extracelular, onde recebem a denominação de exossomos ou vesículas extracelulares (Ostrowski et al., 2009).

O conjunto de Rab27 ativas (ligadas a GTP) na superfície dos MVE recruta suas proteínas efetoras, as quais interagem com proteínas motoras de actina (como por exemplo miosina Va, miosina VIIa) e dão seguimento à via de transporte destas estruturas até a membrana aceptora (Fukuda e Kuroda, 2002). Desnos e colaboradores propuseram que miosina Va, ao interagir com a proteína Myrip (efetora de Rab27a) medeia diretamente a fixação estável de vesículas marcadas na membrana plasmática. Levando-se em consideração as semelhanças entre a via de liberação de exossomos, que envolve a fusão de MVEs com membrana plasmática, e a externalização de Bunyavirus, hipotiza-se que a formação da progênie do vírus Oropouche possa ocorrer por meio de um processo muito semelhante. A fim de esclarecer o mecanismo molecular e os fatores celulares envolvidos, mais estudos são necessários.

1.1 JUSTIFICATIVA

Os arbovírus são transmitidos através da picada de insetos vetores (*ARthropod-BOrne virus*) para hospedeiros suscetíveis, e têm ganhado importante destaque devido a facilidade de disseminação de doença e manifestação de surtos, como por exemplo Dengue, Febre Amarela, Zika e febre do Oropouche. OROV é um vírus emergente de elevada importância em saúde pública no Brasil, sendo uma das principais arboviroses transmitidas no país. Apesar do vetor que transmite o vírus OROV no ciclo selvagem (*Aedes serratus*) estar concentrado na região equatorial, com as mudanças climáticas e a intensificação de desmatamentos, espera-se que a área de infestação do mosquito se expanda, tendo potencial para gerar novas epidemias em grandes centros urbanos. O fato de seu genoma ser constituído de RNA segmentado torna elevado o potencial de mutações e rearranjos, podendo inclusive participar no aparecimento de novas espécies virais, como o vírus Jatobal (um Bunyavírus que contém o segmento menor de RNA do OROV) (Saeed, 2001). Apesar da variedade e complexidade da família *Bunyaviridae*, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares específicos utilizados durante o ciclo replicativo, em especial nos processos de montagem e brotamento dos vírions. Diante do exposto, torna-se importante investigar como o OROV manipula o sistema de endomembranas celular, para, desta forma, promover estratégias que visem inibir a replicação deste *Orthobuniavirus*, e que potencialmente pode ser aplicada aos demais vírus da família *Bunyaviridae*.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Verificar se a proteína Rab27a está envolvida no ciclo replicativo do vírus Oropouche.

1.2.2 Objetivos específicos

1.2.2.1 Verificar o efeito do silenciamento de Rab27a em células infectadas pelo OROV na biogênese de fábricas virais e produção de progênie viral;

1.2.2.2 Analisar o padrão de distribuição de Rab27a e proteínas do vírus OROV ao longo do período de um ciclo replicativo.

2. ARTIGO CIENTÍFICO

Formato exigido pelo periódico “PLOS PATHOGENS”
(<http://journals.plos.org/plospathogens/>).

AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DA PROTEÍNA CELULAR RAB27A NO BROTAMENTO E LIBERAÇÃO DE ORTHOBUNYAVIRUS UTILIZANDO O VÍRUS OROPOUCHE COMO MODELO

Cristina Santos da Costa¹, Érika Czernisz¹, Andréia Nogueira de Carvalho¹, Natalia da Silva Barbosa¹, Luis Lamberti P. da Silva¹

1. Centro de Pesquisa em Virologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP, Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil.

Correspondência:

Dr. Luis Lamberti P. da Silva

Email: lldasilva@fmrp.usp.br

Instituições Financiadoras:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

RESUMO

O vírus Oropouche (OROV) pertence à família *Bunyaviridae*, gênero *Orthobunyavirus*, e é considerado o causador de uma das arboviroses com maior importância em saúde pública no Brasil. Responsável por grandes surtos em diferentes países da região equatorial da América, demonstra um elevado potencial emergente. Apesar de sua relevância, pouco se conhece quanto aspectos específicos do ciclo replicativo do OROV, pois a maior parte do conhecimento gerado sobre o gênero *Orthobunyavirus* provém de estudos do vírus Bunyamwera, protótipo do gênero. O presente estudo tem por objetivo elucidar mecanismos utilizados pelo OROV para a liberação de sua progênie viral, hipotetizando-se que o vírus seja capaz de manipular o sistema de secreção celular, e utilizar proteínas como Rab27a para externalizar novas partículas virais. Para testar tal hipótese, a expressão de Rab27a foi suprimida por siRNA em células HeLa anteriormente a infecção. Análises do sobrenadante dessas células 18h pós-infecção demonstraram uma diminuição do percentual de vírus liberado em relação às células não silenciadas, sugerindo que a presença de Rab27a deve ser importante para a liberação da progênie viral. Além disso, análises por imunofluorescência confocal apresentaram a proteína Rab27a em regiões adjacentes a proteínas virais na periferia das células, o que pode ser um indício de uma possível interação direta ou indireta entre tais proteínas. Para confirmar essa hipótese e compreender como ocorre essa possível relação, mais testes serão realizados.

INTRODUÇÃO

Diversos fatores ambientais e antropológicos têm modificado a localização geográfica de insetos que servem como vetores de transmissão para diferentes arbovírus, o que, somado a grande capacidade de adaptação dos vírus de RNA, resulta em extensos surtos de doenças emergentes como dengue, zika, chikungunya e febre do Oropouche [1-5]. Essa última tem como agente causador o vírus Oropouche (OROV). Classificado taxonomicamente dentro da família *Bunyaviridae*, gênero *Orthobunyavirus*, OROV foi isolado pela primeira vez em Trinidad e Tobago em 1955, e, desde então, gerou importantes surtos na região equatorial da América, infectando mais de 500 mil pessoas [6-7]. Desde seu primeiro isolamento no Brasil, em 1961, o vírus foi responsável por numerosos surtos notificados nos estados da região amazônica [5, 8-10]. A alternância entre os ciclos silvestres e urbanos é um fator determinante para a manutenção dos arbovírus na natureza; no caso do OROV, acredita-se que o ciclo silvestre ocorra através do mosquito *Aedes serratus* (possível vetor de transmissão) e animais como macacos, preguiças e aves silvestres. Já no ciclo urbano, em que ocorrem as extensas epidemias, o homem é infectado através da picada do mosquito *Culicoides paraensis*, popularmente conhecido por maruim ou borrachudo [11]. Diante de tantas condições propícias para o seu alastramento, faz-se necessário mais estudos para entender tópicos importantes da biologia do vírus, e, desta forma, preparar o sistema de saúde para uma epidemia já eminente.

A família *Bunyaviridae* é considerada a maior e mais diversa família de vírus de RNA, com mais de 300 vírus sorologicamente distintos descritos até o momento, divididos em 5 gêneros (quatro deles infectam animais e um infecta plantas) [12]. O genoma tri-segmentado de RNA fita-simples e polaridade negativa dos *Bunyavirus* codifica quatro proteínas estruturais (N, L, Gc e Gn) e duas não-estruturais (NSs e NSm) [13]. Envoltos por um envelope lipídico, com espículas formadas por heterodímeros das glicoproteínas Gc e Gn, os *Orthobunyavirus* apresentam forma esférica e medem de 80-120 nm de diâmetro [13]. Ainda que a ultraestrutura do vírus Oropouche não tenha sido revelada até o momento, espera-se que seja muito semelhante aos demais membros desse gênero.

A entrada dos *Orthobunyavirus* nas células ocorre por meio de endocitose mediada por clatrina, incentivada pela interação entre as glicoproteínas virais, Gc e Gn, com receptores celulares ainda não descritos [14]. A replicação do vírus ocorre no citoplasma celular, com produção

inicial de mRNA que será traduzido em proteínas virais. As proteínas codificadas pelo segmento M são traduzidas em ribossomos associados ao retículo endoplasmático rugoso, e imediatamente translocadas para o lúmen da organela durante sua síntese, onde serão clivadas em Gc e Gn e transportadas para o complexo de Golgi – passo essencial para que sejam devidamente glicosiladas – e, por meio de um sinal de retenção ao Golgi encontrado em Gn, se acumulem numa região específica, modificando a membrana da organela [15,16]. A proteína do nucleocapsídeo (N) é expressa em ribossomos livres no citosol e interage com o genoma e o antígenoma do vírus (RNA polaridade positiva). A grande quantidade de proteína N associada ao antígenoma ativa a polimerase viral (RdRp, codificada pelo segmento L); essa, por sua vez, irá sintetizar cópias dos três segmentos do genoma [13].

Os complexos formados pelos segmentos de RNA polaridade negativa com as proteínas N e L (ribonucleoproteínas) são transportados para as regiões modificadas do complexo de Golgi, onde interagem com Gc e Gn, e formam as partículas virais que brotam na forma de estruturas vesiculares [17]. Acredita-se que muitos *Bunyavirus* utilizam-se da via secretória a partir do complexo de Golgi como trajetória para promover a liberação das partículas virais da célula hospedeira. Nessa via de transporte intracelular, vesículas brotam do *trans*-Golgi e são direcionadas para a membrana plasmática, com a qual fusionam-se para liberar a progênie viral [17-19]. Tal processo envolve diversas proteínas reguladoras e acessórias para seleção da carga transportada, marcação e endereçamento da vesícula para a região alvo. Dentre esses fatores celulares está a GTPase monomérica Rab27 e seus efetores [20]. Existem duas isoformas de proteínas Rab27, denominadas Rab 27a e Rab27b, com funções diferentes. Enquanto Rab27b está localizada em endossomos multivesiculares (MVE) perinucleares e parece estar envolvida no endereçamento deles para a membrana plasmática, Rab27a se mostra necessária para a entrega e fusão dessas estruturas com a membrana plasmática e, assim, liberação de suas vesículas intraluminais no meio extracelular, onde recebem a denominação de exossomos ou vesículas extracelulares [21-23]. Considera-se que o processo de replicação viral do OROV seja como o descrito para os *Orthobunyavirus*. Contudo, é imprescindível que os fatores celulares envolvidos sejam elucidados e que a regulação de cada etapa seja descrita com maior clareza.

RESULTADOS

A expressão de Rab27a parece ser importante para a liberação da progênie de OROV em células humanas

Rab27a é uma GTPase monomérica importante no processo de exocitose celular, sendo atribuído a essa proteína um papel chave na fusão e liberação de vesículas a partir da membrana plasmática para o meio extracelular. Para testar se tal proteína também é responsável pela liberação de OROV de células infectadas, a expressão de Rab27a foi silenciada por meio da técnica de RNA de interferência em células HeLa. Após 36h da transfecção do siRNA, as células foram infectadas com OROV em uma M.O.I. 1. Análises de western blot foram realizadas com o tempo de 18h p.i., referente a um ciclo de infecção (Fig 1A).

A quantidade de vírus presente nas amostras foi relacionada à detecção da proteína do nucleocapsídeo viral (proteína N), quantificada no *software Image Lab*. A quantidade de proteína N encontrada no lisado celular de células controle (não silenciadas para Rab27a) foi utilizada para normalizar os dados, de forma que foi atribuído o valor de 100% para o dado de densitometria obtido para essa amostra (Fig 1B). O *knockdown (KD)* da proteína Rab27a levou a uma diminuição da quantidade de proteína N presente no lisado celular, representando 44% da quantidade encontrada no controle. Houve também uma redução na quantidade de proteína N encontrada no sobrenadante das células controle e *KD* para Rab27a, representando respectivamente: 70% e 8% dos níveis presentes no lisado celular das células controle.

Com o intuito de compreender se a liberação proporcional de vírus é modificada pelo silenciamento de Rab27a, calculamos a fração de proteína N encontrada no sobrenadante em relação ao total de proteína N quantificada em cada amostra (sobrenadante/sobrenadante + lisado celular). Foi possível verificar que o *KD* de Rab27 diminuiu a quantidade de partículas virais liberadas, correspondendo a 41% do total de proteína N externalizada no controle, e 15% nas células silenciadas (Fig 1C). Tais dados são resultantes da média entre dois experimentos independentes, e um terceiro será feito para a realização de uma análise estatística.

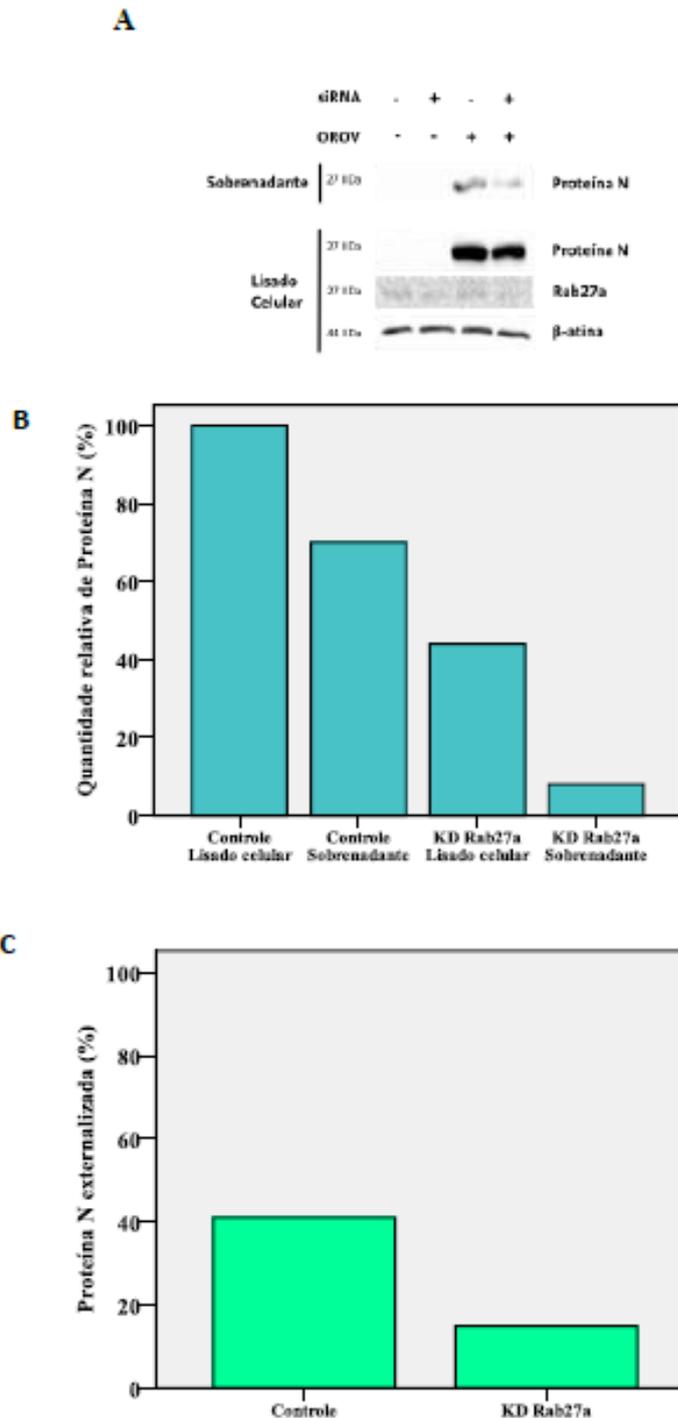


Figura 1: Silenciamento de Rab27a interfere na externalização do vírus Oropouche. Células HeLa foram silenciadas com siRNA e infectadas com OROV em uma MOI de 1. A) Análises por meio de western blot foram realizadas após ultracentrifugação do sobrenadante e lise do *pellet* celular. A presença do vírus Oropouche foi verificada através da imunomarcagem da proteína N (proteína do nucleocapsídeo) e análise densitométrica das bandas usando o *software* Image Lab (Biorad); o silenciamento de Rab27a em cada grupo está sinalizado na imagem. B) A partir da média de dois experimentos, a quantidade relativa da proteína N é demonstrada com base

na quantidade obtida no lisado celular de células infectadas e não silenciadas (controle), e normalizada como 100%. Desta forma, é possível verificar que o total de proteína N no lisado de células silenciadas para Rab27a representa 44% de sua quantidade em relação ao lisado controle, e sua quantidade detectada no sobrenadante de células silenciadas também é menor do que a encontrada no sobrenadante controle. C) A porcentagem de proteína N externalizada foi calculada a partir da fração dessa proteína detectada no sobrenadante pelo total de proteína N da amostra (sobrenadante + lisado celular), resultante numa menor liberação de vírus nas células com KD de Rab27a (15%) em comparação à externalização nas células controle (41%).

A proteína Rab27a é encontrada adjacente à sítios subcelulares contendo proteína do OROV 18h pós infecção

Através da técnica de imunofluorescência indireta, e visualização com microscopia confocal, a infecção de OROV em células HeLa foi acompanhada em diferentes tempos pós-infecção (0, 3, 6 e 18h) com o intuito de observar se o vírus possui a capacidade de modificar a localização subcelular da proteína Rab27a e da proteína TGN46 (residente do trans Golgi).

A figura 2A representa o controle negativo, com a distribuição intracelular das proteínas Rab27a e TGN46 sem infecção. No período de 3h p.i., algumas proteínas virais começam a ser produzidas (Fig 2B). No tempo de 6h p.i. (Fig 3C) estruturas que podem representar as fábricas virais começam a ser visualizadas, e a distribuição das proteínas Rab27a e TGN46 apresenta-se muito semelhante ao controle negativo. Já na figura referente ao tempo de 18h p.i., a infecção de OROV demonstra estar mais adiantada, com o aparecimento de muitas “fábricas virais” e presença de proteínas virais também em regiões periféricas da célula, fato concomitante com mudanças na morfologia do trans Golgi, com uma maior dispersão das proteínas TGN46. Além disso, no mesmo período foi possível visualizar uma colocalização parcial entre as proteínas virais (marcadas com anti-OROV) e Rab27a em regiões periféricas da célula, o que pode indicar um possível recrutamento de Rab27a para os sítios de produção viral antecedendo a liberação da progênie viral. Para confirmar e detalhar essa hipótese, esse experimento será repetido com intervalos menores de tempo, além da realização de outros experimentos com abordagens diferentes.

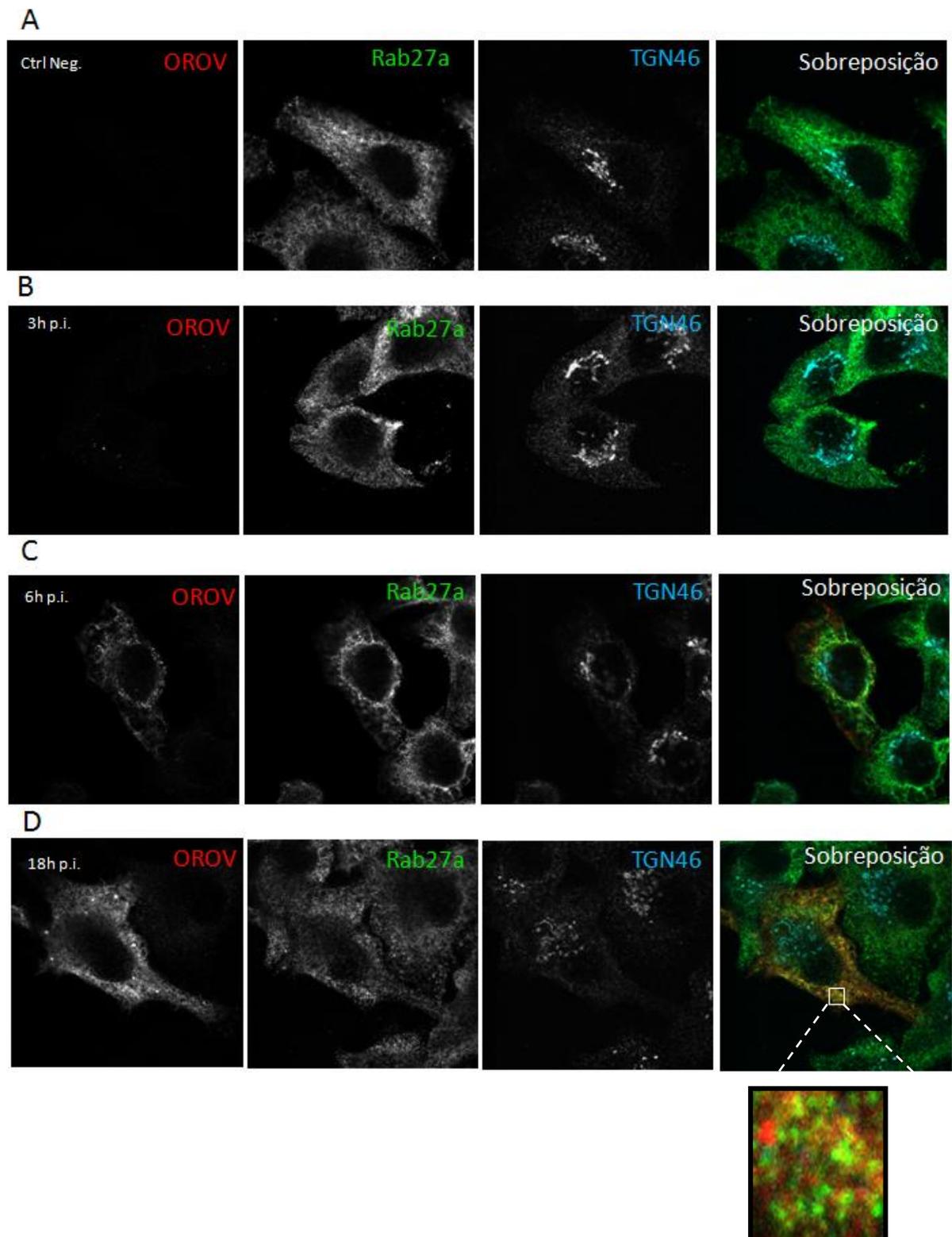


Figura 2: Time Course da infecção por OROV. Células HeLa infectadas com OROV em uma MOI de 1 foram marcadas com anticorpos anti-Rab27a e anti-TGN46, e analisadas por microscopia confocal. O vírus foi visualizado através do canal 594 (vermelho), Rab27a do 488 (verde) e TGN46 do 647 (ciano). A) No controle negativo, sem a infecção de OROV, Rab27a apresenta-se dispersa pela célula em pontos e TGN46 acumula-se na região perinuclear. B) Após 3h de infecção, poucas proteínas virais foram produzidas e o padrão de distribuição

de Rab27a e TGN46 são os mesmos que no controle negativo. C) No tempo de 6h p.i., proteínas virais começam a se acumular em pontos, nas chamadas fábricas virais. Não há alterações no padrão de Rab27a e TGN46. D) No período de 18h p.i., as fábricas virais já estão maiores e proteínas virais são encontradas também em regiões mais periféricas da célula, onde há colocalização com Rab27a (pontos amarelos). As proteínas do trans Golgi, TGN46, alteram seu padrão, encontrando-se mais dispersas.

Discussão

Até o momento, os fatores celulares envolvidos na liberação dos Bunyavirus não foram bem elucidados. Shi e colaboradores (2010) analisaram o ciclo de replicação do vírus Bunyamwera, o *Orthobuniavirus* mais bem caracterizado, através de ensaios com o vírus expressando a glicoproteína Gc fusionada à proteína fluorescente GFP. Nesse estudo, verificaram que as partículas virais montam e brotam em estruturas vesiculares em membranas do complexo de Golgi, e são transportadas através do citoplasma de forma dependente de microtúbulos. As proteínas e o mecanismo celular que integram esse transporte, bem como, a fusão dessas estruturas com a membrana plasmática para a liberação dos vírions ainda não foram identificados.

A proteína celular Rab27a, membro da família de pequenas GTPases monoméricas, possui papel chave na fusão de vesículas intracelulares com a membrana plasmática. Juntamente com Rab27b e Rab35, forma um conjunto de proteínas Rab responsáveis pelo tráfego e liberação de vesículas exocíticas. Manipulada por diferentes tumores e vírus, Rab27a tem sido bastante estudada em contextos patológicos [25,26,27,28], mas sua possível função no ciclo replicativo dos Bunyavirus ainda não foi demonstrado.

Primeiramente, foi caracterizado os efeitos do silenciamento por RNAi da proteína Rab27a na liberação do vírus Oropouche em células HeLa. Nossos resultados sugerem que as células silenciadas apresentam menos partículas virais no sobrenadante, bem como no lisado celular. Como a função celular de Rab27a é bem caracterizada, e não há trabalhos na literatura que sugerem uma possível participação sua na via de endocitose, especulamos que a diminuição da proteína N também no lisado de células silenciadas para Rab27a é causada pela degradação das

proteínas virais quando o processo de externalização da progênie é prejudicado. Para testar essa hipótese, iremos repetir o experimento acrescentando também inibidores de proteossomos ou de lisossomos.

Com o objetivo de visualizar a localização subcelular dessas proteínas com microscopia confocal, foi revelada pelas análises subsequentes uma colocalização parcial entre proteínas virais e Rab27a após 18h de infecção, período necessário para que novas partículas virais sejam liberadas da célula. Tal resultado pode indicar uma possível necessidade do vírus OROV de recrutar Rab27a para a secreção da progênie viral. Estudos com outros vírus envelopados mostraram também a participação dessa GTPase monomérica no ciclo replicativo. Um estudo com o vírus Herpes Simplex (HSV) demonstrou que a depleção da proteína Rab27a por shRNA ocasionou numa redução na produção de partículas virais em células infectadas [27 Bello-Morales et al., 2012]. Rab27a também está envolvida no tráfego e liberação de progênie do vírus Citomegalovírus humano (HMVB), e, além disso, sua expressão parece ser importante na produção das partículas virais de HMVB [28].

Juntos, estes resultados preliminares sugerem que Rab27a pode estar envolvida na liberação de partículas virais de OROV para o meio extracelular. Para confirmar essa hipótese, mais experimentos serão realizados com o objetivo de esclarecer se há interação entre Rab27a e proteínas do OROV, e quais outros fatores celulares podem estar relacionados. Os dados apresentados são os primeiros a identificar possíveis fatores integrados entre o vírus e a célula hospedeira para liberação de sua progênie, e irá contrinuir para o entendimento da biologia do vírus Oropouche e da família *Bunyaviridae*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Cultura celular, siRNA e anticorpos

As linhagens celulares Vero e HeLa CCL2 (ATCC) foram mantidas em placas ou garrafas de cultura com meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) suplementado com 10% de

soro fetal bovino (SFB – Sigma), e os antibióticos penicilina 100 U/mL e estreptomicina 100 µg/mL. As placas foram acondicionadas em estufa úmida a 37 °C com 5% de CO₂ até atingirem uma confluência em torno de 90%, observada com auxílio de um microscópio invertido Nikon TMS.

O silenciamento da proteína Rab27a foi feito através da técnica de RNAi (*small interfere RNA*), utilizando-se siRNA (Sigma) ressuspendido conforme instruções do fabricante (oligo senso: 5' GGGAAAAAAGAGUGGUGUA[dT][dT][dT][dT] 3'; oligo anti-senso: 5' UACACCACUCUUUUUCCCC[dT][dT][dT][dT] 3').

Anticorpos policlonais de camundongo anti-OROV, gentilmente cedidos pelo Prof. Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo (FMRP – USP), foram utilizados para as técnicas de imunofluorescência e western blot. Foram usados também anticorpo de camundongo anti-Rab27a (Abcam) e anticorpo de camundongo anti-Actina (BD Biosciences) para a técnica de western blot, e anticorpo de ovelha anti-TGN46 (Abd Serotec), e anticorpo de coelho anti-Rab27a (Abcam) para a técnica de imunofluorescência.

Estoques virais e titulação por TCID₅₀/mL

Todos os experimentos envolvendo o vírus OROV foram realizados em BSL-2 (*Biosafety Laboratory 2*). Vírus pertencentes ao protótipo de OROV brasileiro (linhagem BeAn19991) foram cedidos gentilmente pelo professor Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo (CPV-FMRP-USP).

O estoque viral foi produzido pela propagação de uma alíquota em células Vero. Dezoito horas (18h) após a infecção, os sobrenadantes dessas células foram centrifugados e filtrados em filtros de 0.22µm (Millipore.CO.USA) para reduzir debris celulares na amostra, e congelados em alíquotas a -80 °C. Foram realizadas duas passagens do vírus em células Vero a fim de aumentar o título viral. Posteriormente, uma das alíquotas de cada passagem foi descongelada para titulação pelo método de TCID₅₀/mL. O título viral foi calculado como previamente descrito [24], alcançando o valor de 10⁷ TCID₅₀/mL.

Experimentos de RNAi e infecção

Para as análises de western blot, 40 pmol de siRNA foi transfectado, em duplicatas, em placa de 6 poços (plaqueando 200.000 células por poço no dia anterior) com Lipofectamina 3000, segundo especificações do fabricante. Após 34h da transfecção, OROV diluído em DMEM suplementado com 2% de SFB (500 µL por poço) foi utilizado para infecção em uma MOI de 1. Como controle negativo, foi utilizado o mesmo volume de meio DMEM 2% SFB. Após 2 horas a 4 °C com movimentação lenta para adsorção das partículas virais, os poços foram lavados 5 vezes com PBS gelado e adicionado 2 mL de DMEM 2% SFB. A placa foi acondicionada em estufa a 37 °C com 5% de CO₂ por 18 horas (tempo correspondente a um ciclo de replicação viral). Após esse período, o sobrenadante foi recolhido, centrifugado, filtrado em microporos de 0,22 µm (para retirar debris celulares) e ultracentrifugado em colchão de sacarose 20%, a 22.200 rpm por 2 horas a 4 °C para posterior análise viral, enquanto que as células foram lavadas com PBS e suspensas da placa com 2 mM *ethylenediaminetetraacetic acid* (EDTA).

Análise por Western Blot

Células ressuspendidas em 2 mM EDTA foram centrifugadas (*spin*), e o *pellet* lisado com tampão de lise (1% Triton X-100, 50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 10 % glicerol, 5 mM EDTA) suplementado com inibidor de protease (*protease inhibitor cocktail*, Sigma). A quantificação de proteínas totais da amostra foi realizada pelo método de espectrofotômetro com o reagente BioRad Protein Assay (Bio-Rad). As amostras foram então submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida, transferidas para membrana de nitrocelulose e analisadas por imunoblotting com os anticorpos citados. As análises densitométricas foram realizadas com o software Image Lab (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, EUA).

Ensaio de colocalização ao longo do tempo

No dia anterior ao experimento, foram plaqueadas 100.000 células por poço em placa de 24 poços com lamínulas de vidro de 13 mm de diâmetro. Atingida a confluência média de 70%, as células foram infectadas com OROV em uma MOI de 1, diluído em DMEM 2% SFB para um volume final de 150 µL por poço. No controles negativo, foi adicionados 150 µL de DMEM

2%. Após duas horas de adsorção a 4 °C, a placa foi mantida em estufa a 37 °C, com 5% de CO₂. Cada poço foi lavado com PBS e fixado com 4% paraformaldeído de acordo com seu tempo pós infecção de referência (3h, 6h, ou 18h). Imunofluorescência das lamínulas foi realizada como mencionado a seguir.

Imunofluorescência Indireta

Como descrito anteriormente, células do experimento de ensaio de colocalização ao longo do tempo de infecção foram fixadas com 4% paraformaldeído por 15 minutos. As células fixadas foram lavadas 3 vezes com PBS e permeabilizadas com solução 0,01% saponina, adicionada com solução de bloqueio (0,2% gelatina porcina diluída em PBS) por 15 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as células foram incubadas por 30 minutos a 37 °C com os seguintes anticorpos primários, diluídos em solução de bloqueio com 0,01% saponina: anticorpo de ovelha anti-TGN46, anticorpo de camundongo anti-OROV MIAF, e anticorpo de coelho anti-Rab27a. Após 5 lavagens com PBS, solução de DAPI (*4',6-diamidino-2-phenylindole*) diluído com anticorpos secundários em bloqueio com saponina foi adicionada nas células, seguido por incubação a 37 °C por 30 minutos. As lamínulas foram montadas sobre lâminas de vidro (Knittel Glase) com Fluoromount G (EM Sciences) e visualizadas em microscópio confocal Leica SP5 (Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha).

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse estudo, em especial ao Dr. Eurico de Arruda Neto pela oportunidade de utilizarmos seu BSL-2 para a manipulação do vírus.

Referências

1. Cleton N, Koopmans M, Reimerink J, Godeke GJ, Reusken C (2012) Come fly with me: Review of clinically important arboviruses for global travelers. *Journal of Clinical Virology* 55(3):191-203.
2. Domingo E (2010) Mechanisms of viral emergence. *Sciences* 41(6); 38-52.
3. Donalisio MR, Freitas ARR, Von Zuben APB (2017) Arboviroses emergentes no Brasil: desafios para a clínica e implicações para a saúde pública. *Rev Saude Publica* 51:30.
4. Lopes N, Nozawa C, Linhares R, Carvalho E (2014) Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. *Rev Pan-Amaz Saude* 5(3): 55-64.
5. Vasconcelos HB, Azevedo RS, Casseb SM, Nunes-Neto JP, Chiang JO, Cantuaria PC, Segura MN, Martins LC, Monteiro HA, Rodrigues SG, Nunes MR, Vasconcelos PF (2009) Oropouche fever epidemic in northern Brazil: epidemiology and molecular characterization of isolates. *J Clin Virol.* 44:129–133
6. Anderson CR, Spence L, Downs WG, Aitken TH (1961) Oropouche virus: a new human disease agent from Trinidad, West Indies. *Am J Trop Med Hyg* 10: 574–578.
7. Travassos da R JF, de Souza WM, Pinheiro FP, Figueiredo ML, Cardoso JF, Acrani GO, Nunes, MRT (2017). Oropouche Virus: Clinical, Epidemiological, and Molecular Aspects of a Neglected Orthobunyavirus. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 96(5) 1019–1030.
8. Azevedo RS, Nunes MR, Chiang JO, Bensabath G, Vasconcelos HB, Pinto AY, Martins LC, Monteiro HA, Rodrigues SG, Vasconcelos PF (2007) Reemergence of Oropouche fever, northern Brazil. *Emerg Infect Dis.*13:912–915.
9. Pinheiro F, Pinheiro M, Bensabath G, Causey OR, Shope RE (1962) Epidemia de vírus Oropouche em Belém. *Revista do Serviço Especial de Saude Pública* 12:13–23.

10. Pinheiro FP, Travassos da Rosa APA (1994) Arboviral zoonoses of Central and South America. Beran GW, ed. Handbook of Zoonoses. Boca Raton, FL: CRC Press, 201–225.
11. Figueiredo LTM (1999) Vírus brasileiros da família Bunyaviridae. *Medicina, Ribeirão Preto* 32: 154-158.
12. Calisher CH (1996) History, Classification, and Taxonomy of Viruses in the Family *Bunyaviridae*. In: Elliott R.M. (eds) *The Bunyaviridae. The Viruses*. Springer, Boston, MA. 1, 1-17.
13. Elliott, RM (2014) Orthobunyaviruses : recent genetic and structural insights. *Nat. Publ. Gr.* 12, 673–685.
14. Santos RI, Rodrigues AH, Silva ML, Mortara RA, Rossi MA, Jamur MC, Oliver C, Arruda E (2008) Oropouche virus entry into HeLa cells involves clathrin and requires endosomal acidification. *Virus Res. Dec* 138(1-2):139-43.
15. Patterson JL, Holloway B, Kolakofsky D (1984) La Crosse virions contain a primer-stimulated RNA polymerase and a methylated cap-dependent endonuclease. *J. Virol.* 52, 215–222.
16. Shi X, Lappin DF, Elliott RM (2004) Mapping the Golgi targeting and retention signal of Bunyamwera virus glycoproteins. *J. Virol.* 78, 10793–10802.
17. Shi X., van Mierlo JT, French A, Elliott RM (2010) Visualizing the replication cycle of bunyamwera orthobunyavirus expressing fluorescent protein-tagged Gc glycoprotein. *J. Virol.* 84, 8460–8469
18. Shi X, Kohl A, Li P, Elliott RM (2007) Role of the cytoplasmic tail domains of Bunyamwera orthobunyavirus glycoproteins Gn and Gc in virus assembly and morphogenesis. *J. Virol.* 81, 10151–10160.
19. Rowe RK, Suszko JW, Pekosz A (2008) Roles for the recycling endosome , Rab8 , and Rab11 in hantavirus release from epithelial cells. *Virology* 382, 239–249.
20. Zerial M, McBride H (2001) Rab proteins as membrane organizers. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 107–117.

21. Pastural E, Ersoy F, Yalman N, Wulffraat N, Grillo E, Ozkinay F, Tezcan I, Gediköglu G, Philippe N, Fischer A, de Saint Basile G (2000) Two genes are responsible for Griscelli syndrome at the same 15q21 locus. *Genomics* 63:299–306.
22. Ramalho JS , et al. (2001) Chromosomal mapping, gene structure and characterization of the human and murine *RAB27B* gene. *BMC Genet.* 2, 2.
23. Ostrowski M, Carmo NB, Krumeich S, Fanget I, Raposo G, Savina A, Moita CF, Schauer K, Hume AN, Freitas, RP, et al. (2009) Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat. Cell Biol.* 12, 19–30.
24. Reed LJ, Muench H (1938) A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Am J Hyg.* 27:493–497.
25. Dong W, Cui J, Yang J, Li W, Wang X, Li X, Lu Y, Xiao W (2015) Decreased expression of rab27a and rab27b correlates with metastasis and poor prognosis in colorectal cancer. *Discov Med* 20(112):357-67.
26. Worst TS, Meyer Y, Gottschalt M, Weis CA, von Hardenberg J, Frank C, Steidler A, Michel MS, Erben P (2017) Rab27a, Rab27b and VPS36 are downregulated in advanced prostate cancer and show functional relevance in prostate cancer cells. *Int J Oncol.*50(3):920-932.
27. Bello-Morales R, Crespillo J, Fraile-Ramos A, Tabarés E, Alcina A, López-Guerrero J (2012) Role of the small GTPase Rab27a during Herpes simplex virus infection of oligodendrocytic cells. *BMC Microbiol.* 12.
28. Fraile-Ramos A, Cepeda V, Elstak E, Van der Sluijs P (2010) Rab27a is required for human cytomegalovirus assembly. *PLoS One* 5, 1–8.

3 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O presente estudo foi o primeiro a demonstrar um possível envolvimento da proteína celular Rab27a na externalização de partículas virais do OROV. O silenciamento da expressão de Rab27a resultou em uma menor detecção de proteínas virais no sobrenadante de células infectadas. Além disso, imagens obtidas por microscopia confocal revelaram uma colocalização parcial entre proteínas virais e Rab27a, o que corrobora com nossa hipótese.

Com o intuito de confirmar tal participação de Rab27a na liberação do OROV, outros experimentos serão realizados, como a superexpressão em células HeLa de Rab27a fusionada a GFP e Rab27a mutante (constitutivamente ativo), seguida de análise por microscopia confocal do padrão de localização celular de ambas no contexto da infecção por OROV. Padronizaremos também outros testes que visem confirmar e esclarecer a via de liberação da progênie viral.

REFERÊNCIAS GERAIS

- ACRANI GO, TILSTON-LUNEL NL, SPIEGEL M, WEIDMANN M, DILCHER M, ANDRADE DA SILVA DE, NUNES MR, ELLIOTT RM. Establishment of a minigenome system for Oropouche virus reveals the S genome segment to be significantly longer than reported previously. *J Gen Virol* 96: 513–523, 2015.
- ANDERSON CR, SPENCE L, DOWNS WG, AITKEN TH. Oropouche virus: a new human disease agent from Trinidad, West Indies. *Am J Trop Med Hyg* 10: 574–578, 1961.
- AZEVEDO RS, NUNES MR, CHIANG JO, BENSABATH G, VASCONCELOS HB, PINTO AY, MARTINS LC, MONTEIRO HA, RODRIGUES SG, VASCONCELOS PF. Reemergence of Oropouche fever, northern Brazil. *Emerg Infect Dis.*;13:912–915, 2017.
- BOWDEN AT, BITTO D, MCLEES A, YEROMONAHOS C, ELLIOT R, HUISKONEN J. *Orthobunyavirus* ultrastructure and the curious tripodal glycoprotein spike. *PLoS Pathog.* 9, e1003374, 2013.
- CALISHER C.H. History, Classification, and Taxonomy of Viruses in the Family *Bunyaviridae*. In: Elliott R.M. (eds) *The Bunyaviridae. The Viruses*. Springer, Boston, MA. 1, 1-17, 1996.
- CLAIRE DESNOS, SÉBASTIEN HUET, ISABELLE FANGET, CATHERINE CHAPUIS, CAROLINE BÖTTIGER, VICTOR RACINE, JEAN-BAPTISTE SIBARITA, JEAN-PIERRE HENRY AND FRANÇOIS DARCHEN. Myosin Va Mediates Docking of Secretory Granules at the Plasma Membrane. *Journal of Neuroscience* 27 (39) 10636-10645, 2007.
- ELLIOTT RM, BLAKQORI G. Molecular biology of orthobunyaviruses. Plyusnin A, Elliott RM, eds. *Bunyaviridae: Molecular and Cellular Biology*. Norfolk, VA: Caister Academic Press, 1–39, 2011.
- ELLIOTT, RM. Orthobunyaviruses : recent genetic and structural insights. *Nat. Publ. Gr.* 12, 673–685, 2014.
- FENNER R. The classification and nomenclature of viruses. *J. gen. Viral.*, 3I, 463-470, 1976.
- FIGUEIREDO LTM. Vírus brasileiros da família Bunyaviridae. *Medicina, Ribeirão Preto*, 32: 154-158, 1999.
- FONTANA, J., LÓPEZ-MONTERO, N., ELLIOTT, R.M., FERNÁNDEZ, J.J., AND RISCO, C. The unique architecture of Bunyamwera virus factories around the Golgi complex. *10*, 2012–2028, 2012.
- FUKUDA M, KURODA TS. Slac2-c (synaptotagmin-like protein homologue lacking C2 domains-c), a novel linker protein that interacts with Rab27, myosin Va/VIIa, and actin. *J Biol Chem* 277:43096–43103, 2002.
- GONZALEZ-SCARANO F, SOLDAN SS. Emerging Infectious diseases: the Bunyaviridae. *Journal of Neurovirology Reviews*, 2005.11(5):412-423, 2002.
- GRUENBERG J, STENMARK, H. The biogenesis of multivesicular endosomes. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 317–323, 2004.

- LOZACH PY, K KÜHBACHER A, MEIER R, MANCINI R, BITTO D, BOULOY M, HELENIUS A. DC-SIGN as a receptor for phleboviruses. *Cell Host Microbe* 10, 75–88, 2011.
- NOVOA RR, CALDERITA G, ARRANZ R, FONTANA J, GRANZOW H, RISCO C. Virus factories: associations of cell organelles for viral replication and morphogenesis. *Biol. Cell* 97, 147–172, 2005.
- OSTROWSKI, M., CARMO, N.B., KRUMEICH, S., FANGET, I., RAPOSO, G., SAVINA, A., MOITA, C.F., SCHAUER, K., HUME, A.N., FREITAS, R.P. Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nat. Cell Biol.* 12, 19–30, 2009.
- PASTURAL E, ERSOY F, YALMAN N, WULFFRAAT N, GRILLO E, OZKINAY F, TEZCAN I, GEDIKÖĞLU G, PHILIPPE N, FISCHER A, DE SAINT BASILE G. Two genes are responsible for Griscelli syndrome at the same 15q21 locus. *Genomics* ;63:299–306, 2000.
- PATTERSON JL, HOLLOWAY B, KOLAKOFSKY D. La Crosse virions contain a primer-stimulated RNA polymerase and a methylated cap-dependent endonuclease. *J. Virol.* 52, 215–222, 1984.
- PINHEIRO F, PINHEIRO M, BENSABATH G, CAUSEY OR, SHOPE RE. Epidemia de vírus Oropouche em Belém. *Revista do Serviço Especial de Saude Pública* ;12:13–23, 1962.
- PINHEIRO FP, TRAVASSOS DA ROSA APA. Arboviral zoonoses of Central and South America. Beran GW, ed. *Handbook of Zoonoses*. Boca Raton, FL: CRC Press, 201–225, 1994.
- PINHEIRO FP, TRAVASSOS DA ROSA AP, VASCONCELOS PF. Oropouche fever. Feigin RD, ed. *Textbook of Pediatric Infectious Diseases*. Philadelphia, PA: Saunders, 2418–23, 2004.
- RAMALHO, J. S. et al. Chromosomal mapping, gene structure and characterization of the human and murine *RAB27B* gene. *BMC Genet.* 2, 2, 2001.
- ROWE, R.K., SUSZKO, J.W., AND PEKOSZ, A. Roles for the recycling endosome , Rab8 , and Rab11 in hantavirus release from epithelial cells. *Virology* 382, 239–249, 2008.
- SAEED MF, WANG H, SUDERMAN M, BEASLEY DW, TRAVASSOS DA ROSA A, LI L, SHOPE RE, TESH RB, BARRETT AD. Jatobal virus is a reassortant containing the small RNA of Oropouche virus. *Virus Res* 77: 25–30, 2001.
- SALANUEVA, J., NOVOA, R.R., CABEZAS, P., LO, C., CARRASCOSA, L., ELLIOTT, R.M., AND RISCO, C. Polymorphism and Structural Maturation of Bunyamwera Virus in Golgi and Post-Golgi Compartments In. 77, 1368–1381, 2003.
- SANTOS RI, RODRIGUES AH, SILVA ML, MORTARA RA, ROSSI MA, JAMUR MC, OLIVER C, ARRUDA E. Oropouche virus entry into HeLa cells involves clathrin and requires endosomal acidification. *Virus Res. Dec;* 138(1-2):139-43, 2008.

SCHMALJOHN CS, NICHOL ST. The Bunyaviridae. In *Fields Virology*, 5th ed. D.M. Knipe, P.M. Howley (eds.), Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 1741-1780, 2007.

SHI X, LAPPIN DF, ELLIOTT RM. Mapping the Golgi targeting and retention signal of Bunyamwera virus glycoproteins. *J. Virol.* 78, 10793–10802, 2004.

SHI X, KOHL A, LI P, ELLIOTT RM. Role of the cytoplasmic tail domains of Bunyamwera orthobunyavirus glycoproteins Gn and Gc in virus assembly and morphogenesis. *J. Virol.* 81, 10151–10160, 2007.

SHI X, VAN MIERLO J T, FRENCH A, ELLIOTT RM. Visualizing the replication cycle of bunyamwera orthobunyavirus expressing fluorescent protein-tagged Gc glycoprotein. *J. Virol.* 84, 8460–8469, 2010.

TRAVASSOS DA ROSA J F, DE SOUZA W M, PINHEIRO FP, FIGUEIREDO ML, CARDOSO JF, ACRANI GO, NUNES MRT. Oropouche Virus: Clinical, Epidemiological, and Molecular Aspects of a Neglected Orthobunyavirus. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 96(5), 1019–1030, 2017.

VASCONCELOS HB, AZEVEDO RS, CASSEB SM, NUNES-NETO JP, CHIANG JO, CANTUARIA PC, SEGURA MN, MARTINS LC, MONTEIRO HA, RODRIGUES SG, NUNES MR, VASCONCELOS PF. Oropouche fever epidemic in northern Brazil: epidemiology and molecular characterization of isolates. *J Clin Virol.*, 44:129–133, 2009.

ZERIAL M, MCBRIDE H. Rab proteins as membrane organizers. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 107–117, 2001.

ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA PLOS PATHOGENS

1 Abstract

2 Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit.
3 Vestibulum adipiscing uma ut lectus gravida, vitae blandit tortor
4 interdum. Donec tincidunt porta sem nec hendrerit. Vestibulum nec
5 pharetra quam, vitae convallis nunc. Mauris in mattis sapien. Fusce
6 sodales vulputate auctor. Nam lacus felis, fermentum sit amet nulla
7 ac, tristique ultrices tellus. Integer rutrum aliquet sapien, eu
8 fermentum magna pellentesque vitae. Integer semper viverra mauris
9 vel pulvinar. Suspendisse sagittis malesuada uma. Praesent mauris
10 diam, fringilla id fringilla ac, posuere non lorem. Vestibulum mauris
11 ante, fringilla quis tortor sit amet, accumsan fermentum quam. Nulla
12 dictum consectetur leo. Ut vulputate ipsum purus, a interdum nibh
13 viverra et. Praesent aliquam sapien vel massa sodales bibendum.
14 Nulla interdum accumsan lectus, sed auctor elit accumsan a.
15 Suspendisse quis rhoncus nibh. The verum est de illic.

16

17 Author summary

18 Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit.
19 Vestibulum adipiscing uma ut lectus gravida, vitae blandit tortor
20 interdum. Donec tincidunt porta sem nec hendrerit. Vestibulum nec
21 pharetra quam, vitae convallis nunc.

22

23 Introduction

24 Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing [1].
25 Vestibulum adipiscing uma ut lectus gravida, vitae blandit tortor
26 interdum. Donec tincidunt porta sem nec hendrerit. Vestibul [2-6]
27 pharetra quam, vitae convallis nunc. Mauris in mattis sapien. Fusce
28 sodales vulputate auctor. Nam lacus felis, fermentum sit amet nulla
29 ac, tristique ultrices tellus. Integer rutrum aliquet sapien, eu
30 fermentum magna pellentesque vitae. Integer semper viverra mauris
31 vel pulvinar. Suspendisse sagittis malesuada uma. Praesent mauris
32 diam, fringilla id fringilla ac, posuere non lorem. Vestibulum mauris
33 ante, fringilla quis tortor sit amet, accumsan fermentum quam. Nulla
34 dictum consectetur leo. Ut vulputate ipsum purus, a interdum nibh
35 viverra et. Praesent aliquam sapien vel massa sodales bibendum.
36 Nulla interdum accumsan lectus, sed auctor elit accumsan a.
37 Suspendisse quis rhoncus nibh. The verum est de illic.

38

Level 1 Heading

- Use Level 1 heading for all major sections (Abstract, Introduction, Methods, Models, Results, Discussion, Acknowledgments, Supporting information).
- Bold type, 14pt font.
- Only use italics and text formatting where needed (e.g. genus and species names, genes, etc.).
- Headings should be written in sentence case (capitalize only the first word of the heading, the first word of the subheading, and any proper nouns and genus names).

NOTE: Do not cite figures, tables, supporting information, or references in the Abstract.

Reference Citations

- Cite references in brackets (for example, "[1]" or "[2-5]" or "[3,7,9]").
- References must be cited in order at first mention.

NOTE: [Brackets] should not be used for figure, table, or supporting information citations.

39 Results

40 Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit.
41 Vestibulum adipiscing urna ut lectus gravida, vitae (Fig 1)
42 interdum. Donec tincidunt porta sem nec hendrerit. Vestibulum nec
43 pharetra quam, vitae convallis nunc. Mauris in mattis sapien. Fusce
44 sodales vulputate auctor. Nam sit amet nulla lacus a, Figs 1 and 2
45 ultrices tellus. Integer rutrum aliquet sapien, eu fermentum magna
46 pellentesque vitae.

47

48 **Fig 1.** This is the Fig 1 Title. This is the Fig 1 legend.

49 **Fig 2.** This is the Fig 2 Title. This is the Fig 2 legend.

50

File Naming for Figures

- 51 • Figure files should be saved as "Fig1.tif", "Fig2.eps", etc.
- 52 • Acceptable file formats for figures are ".tif", ".tiff", and ".eps"
- 53 • Figures should be uploaded separately, as individual files.

54

55

56 Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit.
57 Vestibulum adipiscing urna ut lectus gravida, vitae blandit tortor
58 interdum. Donec p^2 et q^2 tincidunt porta sem nec hendrerit.

$$59 \quad p^2 + 2pq + q^2 = 1 \quad (1)$$

60 Vestibulum nec pharetra quam, vitae convallis nunc. Mauris
61 in mattis sapien. Fusce sodales vulputate auctor. Nam lacus felis,
62 fermentum sit amet nulla ac, tristique ultrices tellus. Integer rutrum
63 aliquet sapien, eu fermentum magna pellentesque vitae. Integer
64 semper viverra mauris vel pulvinar dolor sit amet en $(p + q)^2 = 1$.

65

66 **NOTE:** This document is presented in single-space paragraph
67 format for ease of use. Please submit your manuscript in double-
space paragraph format.

Figure Citations

- Cite figures as "Fig 1", "Fig 2", etc.
- Cite figures and tables in order.
- Do not cite "Fig 2" before "Fig 1".
- Cite multiple figures as "Figs 1 and 2", "Figs 1-3", etc.

Figure Captions

- Place figure captions in a group at the end of the manuscript file when submitting an initial or revised manuscript. Once your manuscript is accepted for publication, place each figure caption directly after the paragraph in which it is first cited
- Do not include tables within captions.
- Use bold type for the figure titles.

Display/Numbered Equation

- Format display equations in Mathtype or Equation Tools.
- Do not use Graphic Objects.
- Number equations as "(1)", "(2)", etc.

Inline Equation

- Format in regular text or as an inline equation in Mathtype or Equation Tools.
- Do not use Symbol Font.
- Do not use Graphic Objects.

68 **Genotyping** ←

69 Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit.
70 Vestibulum adipiscing urna ut lectus gravida, vitae blandit tortor
71 interdum. Donec tincidunt porta sem nec hendrerit. Omnes tuum
72 basi sunt pertinent ad nos. Nam lacus felis, fermentum sit amet nulla
73 ac, tristique ultrices tellus.

74

75 **Whole genome RFLP analysis.** ← Lorem ipsum dolor sit amet,
76 consectetur adipiscing elit. Vestibulum adipiscing urna ut lectus
77 gravida, vitae blandit tortor interdum. Donec tincidunt porta sem nec
78 hendrerit. Vestibulum nec pharetra quam, vitae. Numquam iens dare
79 tibi up.

80 **Methods**

81 Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit.
82 Vestibulum adipiscing urna ut lectus gravida, et bland sit amet
83 donec tincidunt porta sem nec hendrerit. Fido nemo. Vesti **Table 1** ←

84 **Table 1. This is the Table 1 Title.**

	Chemical W	Chemical X	Chemical Y	Chemical Z
Chemical 1	Reaction 1W	Reaction 1X	Reaction 1Y	Reaction 1Z
Chemical 2	Reaction 2W	Reaction 2X	Reaction 2Y	Reaction 2Z
Chemical 3	Reaction 3W ^a	Reaction 3X	Reaction 3Y ^b	Reaction 3Z
Chemical 4	Reaction 4W	Reaction 4X	Reaction 4Y	Reaction 4Z
Chemical 5	Reaction 5W	Reaction 5X	Reaction 5Y	Reaction 5Z

85 This is the Table 1 legend.

86 ^aTable footnotes belong here.

87 ^bFootnotes should each have a corresponding symbol in the table.

Level 2 Heading

- Use Level 2 headings for sub-sections of major sections.
- Bold type, 12pt font.
- Only use italics and text formatting where needed.
- Use sentence case.

Level 3 heading

- Use Level 3 headings for sub-sections within Level 2 headings.
- Inline, Bold type, 12pt font.
- Only use italics and text formatting where needed.
- Use sentence case.

Tables and Table Citations

- Tables should be cited as "Table 1", "Table 2", etc.
- Cite multiple tables as "Tables 1 and 2", "Tables 1-3", etc.
- Tables should be included directly after the paragraph in which they are first cited.
- Tables must be cell-based in Microsoft Word or embedded with Microsoft Excel.
- Do not use empty rows to create spacing.
- Do not include graphic objects, images, or colored text.
- See [PLOS Pathogens Table Guidelines for more complete instructions](#)

88

89 Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing dets.
90 Vestibulum adipiscing urna ut lectus gravida, vitae blandit S1 Fig
91 tortor interdum. Donec tincidunt porta sem nec S1 and S2 Tables
92 hendrerit. Vestibulum nec pharetra quam, vitae convallis nunc.
93 Mauris in mattis sapien. Fusce sodales vulputate auctor. Vestibulum
94 mauris ante, fringilla quis tortor sit amet, accumsan fermentum
95 quam. Nulla dictum consectetur leo. Ut vulputate ipsum purus, a
96 interdum nibh viverra et. Praesent aliquam sapien vel massa sodales
97 bibendum. Nulla interdum accumsan lectus, sed auctor elit
98 accumsan a. Suspendisse quis rhoncus nibh.

99

100

101

102 Acknowledgments

103 Lorem ipsum dolor sit amet, consectetur adipiscing elit.
104 Vestibulum adipiscing urna ut lectus gravida, vitae blandit tortor
105 interdum.

106

107 References

- 108 1. Doe J, Data A, van Stats J, Testperson M, Ribosome D Jr,
109 McBio GHT, et al. This is the article title. PLoS Pathog.
110 2017;13(12):e.0000000. doi: 10.1371/journal.ppat.0000000
111 2. Doe J, Data A, van Stats J, Testperson M, Ribosome D Jr,
112 McBio GHT. Intraspecific competition for food resources in
113 desert-dwelling pikas. PLoS Pathog.
114 2017;13(12):e.0000000. doi: 10.1371/journal.ppat.0000000
115 3. Doe J, Data A, van Stats J, Testperson M, Ribosome D Jr,
116 McBio GHT, et al. Bunny dynamics in cartoon landscapes.
117 PLoS Pathog. Forthcoming 2017.

118

119

Supporting Information Citations

- Format Supporting Information Citations as "S1 Fig.", "S1 Table", etc.
- Cite multiple files as "S1 and S2 Figs", "S1-S3 Figs", etc.
- It is not required to cite each Supporting Information file.

Acknowledgments

- Do not include funding or competing interests information in Acknowledgments.

References

- References should be listed after the main text, before the supporting information.
- References with more than six authors should list the first six author names, followed by "et al."
- Please see the PLOS Pathogens guide for References here: <http://journals.plos.org/plospathogens/s/submitting-guidelines#loc-references>

120 **Supporting information**

121 **S1 Fig.** This is the S1 Fig Title. This is the S1 Fig legend.

122 **S2 Fig.** This is the S2 Fig Title. This is the S2 Fig legend.

123 **S1 Table.** This is the S1 Table Title. This is the S1 Table legend.

124 **S2 Table.** This is the S2 Table Title. This is the S2 Table legend.

125 **S1 File.** This is the S1 File Title. This is the S1 File legend.

File Naming for Supporting Information

- Supporting Information files should be saved as "S1_Fig.tif", "S1_File.pdf", etc.
- All file types are supported.
- Supporting Information should be uploaded separately, as individual files.
- Please see the PLOS Pathogens guidelines for Supporting Information here:
<http://journals.plos.org/plospathogens/s/supporting-information>

Supporting Information Captions

- List Supporting Information captions at the end of the manuscript in a section titled "Supporting information"
- Use a Level 1 heading.
- Use bold type for the titles.
- Supporting Information files do not require full captions, only labels ("S1 Fig") are required.

Please also see the PLOS Pathogens Submission Guidelines which can be found here:
<http://journals.plos.org/plospathogens/s/submission-guidelines>

For assistance preparing figures, please contact figures@plos.org

For assistance with other formatting requirements, contact plospathogens@plos.org