

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**ANÁLISE DE ALTERAÇÕES NA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS
COM A IMUNIDADE INATA EM CÉLULAS HUMANAS INFECTADAS COM *Apeu*
*virus***

por
Jorge Gomes Goulart Ferreira

Belo Horizonte
Fevereiro/2015
DISSERTAÇÃO MBCM-CPqRR J.G.G. FERREIRA 2015

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**ANÁLISE DE ALTERAÇÕES NA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS
COM A IMUNIDADE INATA EM CÉLULAS HUMANAS INFECTADAS COM *Apeu*
*virus***

por

Jorge Gomes Goulart Ferreira

Dissertação apresentada com vistas à obtenção do
Título de Mestre em Ciências na área de
concentração em Biologia Celular e Molecular.
Orientação: Dr. Carlos Eduardo Calzavara Silva.
Coorientação: Dra. Jaqueline Germano de Oliveira
e Dra. Fernanda Nobre Amaral Villani.

Belo Horizonte
Fevereiro/2015

Catálogo-na-fonte

Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ

Biblioteca do CPqRR

Segemar Oliveira Magalhães CRB/6 1975

F383a Ferreira, Jorge Gomes Goulart.
2015

Análise de alterações na expressão de genes relacionados com a imunidade inata em células humanas infectadas com *Apeu virus* / Jorge Gomes Goulart Ferreira, 2015.

XV, 79 f: il.: 210 x 297 mm.

Bibliografia: 87 – 94

Dissertação (mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Pesquisas René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

1. Infecções por Vírus de RNA/imunologia 2. Vírus de RNA/patogenicidade 3. *Bunyaviridae*/isolamento e purificação I. Título. II. Silva, Carlos Eduardo Calzavara (Orientação). III. Oliveira, Jaqueline Germano de (Co-orientação) IV. Villani, Fernanda Nobre Amaral (Co-orientação).

CDD – 22. ed. – 579.25

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Centro de Pesquisas René Rachou
Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde

**ANÁLISE DE ALTERAÇÕES NA EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS
COM A IMUNIDADE INATA EM CÉLULAS HUMANAS INFECTADAS COM *Apeu*
*virus***

por

Jorge Gomes Goulart Ferreira

Foi avaliada pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Carlos Eduardo Calzavara Silva (Presidente)

Prof. Dr. Edward José de Oliveira

Prof. Dr. Paulo César Peregrino Ferreira

Suplente: Dra. Marina de Moraes Mourão

Dissertação defendida e aprovada em: 27/02/2015

Dedico este trabalho a Deus que até aqui tem me sustentado e aos meus pais, por todo amor, carinho e dedicação oferecidos ao longo de toda minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por todas as obras maravilhosas que tem feito em minha vida, pela saúde, capacidade e boa vontade para superar os meus limites e nunca desistir dos meus objetivos. Muitos foram os desafios enfrentados até então, mas a presença do Senhor sempre esteve comigo me dando forças para que eu pudesse chegar até aqui. Um agradecimento especial aos meus pais Jorge Goulart dos Santos Ferreira e Denise Valéria Gomes Goulart por toda dedicação e ensinamentos. Meus pais sempre foram exemplo de vida, pessoas guerreiras que muitas vezes abriram mão de seus próprios sonhos para que eu pudesse seguir os meus. Pai e mãe, amo muito vocês!

Agradeço a minha avó Maria de Lurdes por todo afeto e carinho, sei quantas vezes a senhora rezou por mim e me apoiou em pensamentos, acreditando que seu neto é capaz de ir muito além. Um muito obrigado a minha avó Dagmar por todo amor. Agradeço aos meus irmãos Fernando e Carolina por me apoiarem nos momentos difíceis, sempre prontos a me ajudar. Quão difícil seria essa vida se não fosse o laço de amizade e ternura que existe entre nós meus irmãos amados.

Agradeço a minha namorada Juliana por ser uma pessoa tão especial em minha vida, por oferecer tanto amor e acreditar tanto em mim. Grande parte do meu esforço vem dos sonhos que compartilhamos Ju... Te amo!

Agradeço aos meus amigos Marcus, Moisés e Gustavo por muitas vezes me fazerem esquecer as dificuldades, amigos especiais que ao meu lado sonham com um futuro muito melhor, vocês tornam esta caminhada muito mais agradável. Muito obrigado Priscila, por fazer parte da minha vida e sempre acreditar em meu potencial. Agradeço com muito carinho as amigas Camila, Marina e Ana, que sempre me apoiam, mesmo quando não mereço. Obrigado a minha amiga Renata Bottrel, que me ensinou grande parte do que sei sobre ciência e sobre a vida.

Agradeço ao Dr. Rodrigo Corrêa-Oliveira pela oportunidade de ser aluno no ICM, a Dra. Soraya Torres Gaze Jangola, que de forma efetiva me auxiliou no desenvolvimento deste projeto e muito contribuiu para meu crescimento profissional, a Dra Érica Alessandra Rocha Alves, pessoa muito especial que sempre mostrou boa vontade em sanar minhas dúvidas e me ajudar no que fosse preciso.

Agradeço a Luciana Lisboa, Ana Pacheco, Ricardo, Vinicius por toda boa vontade, e por garantirem que o trabalho de nós, pesquisadores e futuros

pesquisadores, possa sempre ser realizado com muita qualidade. Vocês foram fundamentais no desenvolvimento deste projeto.

Obrigado aos amigos do Laboratório de Imunologia Celular e molecular: Anna Carolina, Vitor, Ester, Guilherme, Carolina, Yasmin, Eneida, Roberta, Nayara, Luiza, Teresiana, Jaqueline Fiuza, Dirli, Izabella, Emerson, Talita, Stella e muitos outros que já fizeram parte desta equipe, vocês me fizeram crescer muito através do aprendizado, amizade e companheirismo.

Agradeço muito a Dra. Fernanda Nobre Amaral Villani, que mais que uma professora, tem sido uma amiga muito dedicada. A Dra. Jaqueline Germano de Oliveira, que desde minha iniciação científica tem sido uma pessoa extremamente presente, agindo não somente como orientadora, mas como alguém que realmente se preocupa com meu crescimento pessoal e profissional, me ensinando a ser um “*laser*”.

Um agradecimento especial ao meu orientador Dr. Carlos Eduardo Calzavara Silva ou simplesmente Kdu, que me acolheu em um momento que muito precisei e que tem me ensinado muito sobre ciência e vida. Obrigado Kdu por ter se tornado um grande amigo!

Enfim, agradeço a todos que de forma direta ou indireta contribuíram ao longo de minha vida para que eu chegasse até aqui.

Agradeço ao apoio financeiro das instituições FAPEMIG, CNPq e FIOCRUZ que permitiram a realização do projeto.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	XI
LISTA DE TABELAS.....	XII
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	XIII
RESUMO.....	XIV
ABSTRACT.....	XV
1 INTRODUÇÃO.....	16
2 JUSTIFICATIVA.....	19
3 OBJETIVOS.....	21
3.1 Objetivo Geral.....	21
3.1 Objetivos Específicos.....	21
4 REVISÃO DE LITERATURA.....	22
4.1 Arbovírus.....	22
4.2 Família <i>Bunyaviridae</i>	25
4.2.1 Biologia molecular dos membros da família <i>Bunyaviridae</i>	26
4.2.2 Ciclo de multiplicação viral.....	29
4.2.3 Rearranjo em vírus da família <i>Bunyaviridae</i>	31
4.3 Gênero <i>Orthobunyavirus</i>	33
4.4 <i>Orthobunyavirus</i> do grupo C.....	34
4.5 <i>Apeu virus</i>	35
4.6 Imunologia das Infecções Virais.....	36
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
5.1 Desenho metodológico.....	44
5.2 Amostras de vírus.....	45
5.2.1 Origem.....	45
5.2.2 Produção de estoques virais e <i>mock</i>	45
5.2.3 Titulação Viral por TCDI 50 (<i>Tissue Culture Infectious Doses 50%</i>).....	46
5.3 Amostras de células.....	51
5.3.1 PBMC.....	51
5.3.2 Células A549 e Vero.....	53
5.4 Infecção viral.....	54
5.4.1 Infecção de PBMC.....	54
5.4.2 Infecção de células A549 com APEUV e VSV nos períodos de 4 e 8 horas...	55
5.4.3 Infecção de células A549 com APEUV e VSV no período de 4 horas.....	56
5.5 Extração de RNA.....	57
5.6 Avaliação da Integridade do RNA.....	58

5.7	Síntese de cDNA.....	59
5.8	Quantificação da expressão de genes por PCR quantitativa em tempo real.....	60
5.9	Análise dos dados.....	61
6	RESULTADOS.....	62
6.1	Titulação Viral.....	62
6.2	Obtenção de PBMC.....	62
6.3	PBMC infectadas com APEUV.....	62
6.4	Células A549 infectadas com APEUV e VSV nos períodos de 4 e 8 horas.....	63
6.5	Infecção de células A549 com APEUV e VSV no período de 4 horas.....	65
7	DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	74
8	CONCLUSÃO.....	83
9	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	84
10	PERSPECTIVAS.....	86
11	REFERÊNCIAS.....	87

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de transmissão dos arbovírus.....	23
Figura 2: Distribuição dos Arbovírus.....	24
Figura 3: Estrutura de um vírus da família <i>Bunyaviridae</i>	26
Figura 4: Representação esquemática do RNA genômico pertencentes aos cinco gêneros da família <i>Bunyaviridae</i>	27
Figura 5: Multiplicação de vírus da família <i>Bunyaviridae</i>	31
Figura 6: Desenho esquemático do processo de rearranjo genômico entre vírus da família <i>Bunyaviridae</i>	33
Figura 7: Sinalização celular via TLR.....	39
Figura 8: Esquema metodológico.....	44
Figura 9: Fluxograma do preparo das amostras de vírus e do controle <i>mock</i>	46
Figura 10: Esquema da placa de titulação.....	48
Figura 11: Separação de PBMC por gradiente descontínuo de densidade.....	51
Figura 12: Cultura de células A549.....	54
Figura 13: Placa personalizada TaqMan® Assays (Applied Biosystems).....	61
Figura 14: Os níveis de expressão dos genes TLR9 e IFN β estão aumentados em PBMC infectadas por APEUV.....	63
Figura 15: Níveis de expressão de genes envolvidos na resposta imune inata humana (células A549).....	65
Figura 16: Avaliação da Integridade do RNA extraído de células A549 infectadas com APEUV e VSV no período de 4 horas em gel de agarose a 1%.....	66
Figura 17: Seleção do gene constitutivo (<i>housekeeping gene</i>).....	67
Figura 18: Nível de expressão dos genes avaliados.....	67
Figura 19: Avaliação da expressão de TLR3.....	68
Figura 20: Avaliação da expressão de TLR9.....	69
Figura 21: Avaliação da expressão de IFIH1 (MDA-5).....	70
Figura 22: Avaliação da expressão de ROBO3 (RIG-1).....	71
Figura 23: Avaliação da expressão de MyD88.....	71
Figura 24: Avaliação da expressão de TICAM1.....	72
Figura 25: Avaliação da expressão de IRF9.....	72
Figura 26: Avaliação da expressão de IFN β 1 (IFN β).....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação sorológica dos vírus do grupo C.....	35
Tabela 2: TLR sua localização e respectivos agonistas.....	38
Tabela 3: Tabela para cálculo TCID50 para APEUV.....	48
Tabela 4: Tabela para cálculo TCID50 para VSV.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- APEUV:** *Apeu virus*
- BUNV:** *Bunyamwera virus*
- cDNA:** Sigla em inglês para *Complementary DNA* (DNA complementar)
- CHIKV:** *Chikungunya virus*
- CPE:** Sigla em inglês para *Cytopathic effect* (Efeito citopático)
- DAMP:** Sigla em inglês para *Damage-associated molecular pattern molecules* (Padrões moleculares associados a perigo)
- DENV:** *Dengue virus*
- dsRNA:** Sigla em inglês para *Double-stranded RNA* (RNA dupla fita)
- HSV-1:** *Herpes simplex virus - 1*
- IFN:** Interferon
- IFN α :** Interferon alfa
- IFN β :** Interferon beta
- IFN γ :** Interferon gama
- IRF:** Sigla em inglês para *interferon regulatory factor* (Fator regulador de interferon)
- mRNA:** Sigla em inglês para *Messenger RNA* (RNA mensageiro)
- OROV:** *Oropouche virus*
- PAMP:** Sigla em inglês para *Pathogen-associated molecular pattern* (Padrão molecular associado a patógeno)
- PBMC:** Sigla em inglês para *peripheral blood mononuclear cell* (Célula mononuclear do sangue periférico)
- PBS:** Sigla em inglês para *phosphate buffered saline* (Tampão Salina fosfato)
- PFU:** Sigla em inglês para *plaque-forming unit* (Unidade formadora de placa)
- PRR:** *Pattern recognition receptors* (Receptores de reconhecimento padrão)
- qPCR:** PCR quantitativa
- RLR:** Sigla em inglês para *RIG-I-like receptor* (Receptor tipo RIG-I)
- SBV:** *Schmallenberg virus*
- ssRNA:** Sigla em inglês para *single-stranded RNA* (RNA fita simples)
- TLR:** Sigla em inglês para *Toll-like receptors* (Receptor tipo Toll)
- vRNA:** Sigla em inglês para *viral RNA* (RNA viral)
- VSV:** *Vesicular stomatitis virus*
- WHO:** Sigla em inglês para *World Health Organization* (Organização Mundial de Saúde)
- WNV:** *West Nile Virus*
- m.o.i.:** Sigla em inglês para *multiplicity of infection* (multiplicidade de infecção)

RESUMO

A família *Bunyaviridae* consiste em uma das maiores e mais diversificadas famílias de vírus de RNA, contendo cerca de 350 vírus sorologicamente distintos. O *Apeu virus* (APEUV) é um vírus da família *Bunyaviridae* que se destaca por seu grande potencial emergente. Isolado pela primeira no Brasil, este vírus pode causar uma doença que apresenta sintomas semelhantes aos da gripe, como febre alta, dor de cabeça e mialgia, associadas geralmente a náuseas, vômitos, fraqueza e fotofobia. Entretanto, apesar de seu potencial patogênico, pouco se sabe sobre a sua interação com o sistema imunológico humano. Com o objetivo de estudar alguns aspectos da resposta imune, principalmente a resposta inata desencadeada pela infecção do APEUV, a expressão de 19 genes (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, MyD88, IRF3, IRF5, IRF7, IRF9, IRAK4, TRAF3, TRAF6, TICAM1, JUN, ROBO-3(RIG-1), IFIH1(MDA-5), IFN α , IFN β , IFN γ) foi analisada. Para tal, foram feitos ensaios de qPCR baseados na metodologia TaqMan[®], utilizando cDNA obtido a partir de RNA total extraído de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e de células A549 (linhagem derivada de carcinoma pulmonar humano), infectadas ou não com APEUV por períodos de 4 ou 8 horas. Como controles, foram utilizadas células infectadas com o vírus da estomatite vesicular (VSV) como controle positivo de uma infecção por vírus de RNA fita simples, e células tratadas com o *mock* das amostras de vírus como controle negativo. Os dados obtidos foram analisados em *software* específico. Nossos resultados indicam que PBMC infectadas com APEUV por 4 horas (m.o.i.=1 e m.o.i.=3) induzem um aumento na expressão de TLR9 e IFN β . Quando quantificada a expressão de genes em células A549 infectadas com APEUV (m.o.i.=1 por 4 horas) comparadas com o *mock*, verificou-se um aumento da expressão dos genes TLR9, IRF3 e IRF7 e no período de 8 horas, também comparando com o *mock*, verificou-se aumento de forma significativa na expressão de TLR 9, além de um aumento na expressão de TLR3, TLR7, TRAF3, IRF7 e IFN β . Verificamos ainda que, após escolher um gene *housekeeping* através de método estatístico, células A549 infectadas com APEUV em uma m.o.i.=1, tende a aumentar a expressão dos genes IFN β e TICAM-1, fundamentais na indução de um estado celular antiviral. Estudos posteriores são necessários para a determinação dos mecanismos envolvidos na resposta imune inata humana contra o *Apeu virus*.

ABSTRACT

The *Bunyaviridae* family consists of the largest and most diverse families of RNA viruses, containing about 350 serologically distinct viruses. The Apeu virus (APEUV) is a member of the *Bunyaviridae* family that stands out for its large emerging potential. First isolated in Brazil, this virus can cause a flu-like disease with symptoms such as fever, headache and myalgia, usually associated with nausea, vomiting, weakness and photophobia. However, despite their pathogenic potential, little is known about their interaction with the human immune system. In order to study some aspects of the immune response, especially the innate response triggered by APEUV infection, the expression of 19 genes (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, MyD88, IRF3, IRF5, IRF7, IRF9, IRAK4, TRAF3, TRAF6, TICAM1, JUN, robot-3 (RIG-1) IFIH1 (MDA-5), IFN α , IFN β , IFN γ) was analyzed. For that, qPCR assays were performed based on the TaqMan method using cDNA obtained from mRNA extracted from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and A549 cells (cell line derived from human lung carcinoma) infected or not by APEUV for 4 or 8 hours. Cells infected with *vesicular stomatitis virus* (VSV) were used as a positive control of infection with single stranded RNA viruses; also *mock* infected cells were used as controls. The data were analyzed using specific software. Our results suggested that APEUV infection on PBMC induce an increase of TLR9 and IFN β expression on both situations with m.o.i=1 or m.o.i=3. On the A549 cell line, APEUV infection increased the expression of TLR9, TLR3, TLR7, TRAF3, IRF7 and IFN β using m.o.i=1 and 4h infection condition, compared to *mock* control. After using a statistical methodology to choose a housekeeping gene, we verified that APEUV infection with m.o.i=1, increase the expression of IFN β and IRF9 in A549 cells. A cell antiviral state is induced by the presence of IFN β and IRF9. Further studies are needed to determine the mechanisms involved in human innate immune response against APEUV.

1 INTRODUÇÃO

O termo arbovírus é uma contração da expressão *arthropod borne virus*, empregada para denominar um grupo de vírus, distribuídos em todo o mundo e que são transmitidos por vetores artrópodes. Neste grupo, já foram registrados mais de 500 vírus, muitos destes apresentando como principal hospedeiro seres vivos vertebrados, sendo, a maioria, considerada como agente etiológico de viroses humanas, representando um grave problema de saúde pública (GUBLER, 2001).

Os arbovírus possuem grande facilidade de dispersão sendo capazes de manter seu ciclo verticalmente, onde adultos transmitem os vírus para sua prole, ou para outros de sua espécie durante a cópula e/ou através da transmissão horizontal, contaminando o vetor invertebrado durante o processo de hematofagia em vertebrados incluindo aves, primatas e pequenos mamíferos que atuam como hospedeiros amplificadores, garantindo assim, o ciclo enzoótico do vírus (COFFEY, 2013).

Este grupo de vírus é composto predominantemente por vírus de genoma de RNA. Vírus com este tipo de genoma não possuem mecanismos de reparo altamente eficientes, e desta forma existe uma alta ocorrência de mutações durante a replicação. Os altos índices de alterações genômicas, em conjunto com a elevada população e a rápida replicação viral, conferem a estes vírus a capacidade de se adaptarem rapidamente a diferentes ambientes. Além disso, os diferentes mecanismos de replicação que estes vírus utilizam permitem, em conjunto, sua adaptação a diversos nichos biológicos, o que auxilia na propagação, tornando eminente o surgimento de novas variantes epidêmicas (STEINHAEUER & HOLLAND, 1987; DOMINGO, 2010).

Os arbovírus incluem uma ampla variedade de vírus distribuídos principalmente entre as famílias *Flaviviridae*, *Togaviridae*, *Bunyaviridae*, *Rhabdoviridae*, *Reoviridae*, *Orthomyxoviridae* e *Asfarviridae* (CLETON, 2012; CIOTA & KRAMER, 2010). Doenças causadas por estes vírus estão entre as mais importantes doenças infecciosas emergentes, representando aproximadamente 30% dos casos na última década. Arboviroses são consideradas um problema de saúde pública, tendo como principais causadores de doenças humanas os vírus pertencentes às famílias *Togaviridae*, *Flaviviridae* e *Bunyaviridae* (JONES; *et al*, 2008).

Grandes impactos ambientais decorrentes das mudanças demográficas e sociais têm beneficiado a emergência ou reemergência de arboviroses. Desmatamentos, instalação de áreas urbanas em ambientes de floresta, aumento do turismo em áreas exóticas, entre outros, favorecem os mecanismos de migração dos vírus, auxiliando que estes deixem sua ecologia natural e passem a habitar novas localizações onde artrópodes vetores e hospedeiros suscetíveis forneçam condições para o surgimento de epidemias (CLETON, 2012; GUBLER, 2001; MARKLEWITZ, 2013).

A família *Bunyaviridae* consiste em uma das maiores e mais diversificadas famílias de vírus de RNA, contendo cerca de 350 vírus sorologicamente distintos. Os vírions apresentam estrutura esférica, envelopada e com tamanho de 80 a 120 nm. O genoma é dividido em três segmentos de RNA, de cadeia simples e sentido negativo, e replicam-se no citoplasma da célula hospedeira (FLORES, 2007).

Dentro da família *Bunyaviridae*, os vírus do gênero *Orthobunyavirus* se destacam por seu grande potencial emergente, entre eles o *Apeu virus* (APEUV). Isolado pela primeira no Brasil, no ano de 1955, este vírus pode causar uma doença que apresenta sintomas semelhantes aos da gripe, como febre alta, dor de cabeça e mialgia, associadas geralmente a náuseas, vômitos, fraqueza e fotofobia (CAUSEY, *et al*; 1961; DE BRITO MAGALHÃES, *et al*; 2011).

A relação vírus-hospedeiro é um processo complexo e dinâmico no qual os vírus utilizam estratégias para burlar o sistema imunológico enquanto o hospedeiro faz o uso de mecanismos que possam prevenir e eliminar a infecção com o mínimo de danos para si. Para infectar um organismo, inicialmente o vírus precisa reconhecer, se ligar, e então, penetrar na célula alvo, migrar para o compartimento celular apropriado onde seu genoma será transcrito, traduzido e replicado para que então ocorra a montagem e exportação das novas partículas virais, permitindo que a infecção possa se espalhar para outras células susceptíveis. Por outro lado, o hospedeiro precisa reconhecer a presença do vírus e eliminá-lo de forma rápida e eficaz. Este processo geralmente ocorre em uma série de acontecimentos na qual as células infectadas e o sistema imune desempenham papel fundamental na formação de uma resposta dependente de componentes da resposta inata e adaptativa, sendo que, a resposta inata constitui a primeira linha de defesa do organismo, essencial para ativar a imunidade adaptativa celular e humoral contra estes agentes (EVERETT & MCFADDEN 1999; GUIDOTTI & CHISARI, 2001).

O conhecimento dos principais mecanismos de resposta imune contra os diversos agentes virais permite a compreensão da patogênese, bem como das diferentes estratégias do hospedeiro e do vírus envolvidas neste processo. Com o intuito de contribuir para a compreensão dos mecanismos imunológicos humanos frente à infecção pelo APEUV este projeto teve como objetivo, avaliar *in vitro* a expressão de alguns genes envolvidos na resposta imune de humanos à infecção, com o propósito de gerar informações que, no futuro, possam contribuir para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que visem limitar as infecções virais.

2 JUSTIFICATIVA

A emergência e reemergência de arboviroses são fenômenos naturais relacionados à evolução e adaptação das espécies. Entretanto, atualmente ocorre um crescente aparecimento de doenças virais, sendo algumas relacionadas a importantes epidemias em humanos. Grandes impactos ambientais decorrentes das mudanças demográficas e sociais têm beneficiado a emergência ou reemergência de arboviroses. Destas doenças, muitas são causadas por arbovírus bem estudados, mas que, até então, não ofereciam risco à saúde pública, e outras causadas por vírus que pareciam estar controladas, mas tornaram-se doenças reemergentes, como exemplo mais importante, a dengue (GUBLER, 1998; GUBLER, 2002; FIGUEIREDO, 2007).

Atualmente, a Dengue é a arbovirose emergente mais prevalente no Brasil, porém, muitas outras arboviroses também importantes, apresentam grande potencial emergente (FIGUEIREDO, 2007). Um exemplo de arbovírus emergente é o *Chikungunya virus* (CHIKV), um vírus pertencente à família *Togaviridae* e também transmitido por mosquitos do gênero *Aedes*. Desde 2005, tem causado diversos surtos em todo mundo, incluindo países localizados fora de regiões tropicais. Este vírus pode causar uma doença que varia desde um estado febril até uma doença incapacitante que provoca artralgia crônica em até 30% dos afetados pelo vírus e em alguns casos pode levar o indivíduo infectado a óbito (ROUGERON, 2014). O vírus da febre do Nilo Ocidental (*West Nile Virus* - WNV) é um arbovírus pertencente à família *Flaviviridae*, que também apresenta grande potencial epidêmico. É transmitido por mosquitos, causando infecções que na maioria das vezes são assintomáticas, mas que, podem causar desde uma doença febril leve até meningite, encefalite e em alguns casos manifestações neurológicas severas. Este vírus já causou mais de 1.300 mortes e 12.000 casos de meningite ou encefalite e em 2012 foram relatados 5.387 casos, destes 51% foram classificados como infecções neurológicas como meningite ou encefalite (MORELAND, 2014).

Existem ainda, arboviroses que são menos discutidas na literatura, mas que apresentam grande importância para saúde pública, entre elas, as causadas por vírus da família *Bunyaviridae*. Os vírus pertencentes a esta família são os únicos cujo espectro de hospedeiros inclui invertebrados, vertebrados e plantas, além de apresentarem altas taxas de recombinação e mutação. Estas características ligadas às rápidas alterações no meio ambiente contribuem para que alguns membros da

família *Bunyaviridae*, principalmente os pertencentes ao gênero *Orthobunyavirus*, sejam atualmente considerados importantes agentes infecciosos (GONZALEZ-SCARANO & SOLDAN, 2005; NICHOL; *et al*, 2000). No Brasil, a segunda arbovirose mais frequente é a febre do Oropouche. Causada pelo vírus Oropouche (OROV), um vírus da família *Bunyaviridae* que causa surtos de doença febril aguda em cidades e aldeias nas regiões da Amazônia e Planalto-Central (BASTOS; *et al*, 2012).

O APEUV é um dos vírus pertencente ao gênero *Orthobunyavirus*, que apresenta grande potencial emergente. Isolado pela primeira vez no Brasil, no ano de 1955, este vírus pode causar uma doença que apresenta sintomas semelhantes aos da gripe, e que geralmente é autolimitante durando cerca de dois a cinco dias (DE BRITO MAGALHÃES, 2011). Porém, devido ao seu potencial emergente, ao fato de que muito pouco se sabe sobre a interação desse vírus com o sistema imunológico e que, o estudo da interação de vírus patogênicos com o sistema imune permite o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que visem limitar a replicação viral e eliminar tais infecções, verifica-se a necessidade de estudos envolvendo a interação do APEUV com o sistema imunológico humano.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Quantificar, por qPCR, a expressão de genes relacionados à imunidade inata humana após infecção pelo APEUV.

3.1 Objetivos Específicos

- Quantificar a expressão dos genes relacionados com imunidade inata em PBMC infectadas com APEUV;
- Quantificar a expressão dos genes relacionados com imunidade inata em células A549 infectadas com APEUV;
- Comparar a expressão de genes relacionados com imunidade inata em células humanas infectadas com APEUV com células humanas infectadas com o vírus controle VSV.

4 REVISÃO DE LITERATURA

4.1 Arbovírus

O termo arbovírus é uma contração da expressão *arthropod-borne virus* e é empregado para denominar um grupo de vírus transmitidos por vetores artrópodes. Neste grupo, já foram registradas mais de 500 espécies de vírus, sendo que muitos destes apresentam seres vivos vertebrados como principal hospedeiro e a maioria considerada como agente etiológico de viroses humanas, representando um grave problema de saúde pública (GUBLER, 2001). O termo surgiu em 1942 para referir-se a vírus que se multiplicavam em artrópodes e que podiam ser ocasionalmente transmitidos para vertebrados. Em 1967, a WHO (*World Health Organization*) passou a considerar como arbovírus, qualquer vírus transmitido por artrópodes a um vertebrado, mantendo seu ciclo de vida entre artrópodes e vertebrados e, em 1963, este termo passou a ser oficialmente utilizado para se referir a todos os vírus carregados por vetores artrópodes (WHO, 1985; WHO, 1967).

Os arbovírus possuem grande facilidade de dispersão, e são capazes de manter seu ciclo horizontalmente ou verticalmente. A dispersão horizontal é a principal forma de dispersão utilizada por estes vírus, onde contaminam o vetor invertebrado durante o processo de hematofagia. A transmissão vertical ocorre quando artrópodes adultos transmitem os vírus para sua prole, ou para outros de sua espécie durante a cópula ou de forma interestadial que ocorre quando há a infecção em um estágio e a transmissão para o estágio seguinte. Estes diferentes mecanismos de disseminação facilitam sua dispersão, garantindo o ciclo enzoótico mantido entre vertebrados, incluindo humanos, aves e mamíferos selvagens ou domésticos, que atuam como hospedeiros amplificadores (Figura 1) (COFFEY, 2013; SIM; *et al*, 2014; GO; *et al*, 2014).

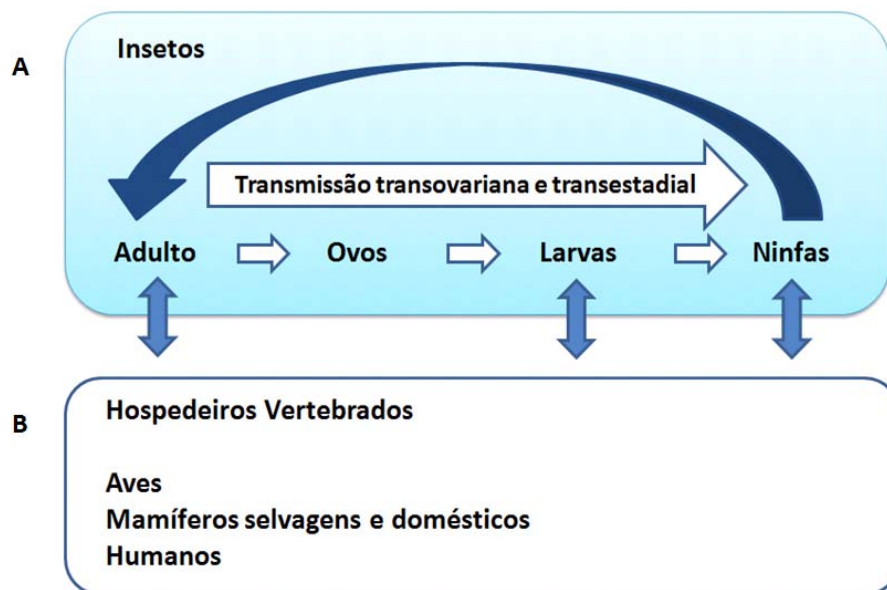


Figura 1: Ciclo de transmissão dos arbovírus – Os arbovírus possuem grande capacidade de dispersão, sendo capazes de manter um ciclo horizontal e/ou vertical. **(A)** A transmissão vertical ocorre através da transmissão do vírus, de artrópodes adultos para sua prole, para outros de sua espécie durante a reprodução ou de forma interestadial, onde o vírus é mantido no hospedeiro durante os diferentes estágios de vida. **(B)** A dispersão horizontal ocorre quando o vetor invertebrado infectado pelo vírus transmite este vírus para o hospedeiro vertebrado durante o processo de hematofagia. Adaptado de: GO; BALASURIYA; LEE, 2014.

O grupo dos arbovírus é composto em sua maioria por vírus de RNA e incluem uma ampla variedade de vírus distribuídos principalmente entre as famílias *Flaviviridae*, *Togaviridae*, *Bunyaviridae*, *Rhabdoviridae*, *Reoviridae*, *Orthomyxoviridae* e *Asfarviridae* (Figura 2) (CLETON, 2012; CIOTA & KRAMER, 2010). Doenças causadas por estes vírus estão entre as mais importantes doenças infecciosas emergentes, representando aproximadamente 30% de todas as doenças infecciosas emergentes na última década. Estes vírus são considerados um problema de saúde pública, tendo como principais causadores de doenças humanas os vírus pertencentes às famílias *Togaviridae*, *Flaviviridae* e *Bunyaviridae* (JONES; *et al*, 2008).

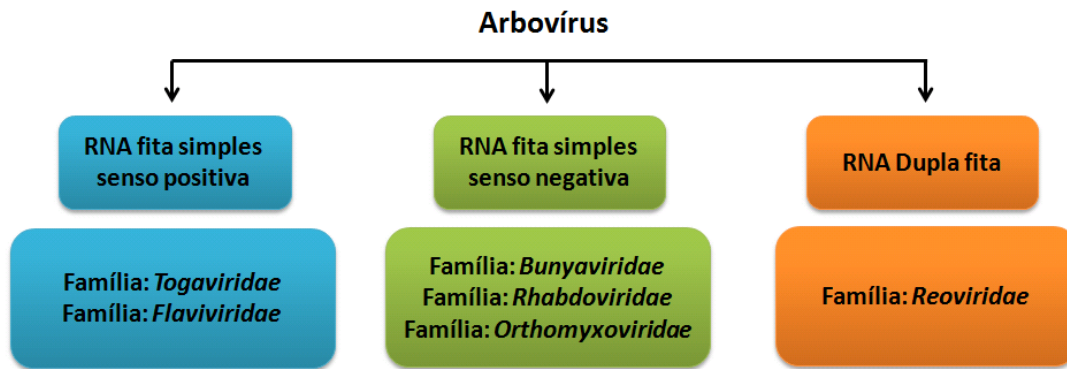


Figura 2: Distribuição dos Arbovírus – Os arbovírus são em sua maioria vírus de RNA. De acordo com sua estrutura gênômica, os arbovírus estão distribuídos principalmente entre as famílias *Togaviridae* e *Flaviviridae*, que inclui vírus de RNA fita simples de sentido positivo; famílias *Bunyaviridae*, *Rhabdoviridae* e *Orthomyxoviridae*, que incluem vírus de RNA fita simples senso negativa; e a família *Reoviridae*, composta por vírus de RNA dupla fita. Adaptado de: GO; BALASURIYA; LEE, 2014.

Grandes impactos ambientais decorrentes das mudanças demográficas e sociais têm beneficiado a emergência ou reemergência de arboviroses. Desmatamentos, instalação de áreas urbanas em ambientes de floresta, aumento do turismo em áreas exóticas, entre outros, favorece os mecanismos de migração dos vírus, fazendo com que estes deixem seu ambiente natural e passem a habitar novas localizações onde vetores artrópodes e hospedeiros susceptíveis forneçam condições para o surgimento ou ressurgimento de epidemias (CLETON, 2012; GUBLER, 2001). Muitos esforços têm sido feitos na tentativa de controlar as infecções causadas por arbovírus, porém a infecção por estes vírus continuam sendo um importante problema de saúde pública em todo mundo (MACHADO; *et al*, 2004; SIM; *et al*, 2014).

Doenças tropicais negligenciadas, como as arboviroses, estão entre as principais causas de mortalidade causadas por doenças infecciosas, em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento. Vírus como *Dengue virus* (DENV), *Chikungunya virus* (CHIKV) e vírus do Nilo Ocidental (*West Nile Virus* - WNV) têm causado muitos surtos recentes em diferentes regiões, e apesar destes arbovírus serem considerados um sério problema de saúde pública, atualmente não existem medicamentos aprovados ou vacinas disponíveis para combater essas doenças (BHAKAT, 2014). Além disso, muitas outras arboviroses também importantes, mas menos discutidas na literatura, apresentam grande potencial emergente, entre elas, infecções causadas pelos vírus da família *Bunyaviridae* (FIGUEIREDO, 2007).

4.2 Família *Bunyaviridae*

A família *Bunyaviridae* recebeu este nome devido ao isolamento do primeiro representante deste grupo em 1943, o *Bunyamwera virus* (BUNV). Este vírus foi isolado em mosquitos do gênero *Aedes*, na Uganda, durante um estudo de febre amarela. A família *Bunyaviridae* foi estabelecida em 1975, incluindo um grande número de vírus que compartilham propriedades antigênicas e morfológicas, com base em suas reações sorológicas cruzadas. Os vírus desta família são considerados os de maior distribuição mundial, podendo ser encontrados em todos os continentes, em qualquer latitude, nas mais diversas condições ambientais e em diferentes organismos (GONZALEZ-SCARANO & SOLDAN, 2005; ELLIOTT, 2014).

Consiste em uma das maiores e mais diversificadas famílias de vírus de RNA, contendo cerca de 350 espécies de vírus sorologicamente distintos. Também chamados de *Bunyavirus*, estes vírus possuem vírions esféricos ou globulares, envelopados e com diâmetro entre 80 e 120 nm, replicam-se no citoplasma da célula hospedeira e o genoma é composto por três segmentos de RNA fita simples e sentido negativo. Estes segmentos são nomeados de acordo com seu tamanho, sendo o menor fragmento chamado de S (*Small*) com cerca de 1000 nucleotídeos, o fragmento médio com tamanho próximo de 4500 nucleotídeos chamado de M (*Medium*) e o maior fragmento nomeado como L (*Large*) apresenta aproximadamente 7000 nucleotídeos (Figura 3) (FLORES, 2007).

A família *Bunyaviridae* é composta por cinco gêneros, denominados *Hantavirus*, *Nairovirus*, *Orthobunyavirus*, *Phlebovirus* e *Tospovirus*, sendo que, os quatro primeiros são capazes de causar infecções patogênicas em vertebrados, e o gênero *Tospovirus* é capaz de infectar plantas. Os vírus que apresentam potencial patogênico são agentes de doenças respiratórias, hepatite, nefrite e encefalite, tanto em humanos quanto em animais (FLORES, 2007; MARKLEWITZ; *et al*, 2013).

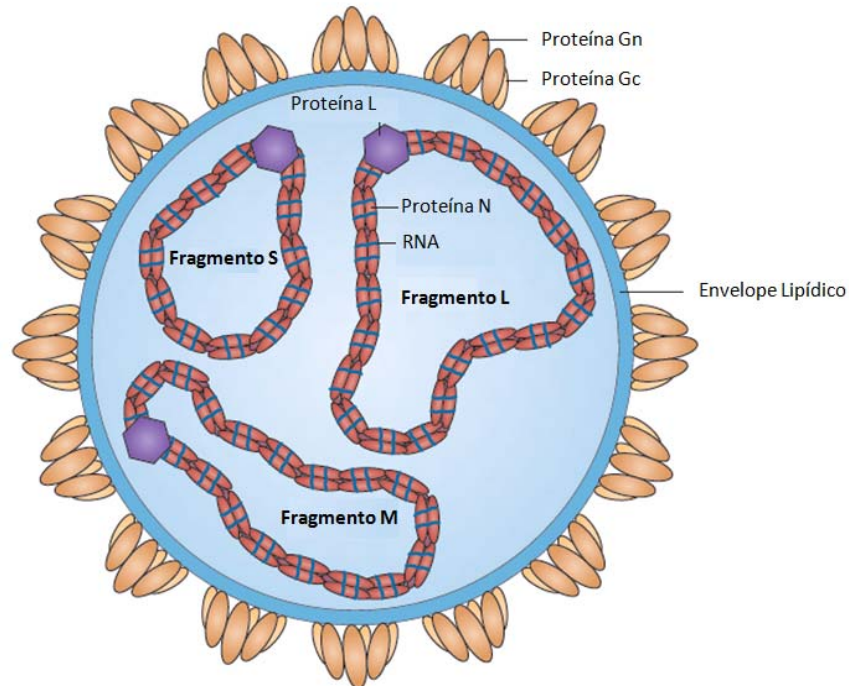


Figura 3: Estrutura de um vírus da família *Bunyaviridae* – Desenho representativo de uma partícula viral pertencente à família *Bunyaviridae*, evidencia-se o envelope lipídico; o genoma composto por três segmentos de RNA fita simples e sentido negativo. O menor fragmento chamado de S (Small) o médio chamado de M (Medium) e o maior fragmento nomeado como L (Large). Observam-se ainda as duas glicoproteínas de superfície Gn (ou G2) e Gc (ou G1); a proteína N que envolve as três formas de RNA viral senso-negativo (vRNA); a proteína L que apresenta atividade de RNA polimerase dependente de RNA. Adaptado de ELLIOTT, 2014.

4.2.1 Biologia molecular dos membros da família *Bunyaviridae*

O genoma inserido no capsídeo do vírus possui organização bastante característica, sendo composto por três fitas simples de RNA de polaridade negativa, que são nomeadas de acordo com seu tamanho em: pequeno - S (“*small*”), médio - M (“*medium*”) e grande - L (“*large*”). Os nucleotídeos da região terminal 3' e 5' de cada segmento são complementares, permitindo a formação de uma estrutura chamada de '*panhandle*' que atua como promotor tanto para o processo de transcrição quanto de replicação de cada segmento (Figura 4). Os vírions devem ser constituídos por cada um dos segmentos genômicos, porém, em alguns casos, nem sempre quantidades iguais de ribonucleocapsídeos são empacotadas durante a morfogênese viral, influenciando na diferença de tamanho dos vírions visualizados em microscópio eletrônico (SCHMALJOHN *et al.*, 2007).

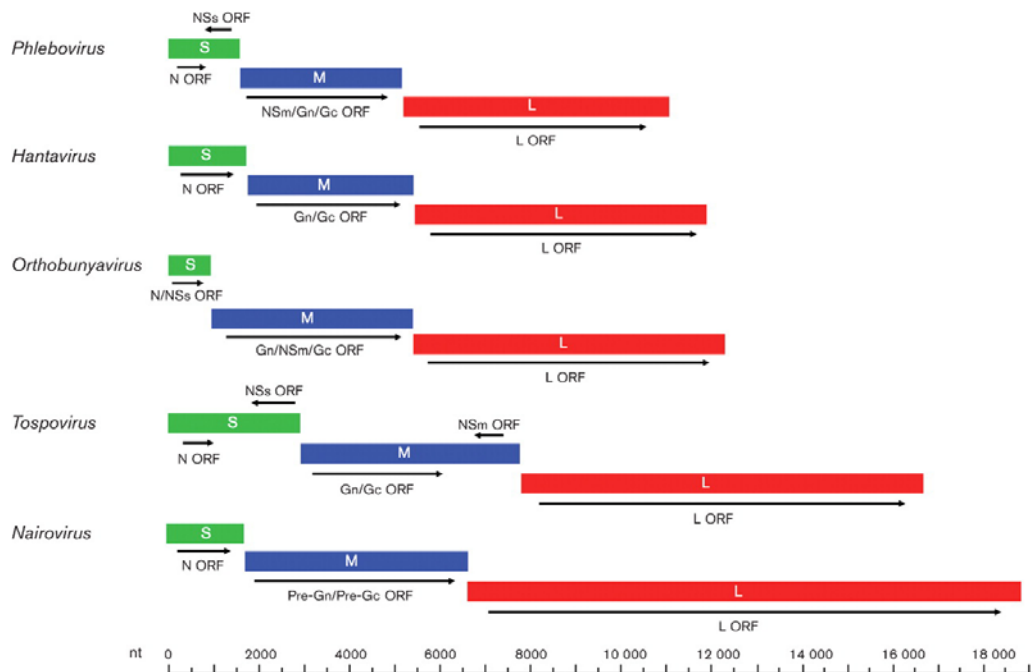


Figura 4: Representação esquemática do RNA genômico pertencentes aos cinco gêneros da família *Bunyviridae* – Todos os bunyavirus possuem três segmentos de RNA denominados: pequeno - S (“small”), médio - M (“medium”) e grande - L (“large”). As setas abaixo de cada segmento indicam ORFs que utilizam estratégia codificadora de senso negativo. Setas acima indicam ORFs transcritas no sentido positivo. *Hantavirus*, *Nairovirus*, *Orthobunyavirus* utilizam estratégia codificadora de senso negativo. *Phlebovirus* e *Tospovirus* estratégia ambisenso. Adaptado de WALTER; BARR, 2011.

O segmento L codifica uma proteína com atividade de RNA polimerase dependente de RNA, responsável pela replicação e transcrição do genoma, também chamada de proteína L ou RdRp - *RNA-dependent RNA polymerase*. O segmento M codifica um polipeptídeo que dará origem às glicoproteínas de superfície Gn (G2) e Gc (G1); e a proteína não estrutural NSm. O segmento S codifica duas proteínas, a nucleoproteína (N) e uma proteína não estrutural menor, NSS (NUNES; *et al*, 2005).

Destas proteínas codificadas pelo vírus, quatro são comuns a todos os membros da família: a polimerase viral codificada pelo segmento L; as duas glicoproteínas de superfície Gn (ou G2) e Gc (ou G1) codificadas pelo segmento M (que primeiramente codifica uma poliproteína que é posteriormente clivada em Gn e Gc) e a proteína N codificada pelo segmento S. Os vírus dos gêneros *Orthobunyavirus*, *Phlebovirus* e *Tospovirus* codificam proteínas não-estruturais, presentes no segmento M (NSm) ou no segmento S (NSs), por diferentes janelas abertas de leituras (ORF) (Figura 4) (WALTER & BARR, 2011; SCHMALJOHN *et al.*, 2007).

A função da proteína N consiste em envolver as três formas de RNA viral senso-negativo (vRNA), além do RNA antigenômico senso-positivo (cRNA), formando estruturas biologicamente ativas, que recebem o nome de ribonucleoproteínas e que protegem o genoma da degradação por RNAses. Estudos também já demonstraram que essa proteína controla a atividade da polimerase durante os processos de transcrição e replicação. É importante também no processo de empacotamento do genoma e montagem da partícula viral, uma vez que esse processo exige que a proteína N esteja ligada às fitas de RNA. Dessa forma, a proteína N tem importante papel na morfogênese e multiplicação do vírus (SCHMALJOHN & NICHOL, 2007; WALTER & BARR, 2011; ZHENG & TAO, 2013). As glicoproteínas de membrana Gn e Gc participam do processo de adsorção viral. Essas proteínas são tipicamente proteínas de membrana classe 1, cuja porção amino-terminal está exposta na superfície do vírion e a carboxi-terminal ancorada na membrana. São consideradas importantes fatores de virulência, influenciando o tipo de célula ou órgão-alvo, e a eficiência da transmissão do vírus por um determinado artrópode. Sabe-se que a proteína Gc é responsável pela adsorção do vírus à superfície das células dos vertebrados, enquanto a proteína Gn é a responsável pela adsorção às células dos artrópodes. No entanto, é provável que haja requerimento das duas glicoproteínas em ambos os casos. Apresenta também, papel importante na fusão do envelope viral à membrana do endossomo após a endocitose da partícula viral pela célula hospedeira (SCHMALJOHN & NICHOL, 2007)

A proteína NSs atua como um fator de virulência diminuindo a síntese de RNA do hospedeiro e inibindo a síntese de IFNs e a resposta celular aos IFNs, tendo importante papel na patogênese viral. Além disso, a NSs também possui a capacidade de inibir a síntese de RNAi (RNA de interferência), que poderia ser um possível mecanismo celular de inibição viral. Essa proteína parece estar também, envolvida com a regulação da função da RdRp (WEBER; *et al*, 2001; WEBER; *et al*, 2002).

A proteína não estrutural NSm acumula-se no complexo de Golgi da célula hospedeira de uma forma independente das demais proteínas virais. O fato desta proteína se deslocar para o local onde ocorre a maturação do vírus sugere que a NSm possua funções relacionadas com a montagem e brotamento do vírus. Estudos já mostraram que esta proteína não é essencial para a viabilidade do vírus, mas vírus que foram modificados que apresentavam alterações nesta proteína se multiplicavam mais lentamente que os vírus selvagens (SALANUEVA; *et al.*, 2003). É provável que

a região N-terminal desta proteína esteja envolvida na montagem do vírus, sendo que o domínio C-terminal pode funcionar como uma sequência sinal interna para a glicoproteína Gc (SHI; *et al.*, 2006).

A RNA polimerase RNA dependente (RdRp) viral é codificada por uma única janela de leitura do segmento maior L e promove a transcrição e a replicação do vírus e estas funções dependem da síntese de novas proteínas N durante o ciclo replicativo do vírus (KOCHS; *et al.*, 2002).

4.2.2 Ciclo de multiplicação viral

Os *Bunyavirus* se multiplicam exclusivamente no citoplasma da célula infectada (Figura 5), e o primeiro passo consiste na adsorção da partícula viral. Esta etapa ocorre com a interação das glicoproteínas Gn e/ou Gc com receptores presentes na superfície celular. Para maioria dos vírus da família *Bunyaviridae*, os receptores aos quais eles se ligam, não foram identificados. Após a adsorção do vírus, estes entram na célula hospedeira através do processo de endocitose mantendo-se acondicionados no endossomo. Dentro do endossomo, o ambiente acidificado faz com que a glicoproteína Gc sofra alterações conformacionais, fazendo com que o envelope viral se funda a membrana do endossomo, liberando em seguida, o genoma e a polimerase viral no citoplasma (SCHMALJOHN & NICHOL, 2007).

Quando ocorre o desnudamento do genoma viral, tem-se início o processo de transcrição primária. Nesta etapa, o RNA viral senso negativo é transcrito em mRNA através da interação da RdRp com as ribonucleoproteínas virais. A polimerase viral (RdRp) catalisa a transcrição do mRNAs, que é ativada por iniciadores derivados da célula hospedeira. Estes iniciadores são pequenas sequências ligadas ao *cap*, derivadas da célula hospedeira, que são obtidos através de clivagens, realizada pela atividade de endonuclease da proteína L, na extremidade 5' de mRNA celular. Este artifício faz com que o mRNA viral apresente em sua extremidade 5', sequências pequenas (10 a 20 nucleotídeos) que não estão presentes no RNA viral (SCHMALJOHN & NICHOL, 2007; REGUERA; *et al.*, 2010).

Os segmentos S e L são traduzidos em ribossomos livres no citoplasma e o segmento M traduzido em ribossomos associados ao retículo endoplasmático rugoso. Após a tradução, a proteína L não sofre processamento pós traducional e a polimerase já é liberada pelos ribossomos com suas atividades funcionais. A

proteína M é clivada e as proteínas formadas sofrem glicosilação primária no complexo de Golgi dando origem as glicoproteínas Gc e Gn (SCHMALJOHN & NICHOL, 2007).

O processo de replicação do genoma viral só ocorre após a interação da proteína N com o RNA complementar sintetizado a partir do RNA viral. Nesta etapa, a polimerase sintetiza uma nova fita, a partir da extremidade 3' da fita molde, sem a necessidade de um iniciador (assim como ocorria na transcrição primária), para que o transcrito formado possua o mesmo tamanho do genoma. Após sua síntese, o RNA viral associa-se as proteínas L e N formando os nucleocapsídeos que se acumulam no complexo de Golgi, ocorrendo então a morfogênese. As glicoproteínas Gc e Gn, também acumulam no complexo de Golgi sofrendo glicosilações terminais. Após estas etapas, membranas modificadas da célula hospedeira, são incorporadas através do processo de brotamento, e são liberadas pelo complexo de Golgi. Após o brotamento da membrana, as partículas virais são levadas até a membrana plasmática onde se fundem a membrana, sendo liberadas para o meio extracelular e reiniciando o ciclo. Não se conhece ainda os artifícios utilizados pelo vírus para selecionar os fragmentos do genoma que serão empacotados, mas alguns estudos mostram que a proteína N parece ter papel importante nesta etapa. (SCHMALJOHN & NICHOL, 2007).

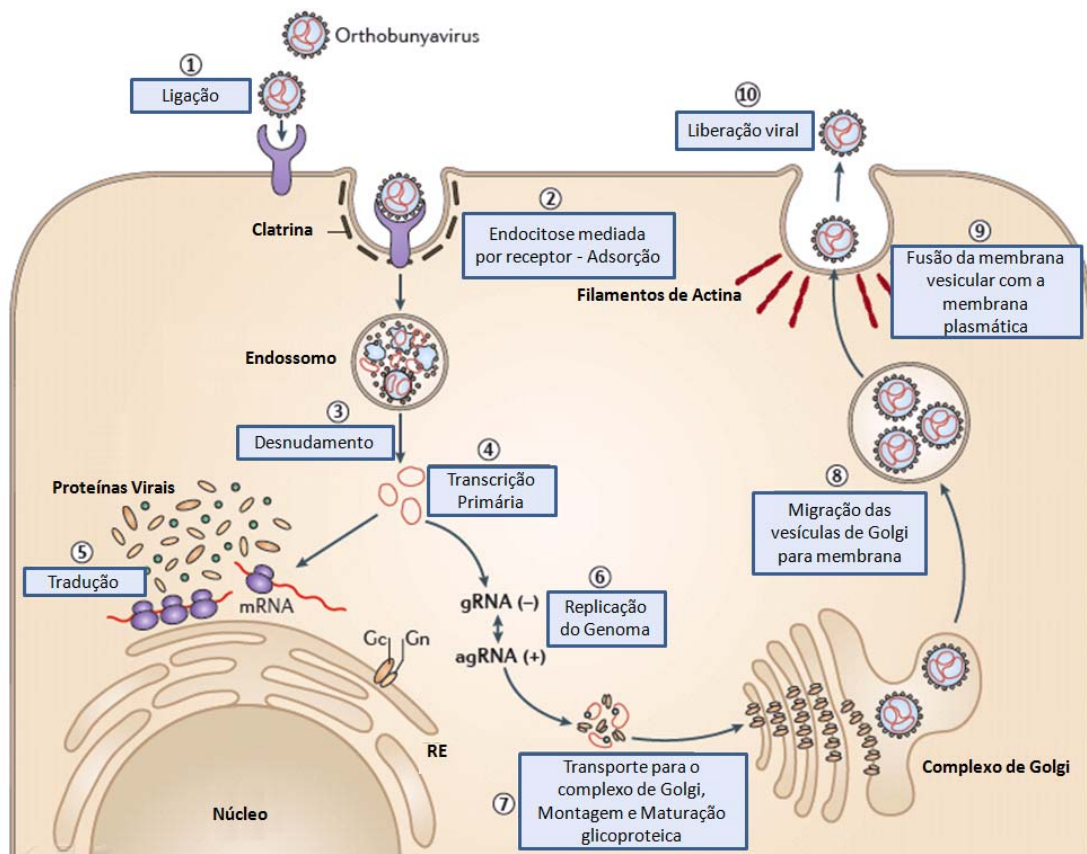


Figura 5: Multiplicação de vírus da família *Bunyaviridae* – (1) Ligação do vírus com receptor de membrana; (2) Adsorção viral que é mediada por uma ou ambas das glicoproteínas virais (Gc e Gn), ocorrendo em seguida a internalização do vírus através de endocitose; (3) Desnudamento do genoma viral que ocorre devido à acidificação do endossomo, em seguida a membrana viral se funde com a membrana do endossomo; (4) Transcrição primária que ocorre catalisada pela enzima RNA polimerase dependente de RNA (RNA-dependent RNA polymerase – RdRp) sintetizando o mRNA; (5) Tradução do mRNA. (6) Os três segmentos de sentido negativo do genoma viral são convertidos em fitas de sentido positivo para que ocorra a replicação do genoma. (7) As ribonucleoproteínas (RNP) são então transportadas para membranas do complexo de Golgi modificadas pela inserção das proteínas Gn e Gc, serão formadas então partículas virais; (8) Vesículas formadas no complexo de Golgi, contendo partículas de vírus transportam as partículas para a superfície da célula; (9) ocorre à fusão das membranas vesiculares com a membrana celular, podendo ser facilitada por filamentos de actina, (10) liberando as partículas virais no meio extracelular. Adaptado de ELLIOTT, 2014.

4.2.3 Rearranjo em vírus da família *Bunyaviridae*

Vírus com genoma de RNA são os vírus mais presentes no meio ambiente, são encontrados no meio intracelular de quase todas as formas de vida, de plantas, animais, fungos e procariontes. O sucesso evolutivo dos vírus de RNA está relacionado à sua capacidade de utilizar diferentes estratégias de replicação e de adaptar-se a diferentes nichos biológicos. Além disso, parte dessa capacidade de

adaptação relaciona-se a alta taxa de erros da RNA polimerase durante a síntese do material genético, uma vez que esta polimerase não apresenta mecanismos de reparo assim como as envolvidas na síntese de genomas de DNA. Dessa forma, o alto índice de mutações em conjunto com elevada população e rápida replicação confere a estes vírus a capacidade de se adaptar rapidamente a diferentes ambientes (STEINHAEUER & HOLLAND, 1987).

O vírus com genoma de RNA sentido negativo assim como os outros vírus de RNA apresentam sua RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) incapaz de realizar a função de revisão do genoma, gerando uma grande heterogeneidade genética entre os vírus. Este fato aliado a um genoma segmentado permite a ocorrência de alterações drásticas no genoma destes vírus, uma vez que a presença de diferentes segmentos permite que tais vírus possam sofrer, um processo de recombinação não clássica denominado rearranjo, comum entre vírus de genoma segmentado do mesmo gênero. O processo de rearranjo pode ocorrer quando, durante uma coinfeção com dois vírus distintos, como por exemplo, dois vírus da família *Bunyaviridae*, trocam segmentos entre si gerando vírus recombinantes diferentes (Figura 6) (ELLIOTT, 2014).

O processo de rearranjo ocorre apenas em vírus intimamente relacionados e embora ainda não se saiba a base molecular, existem incompatibilidades de certas combinações de segmentos do genoma. Sabe-se ainda que mosquitos que são infectados com dois vírus distintos provavelmente são hospedeiros melhores para recombinação genética, uma vez que podem se alimentar em diferentes vertebrados facilitando a chance de infecção com vírus diferentes (ELLIOTT, 2014).

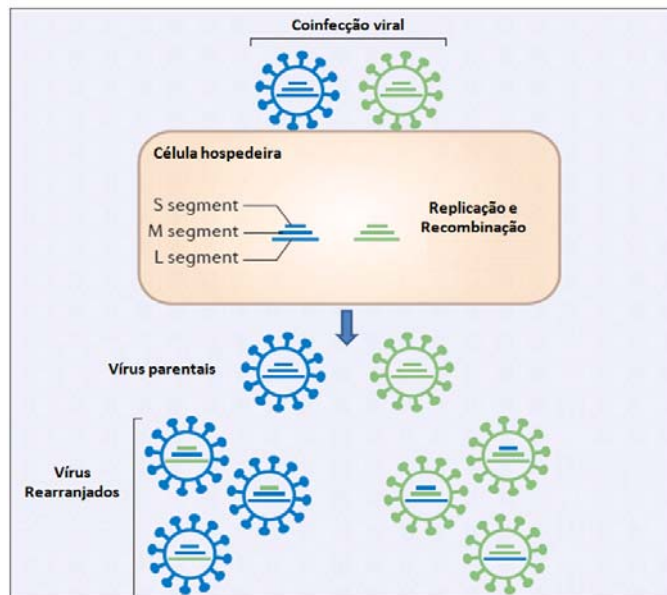


Figura 6: Desenho esquemático do processo de rearranjo genômico entre vírus da família *Bunyaviridae*. Durante um processo de coinfecção com dois vírus distintos, mas intimamente relacionados, ocorre a replicação do genoma dos dois vírus, e durante a montagem das partículas virais, é possível, além da montagem de vírus idênticos aos vírus parentais, ocorrer também a troca de segmentos entre os vírus dando origem a vírus rearranjados. Adaptado de ELLIOTT, 2014.

A grande importância deste processo de rearranjo consiste na capacidade de alterar as características do vírus. Por exemplo, o segmento M (médio), que codifica as proteínas Gn, Gc e NSm, têm uma grande influência sobre a competência vetorial, ou seja, determina a capacidade de uma espécie de artrópodes de transmitir de forma eficiente o vírus. Um vírus recombinante natural com um segmento M diferente poderia, portanto, ser transmitido por um artrópode diferente, e este novo vetor, poderia ainda ter um comportamento biológico diferente, introduzindo o vírus recombinante natural em diferentes hospedeiros (ELLIOTT, 2014).

4.3 Gênero *Orthobunyavirus*

Os vírus do gênero *Orthobunyavirus*, assim como os demais vírus pertencentes à família *Bunyaviridae*, são constituídos por três moléculas de RNA fita simples e polaridade negativa, (S, M e L). Constitui um grupo crescente de vírus emergentes capazes de causar danos à saúde humana e animal. Existe mais de 170 espécies de *Bunyavirus* classificados com o gênero *Orthobunyavirus*, o que faz deste gênero o maior dentro da família *Bunyaviridae*. Os *Orthobunyavirus* são ainda,

subdivididos em 18 sorogrupos, classificados de acordo com antígenos presentes na proteína N, que são determinados através de testes de fixação do complemento. A classificação inclui os sorogrupos: Anopheles A; Anopheles B; Bakau; Bunyamwera; Bwamba; California; Capim; Gamboa; Grupo C; Guama; Koongol; Minatitlan; Nyando; Olifantsvlei; Patois; Simbu; Tete e Turlock. Esta classificação atual pode sofrer muitas alterações, uma vez que, a maioria dos *Orthobunyavirus* é pouco conhecida em relação a sua biologia molecular, e ainda, devido à alta ocorrência de recombinação genética ao longo de sua evolução (HART; *et al*, 2009).

Grande parte desses vírus é considerada como agentes zoonóticos, e pelo menos 30 já foram reconhecidos como patógenos humanos. E, em humanos, estes vírus são capazes de causar uma variedade de sintomas auto limitantes, mas que em alguns casos podem ser severos, como por exemplo, doenças febris, encefalite e febre hemorrágica (HART *et al.*, 2009). Um exemplo de *Orthobunyavirus* que apresenta grande potencial patogênico em seres humanos é o *Oropouche virus* (ORV), que infectou mais de meio milhão de pessoas. Este vírus é o agente causador de uma doença febril conhecida como febre do Oropouche, e causou nos últimos 40 anos, mais de trinta grandes epidemias na América do Sul e Central. O *La Crosse virus* (LACV) é um vírus capaz de causar encefalite grave e meningite asséptica. É um vírus endêmico em toda Região Sul e Centro-Oeste dos Estados Unidos, mas alguns relatos recentes mostram a ocorrência desse vírus em outras regiões (BOWDEN; 2013).

Os *Orthobunyavirus* têm causado também, impactos importantes nos setores de criação de animais. O *Schmallenberg virus* (SBV), isolado em 2011 e prevalente em toda a Europa, vem causando doenças graves e muitas vezes fatais em carneiros, cabras e gado recém-nascidos. Apesar da importância deste gênero de vírus para a saúde pública e agroeconomia, muito pouco se sabe sobre os *Orthobunyavirus* (BOWDEN, 2013).

4.4 *Orthobunyavirus* do grupo C

O gênero *Orthobunyavirus* é subdividido em diferentes grupos sorológicos. O sorogrupo C foi descrito em 1950 na Amazônia, e os vírus foram isolados principalmente de seres humanos e animais silvestres. Este grupo compõe 14 vírus classificados de acordo com suas relações antigênicas (Tabela 1). De acordo com esta classificação, os vírus do grupo C podem ser divididos em quatro complexos

antigênicos, sendo eles: o complexo Caraparu, Madrid, Marituba e Oriboca (NUNES; *et al*, 2005).

Os vírus pertencentes ao grupo C ocorrem em regiões tropicais e subtropicais das Américas (Estados Unidos, México, Panamá, Honduras, Guatemala, Trinidad e Tobago, Brasil, Peru, Equador, Venezuela e Guiana Francesa) e dos 14 vírus registrados 10 são capazes de causar doenças em seres humanos, sendo eles, *Caraparu virus*, *Oriboca virus*, *Itaqui virus*, *Nepuyo virus*, *Apeu virus*, *Marituba virus*, *Murutucu virus*, *Restan virus*, *Ossa virus*, *Madrid virus* (DE BRITO MAGALHÃES, 2011).

Tabela 1: Classificação sorológica dos vírus do grupo C.

Classificação Sorológica	Espécies de vírus
Complexo Caraparu	<i>Caraparu virus</i> (CARV) <i>Ossa virus</i> (OSSAV) <i>Apeu virus</i> (APEUV) <i>Vinces virus</i> (VINV) <i>Bruconha virus</i> (BRCV)
Complexo Madrid	<i>Madrid virus</i> (MADV)
Complexo Marituba	<i>Marituba virus</i> - BeAn15 (MTBV) <i>Marituba virus</i> - 63U-11 (MTBV) <i>Murutucu virus</i> (MURV) <i>Restan virus</i> (RESV) <i>Nepuyo virus</i> (NEPV) <i>Gumbo limbo virus</i> (GLV)
Complexo Oriboca	<i>Oriboca virus</i> (ORIV) <i>Itaqui virus</i> (ITQV)

Esta classificação foi baseada nas relações antigênicas, determinadas através das técnicas de fixação de complemento, neutralização e inibição da hemaglutinação (Nunes; *et al*, 2005).

4.5 Apeu virus

Outro vírus pertencente ao gênero *Orthobunyavirus*, de grande potencial emergente, mas pouco estudado, é o *Apeu virus* (APEUV). Foi isolado pela primeira vez em Belém, no Pará, Brasil, em 1955 a partir de um macaco sentinela (*Cebus apella*) sob a designação de BeAn848, sendo classificado como um membro do grupo C, complexo Caraparu (DE BRITO MAGALHÃES; *et al*, 2011).

Este vírus pode causar uma doença que apresenta sintomas semelhantes aos da gripe, como febre alta, dor de cabeça e mialgia, associadas geralmente a náuseas, vômitos, fraqueza e fotofobia. Esta doença geralmente é autolimitante e dura cerca de dois a cinco dias (DE BRITO MAGALHÃES; *et al*, 2011). Apesar de ser um vírus patogênico ao homem, ter sido isolado a mais de cinco décadas e serem considerados potenciais arbovírus emergentes, ainda existem poucos estudos envolvendo o APEUV.

4.6 Imunologia das Infecções Virais

A relação entre o vírus e o hospedeiro é um processo complexo e dinâmico no qual o vírus utiliza estratégias para burlar o sistema imunológico enquanto o hospedeiro faz uso de mecanismos que possam prevenir e eliminar a infecção com o mínimo de danos para si. Para infectar um organismo, inicialmente o vírus precisa reconhecer, se ligar, e então entrar na célula alvo, migrar para o compartimento celular apropriado onde seu genoma será transcrito, traduzido e replicado para que, então, ocorra a montagem e exportação das novas partículas virais, permitindo que a infecção possa se espalhar para outras células susceptíveis. Em correspondência a esta ação, o hospedeiro precisa reconhecer a presença do vírus e eliminá-lo de forma rápida e eficaz, para evitar que o vírus destrua um grande número de células e cause danos severos ao organismo. Este processo geralmente ocorre em uma série de acontecimentos na qual as células infectadas e o sistema imunitário desempenham papel fundamental (GUIDOTTI & CHISARI, 2001).

A resposta imune desenvolvida contra agentes microbianos, incluindo os vírus, depende de componentes da resposta inata e adaptativa. A resposta inata é mediada principalmente por células do sangue que fagocitam organismos patogênicos, e concomitantemente modulam a resposta do hospedeiro através da síntese de mediadores inflamatórios e citocinas. Simultaneamente, células apresentadoras de antígeno, fagocitam o agente infeccioso que é degradado dentro do fagossoma, e então apresenta às células T os epítomos do agente patogênico. Este processo, geralmente, irá ativar a resposta imune adaptativa e o desenvolvimento de uma imunidade protetora de memória (ADEREM & ULEVITCH, 2000).

De uma forma geral, o controle inicial das infecções virais ocorre principalmente através da secreção dos IFN do tipo I (α e β). Macrófagos e células NK infectadas com os vírus produzem IFN tipo I que interagem com células não infectadas e induzem genes que promovem um estado antiviral nas células para protegê-las contra a infecção e, posteriormente, contribuem também com o processo de resposta imune adaptativa (MACHADO; *et al*, 2004).

Durante esta cadeia de processos, o principal desafio para o sistema imune inato consiste no discernimento de um grande número de potenciais patógenos utilizando apenas um número reduzido de receptores. Desta forma, ao longo do processo evolutivo o sistema imune inato desenvolveu a capacidade de diferenciar o próprio do não próprio, utilizando um número limitado de receptores, que são chamados Receptores de Reconhecimento Padrão - *Pattern recognition receptors* (PRR). Os PRR são capazes de identificar sequências moleculares específicas presentes em microrganismos e que foram conservadas durante a evolução, conhecidos como Padrão Molecular Associado a Patógenos - *Pathogen-associated molecular pattern* (PAMP). Dessa forma a ligação PRR-PAMP é um passo essencial na ativação da imunidade inata e, conseqüentemente, no desenvolvimento da imunidade adquirida contra os antígenos específicos (ADEREM, 2000; PAIVA-OLIVEIRA; *et al*, 2012).

Existem diferentes tipos de PRR, alguns podem ser secretados no plasma, atuando como proteínas humorais, outros podem estar presentes na membrana celular e alguns localizados no citoplasma, todos atuando como sensores na detecção de agentes patogênicos (CREAGH *et al.*, 2006; AKIRA, 2009; PAIVA-OLIVEIRA *et al.*, 2012). A resposta imune inata antiviral ocorre principalmente pelo reconhecimento de componentes virais via duas famílias de PRR: os receptores tipo toll (*Toll-like receptors* - TLR) e os receptores tipo RIG (*Nucleotide binding and leucine-rich repeat-containing receptors* - RLR) (THOMPSON & LOCARNINI, 2007).

Atualmente foram identificados 13 membros da família TLR em mamíferos. Os TLR estão presentes principalmente em leucócitos polimorfonucleares e atuam reconhecendo PAMP, expressos por diferentes agentes infecciosos, como bactérias, vírus, protozoários e fungos (Tabela 2). Estes receptores são capazes de reconhecer componentes de microrganismos estimulando a síntese e liberação de citocinas pró-inflamatórias. Os TLR reconhecem ainda, além dos PAMP, moléculas endógenas liberadas em resposta ao estresse ou dano tecidual, conhecidas como Padrão Molecular Associado ao Perigo - *Damage-associated molecular pattern*

molecules (DAMP) ou alarminas. O acoplamento aos TLR irá ativar múltiplas cascatas de sinalização que irão resultar na indução de genes envolvidos na resposta imunitária inata (Figura 7). (AKIRA, 2009; LEE; *et al*, 2012; DE MEDEIROS PINHEIRO, 2011; KONDO; *et al*, 2012).

Tabela 2: TLR sua localização e respectivos agonistas. (Ferraz; *et al*, 2011).

TLR	Localização	Agonistas derivados de patógenos
TLR 1 e TLR2	Extracelular	Lipoproteínas, lipopeptídeos, peptideoglicanos e ácido lipoteicoico.
TLR2 e TLR6	Extracelular	Ácido lipoteicoico de bactérias gram-positivas e zimosan.
TLR3	Intracelular	Fita dupla do RNA viral.
TLR4	Extracelular	Lipopolissacarídeo da parede celular de bactérias gram-negativas, proteína F de alguns vírus e oligossacarídeos do ácido hialurônico e o fibrinogênio.
TLR5	Extracelular	Flagelina de algumas bactérias gram-positivas e negativas.
TLR7 e TLR8	Intracelular	RNA viral de fita simples.
TLR9	Intracelular	DNA bacteriano e viral.

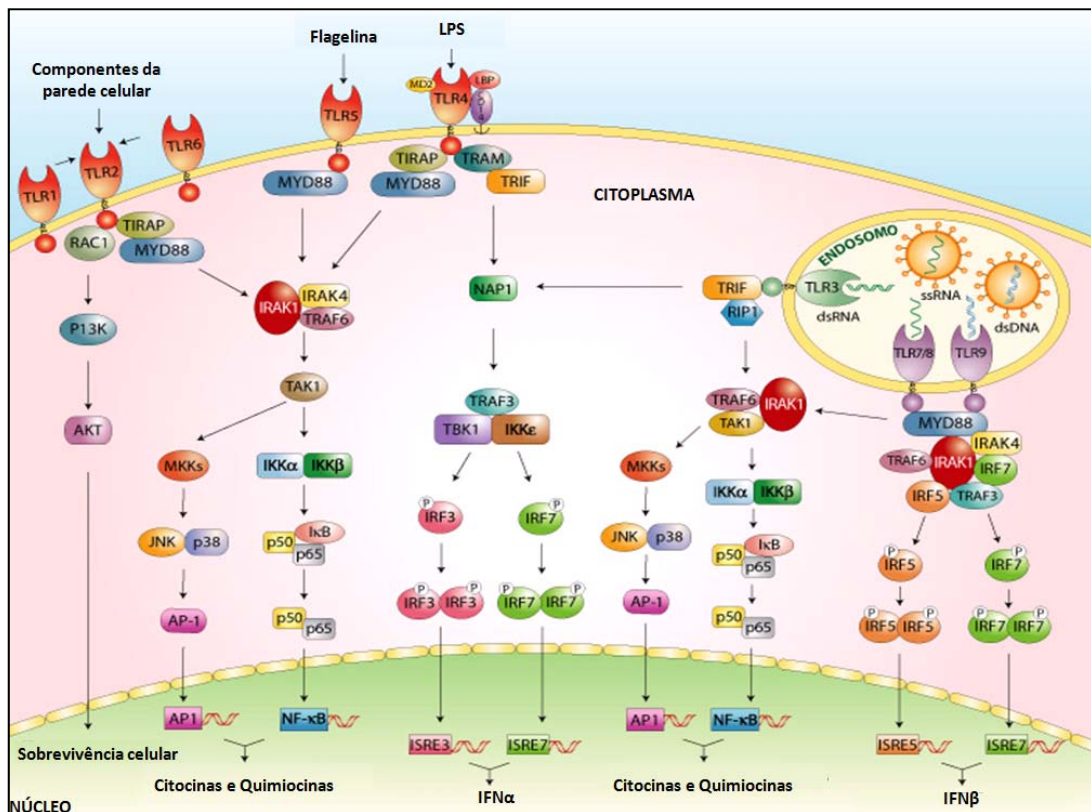


Figura 7: Sinalização celular via TLR - Os receptores Toll-Like funcionam como receptores de reconhecimento padrão (PRR), responsáveis pelo reconhecimento dos padrões moleculares associados a patógenos (PAMP). O dímero TLR1-TLR2 reconhece os PAMP de bactérias gram-positivas, incluindo lipoproteínas, lipopeptídeos, peptidoglicanos e o ácido lipoteicoico. A associação TLR2-TLR6 é responsável pelo reconhecimento do ácido lipoteicoico da parede de bactérias gram-positivas e do zimosan (polissacarídeo derivado de fungos). O dímero TLR4-TLR4 reconhece o lipopolissacarídeo da parede celular de bactérias gram-negativas, a proteína F de alguns vírus e outros constituintes do hospedeiro como os oligossacarídeos do ácido hialurônico e o fibrinogênio. O dímero TLR7-TLR8 é responsável pelo reconhecimento do RNA viral de fita simples. TLR2 reconhece o glicosilfosfatidilinositol de alguns parasitas. TLR3 liga-se à fita dupla do RNA viral. O TLR5 reconhece a flagelina de algumas bactérias gram-positivas e negativas. O TLR9 é responsável pelo reconhecimento do DNA bacteriano e viral.

Adaptado de: http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Receptor+Toll-Like+9&lang=3

A estrutura básica de um vírus consiste em ácidos nucleicos (DNA ou RNA), um capsídeo e, em alguns casos, um envelope. Estas estruturas compõem os PAMP reconhecidos pelas células através de seus PRR e esta interação PAMP-PRR pode ocorrer em várias fases do ciclo viral. Alguns TLR de membrana celular podem reconhecer partículas virais extracelulares, ao interagir com glicoproteínas do envelope, e após infectar uma célula, dentro do endossomo, alguns TLR reconhecem ácidos nucléicos virais (THOMPSON & LOCARNINI, 2007).

Os TLR1-9 estão presentes tanto em seres humanos quanto em camundongos. O TLR10 parece ser funcional apenas em humanos e os TLR11, 12 e 13 estão presentes apenas em camundongos. Os TLR1, 2, 4, 5 e 6 estão presentes na membrana plasmática enquanto que os TLR 3, 7, 8, 9 e 10 estão nos endossomos. Em seres humanos, pelo menos seis dos TLR estão envolvidos com o reconhecimento de componentes virais sendo eles os TLR2, 4, 3, 7, 8 e 9. Sendo que, TLR3 reconhece RNA de cadeia dupla (dsRNA), TLR 7 e 8 atuam no reconhecimento de RNA viral de fita simples e TLR9 é responsável pelo reconhecimento de regiões CpG de DNA viral não metilado. Os TLR2 e 4 parecem estar envolvidos no reconhecimento de produtos de glicoproteínas virais (THOMPSON & LOCARNINI, 2007).

A ligação PAMP-TLR ativa várias cascatas de sinalização, que ativam fatores de transcrição que levam a produção de citocinas pró-inflamatórias, que darão início ao desenvolvimento de respostas específicas. Com exceção do TLR3, uma via intracelular, mediada pela proteína adaptadora MyD88, é comum a todos os TLR e é descrita como ativadora da secreção de citocinas (YAMAMOTO; *et al*, 2004).

Todos os TLR apresentam uma região intracelular C-terminal conhecida como *Toll/interleukin-1 receptor* (TIR). Logo após a ligação de um PPR específico ao seu TLR correspondente, o TLR se dimeriza e sofre mudanças conformacionais que angariam moléculas adaptadoras que apresentam um domínio TIR. As principais moléculas são MyD88 (*myeloid differentiation factor 88*), TIRAP/MAL (*TIR-associated protein MyD88 adaptor-like*), TRIF (*TIR-domain-containing adaptor protein-inducing IFN β*) e TRAM (*TRIF-related adaptor molecule*) (AKIRA & TAKEDA, 2004).

O TLR3 reconhece principalmente RNA viral de dupla fita e ativa uma via independente de MyD88, utilizando uma via alternativa que envolve a proteína adaptadora TRIF. Após se ligar a um dsRNA, o TLR3 irá transmitir sinais através do domínio TIR. Assim, a proteína TRIF é recrutada como molécula adaptadora e ativa

um complexo formado pelas subunidades (NAP1, IKK ϵ , TBK1 e TRAF3). Este complexo promove a fosforilação de diferentes fatores reguladores de IFN como IRF3, NF-kB, e AP-1, que são translocados para o interior do núcleo induzindo a expressão de genes de IFN do tipo I, principalmente IFN β , além de citocinas, quimiocinas e a multiplicação e maturação de células dendríticas (YAMAMOTO; *et al*, 2004; ALEXOPOULOU; *et al*, 2001; MATSUMOTO & SEYA, 2008).

Alguns vírus possuem seu genoma composto de RNA de fita dupla (dsRNA) e muitos vírus apresentam este tipo de ácido nucleico como um intermediário no processo de replicação, isto faz com que os dsRNA sejam um frequente PAMP viral, tornando o TLR3 um importante PRR no reconhecimento dos vírus (THOMPSON & LOCARNINI, 2007).

A estimulação do receptor tipo Toll 4 (TLR4) ocorre através de sua interação com o lipopolissacarídeo (LPS) que, por sua vez, induz a liberação de citocinas pró-inflamatórias. Este receptor ao reconhecer o padrão molecular de LPS virais inicia uma cascata de sinalização em células apresentadoras de antígeno, que pode ser desencadeada tanto por uma via dependente de MyD88, que resulta na ativação de NF-kB e na expressão de genes de resposta inflamatória, quanto por uma via independente de MyD88 e responsável por ativar os fatores IRF3 e IRF7, culminando na síntese de IFN envolvidos na resposta antiviral (LU; *et al*, 2008).

Os receptores TLR7, TLR8 e TLR9 utilizam a via MyD88 para induzir a expressão de citocinas pró-inflamatórias e IFN I. Após o reconhecimento do ácido nucleico, a molécula MyD88 forma um complexo de sinalização com a IRAK1, IRAK4, TRAF6, TRAF3, IKK α e um precursor de osteopontina (OPN). O complexo MyD88-IRAK4-TRAF6 ativa NF-kB e a proteína de ativação 1 (AP-1). E, além disso, o recrutamento de IRAK1, TRAF3, IKK α e OPN permite que os receptores TLR7, 8 e 9 ativem IRF7, que se transloca para o núcleo para regular a expressão de genes, especialmente IFN I. É notável a importância destes receptores, visto que, em humanos sabe-se que os receptores TLR7, TLR9 e IRF7 são fortemente expressos pelas células dendríticas plasmocitóides (PDC), um subconjunto de células dendríticas capazes de secretar grandes quantidades de IFN tipo-I em resposta à infecção viral (THOMPSON & LOCARNINI, 2007).

Os TLR7 e TLR8 (TLR7/8) são receptores que apresentam grande homologia, sendo ambos capazes de reconhecer RNA fita simples (ssRNA). Alguns estudos demonstraram que o receptor TLR7 é ativado principalmente em camundongos e TLR8 em humanos. TLR7 e TLR8 são PRR intracelulares, que se localizam no

endossomo (THOMPSON; LOCARNINI, 2007). É possível o reconhecimento de ssRNA endógenos por estes receptores, porém o hospedeiro se protege desta resposta através de um mecanismo de compartimentalização da expressão do receptor. Além disso, os ssRNA são normalmente sujeitos a degradação por RNAses extracelulares quando liberados no meio extracelular e assim raramente atingem o endossomo (THOMPSON & LOCARNINI, 2007).

O Receptor tipo toll 9, é um receptor envolvido no reconhecimento de regiões CpG não metilados presente no DNA. Esta região não metilada é rara em vertebrados, mas comum em microrganismos como bactérias e vírus de DNA. Assim como TLR7, TLR9 também é bastante expresso em células dendríticas plasmocitóides, sendo importante na resposta contra vírus com genoma rico em regiões CpG como, por exemplo, o *Herpes simplex virus - 1* (HSV - 1) (THOMPSON & LOCARNINI, 2007).

Outro grupo de PRR, envolvidos no reconhecimento de PAMP virais são os Receptores tipo RIG ou receptores RIG-I-like (RLR). Estes receptores são helicases de RNA citoplasmáticos no qual estão incluídos três grupos: RIG-I, Mda5 e LGP-2. Diferente dos TLR os RLR não estão ligados à membrana, eles se localizam no citoplasma e agem como detectores de replicação viral (KAWAI & AKIRA, 2008).

Assim como os TLR antivirais, os RLR são capazes de reconhecer ácidos nucleicos virais e dessa forma, ativar certos fatores reguladores de interferon (IRF). Por conseguinte, RLR específicos podem desencadear um subconjunto das respostas similares a TLR, e provavelmente atuam coordenadamente nestas circunstâncias (CREAGH; *et al*, 2006).

O RNA dupla fita é um intermediário comum gerado durante o ciclo de replicação de muitos vírus de RNA e estes receptores podem reconhecer diferentes formas de dsRNA, e conseqüentemente diferentes vírus de RNA. RIG-I e Mda5 detectam replicação viral através da interação direta com o dsRNA, presente no genoma de vírus de RNA ou presente como uma parte do ciclo de replicação de alguns vírus, quando ativados estes receptores induzem vias que se convergem na ativação de NF- κ B, MAPK e IRF induzindo a produção de IFN tipo I e citocinas pró inflamatórias (CREAGH; *et al*, 2006; THOMPSON & LOCARNINI, 2007; KAWAI & AKIRA, 2008).

Embora a LGP-2 também seja uma helicase, ela não é capaz de se ligar ao dsRNA, porém alguns estudos indicam que esta proteína funciona como um

regulador das respostas desenvolvidas por RIG-I e Mda5, dependendo do tipo de vírus de RNA infectante (KAWAI & AKIRA, 2008).

Estas duas famílias de PRR (TLR e RLR) são os principais sensores de agentes virais no processo de resposta inata, sendo responsáveis por modular respostas inflamatórias que resultam na produção de IFN do tipo I e citocinas pró-inflamatórias que atuam na eliminação do vírus. Entender a interação de agentes patogênicos com o sistema imune permite o entendimento de como funciona o sistema imunológico inato e adaptativo e esse conhecimento pode permitir o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que visem limitar a replicação viral e eliminar infecções virais (THOMPSON & LOCARNINI, 2007).

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Desenho metodológico

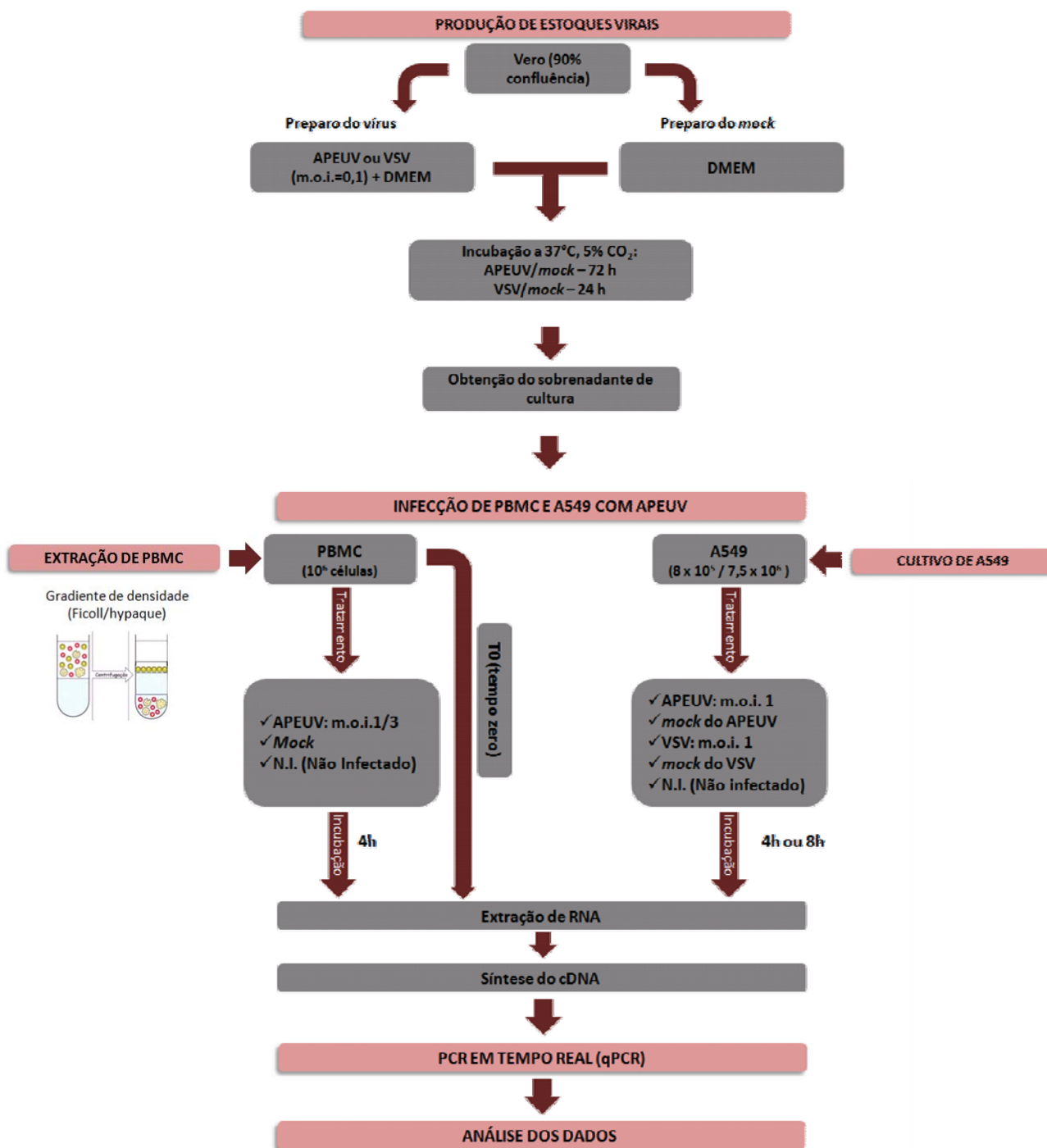


Figura 8: Esquema metodológico – Representação das principais etapas envolvidos no projeto

5.2 Amostras de vírus

5.2.1 Origem

O APEUV (BeAn848 clone 5) e o *Vesicular stomatitis virus* (VSV) foram gentilmente cedidos pelo Dr. Paulo César Peregrino Ferreira, do Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia localizado no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). As amostras foram levadas para o Centro de Pesquisas René Rachou e foram mantidas em freezer -80°C até o momento do uso.

5.2.2 Produção de estoques virais e *mock*

Todos os procedimentos descritos a seguir foram feitos utilizando material estéril e em capela de fluxo laminar. Em garrafas de cultura de poliestireno T-75 (Sarstedt) com área 75 cm², pescoço inclinado, tampa de ventilação, estéreis e isentas de pirógenos foram previamente cultivadas células de linhagem Vero, utilizando meio de cultura DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (Gibco®) e as incubando a 37°C, atmosfera umidificada com 5% de CO₂, até que atingissem confluência de 90%. Em seguida, o meio presente nas garrafas foi descartado, e foi adicionada solução tampão fosfato-salino - PBS (*phosphate buffered saline*), homogeneizando e descartando, para eliminar os resíduos do meio de cultura anterior. Foram adicionados, separadamente, em diferentes garrafas de cultura, os vírus APEUV e VSV. Para adsorção dos vírus, foi utilizado uma multiplicidade de infecção (m.o.i.) igual a 0,1 em 2 mL de meio DMEM (Gibco®) e em seguida, as células foram incubadas a 37°C, atmosfera umidificada com 5% de CO₂, realizando homogeneização em intervalos regulares de 10 minutos, durante um período de 1 hora. Completado este intervalo, foram adicionados 17 mL de DMEM (Gibco®) suplementado com 5% de soro fetal bovino (Gibco®) e 1% de PSA - Antibiótico-Antimicótico (Gibco®), tendo ao final um volume de 20 mL. As garrafas foram incubadas em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂, observando-as diariamente até ocorrer à presença de efeito citopático. Este processo ocorreu em 72 horas para o APEUV e em 24 horas para o VSV. Após esse período, o sobrenadante foi transferido de cada garrafa para um tubo de polipropileno, fundo cônico e capacidade de 50 mL (Sarstedt), centrifugando-os em centrífuga 5810R, Rotor A-4-

62, por um período de 15 minutos a 1800 x g e temperatura de 4°C. O sobrenadante contendo os vírus foi transferido para microtubos de 1,5 mL e estes congelados a uma temperatura de -80°C, para posterior titulação e uso (Figura 9).

Paralelamente aos vírus, foram preparados os controles de sobrenadante de cultura de células Vero não infectadas (*mock*), para os dois tipos de vírus multiplicados. Os controles *mock* dos dois vírus multiplicados (APEUV e VSV) foram tratados da mesma forma que as células infectadas com os vírus, porém sem a infecção com as amostras virais (Figura 9).

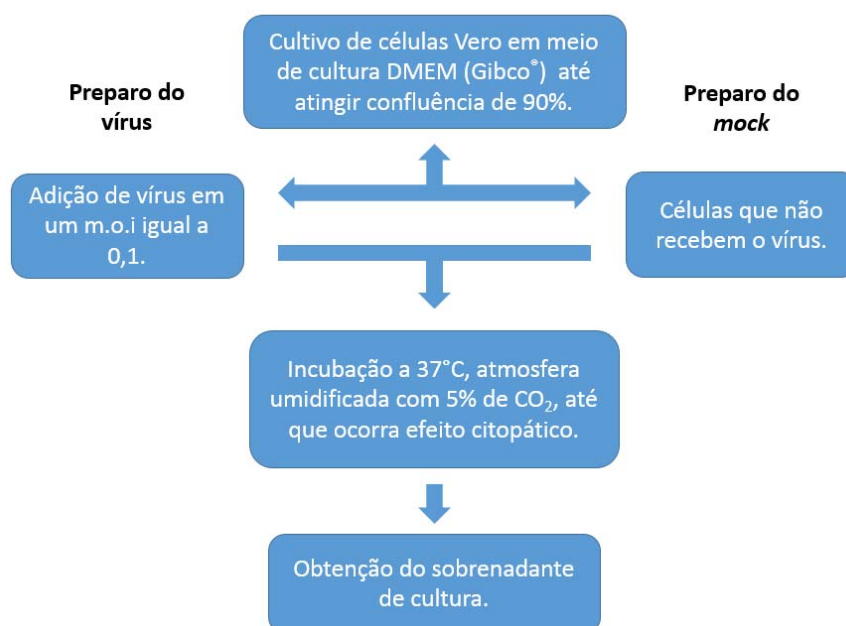


Figura 9: Fluxograma do preparo das amostras de vírus e do controle *mock* – O esquema evidencia as principais etapas para o preparo das amostras de vírus e do *mock*. Para o preparo do vírus, células Vero previamente cultivadas são infectadas com o vírus e incubadas pelo período necessário para presença do efeito citopático e em seguida a amostra é centrifugada para obtenção do sobrenadante de cultura onde está presente o vírus. O *mock* consiste em células que passam por todas as etapas descritas para o preparo do vírus, porém, estas amostras não são infectadas com o vírus.

5.2.3 Titulação Viral por TCDI 50 (*Tissue Culture Infectious Doses 50%*)

Para determinar a quantidade de vírus obtida no processo de multiplicação do vírus, foi utilizado o método de diluição limite (*end-point-dilution*), este método consiste na inoculação de sucessivas diluições crescentes de uma suspensão viral, em células susceptíveis, e dessa forma é identificada a diluição em que é possível detectar o efeito citopático em 50% das culturas inoculadas (TCID 50).

A titulação das diferentes partidas de vírus APEUV (vírus multiplicado e vírus cedido pela UFMG) pelo método TCID₅₀ foi feita em placa de 96 poços, fundo chato e estéril (Linbro[®]), onde foram adicionados por poço, 2×10^5 células Vero e 100 μ L de meio DMEM (Gibco[®]) suplementado com 5% de soro fetal bovino (Gibco[®]) e 1% de PSA - Antibiótico-Antimicótico (Gibco[®]). Em seguida, a placa foi incubada em estufa a 37°C e atmosfera com 5% de CO₂, até que as células atingissem uma confluência de 90% (1 dia). As duas amostras de vírus foram diluídas através de diluição seriada, nos fatores de diluição de 10^{-1} a 10^{-11} . A diluição seriada foi feita utilizando uma placa de 96 poços de fundo chato e estéril (Linbro[®]), chamada de placa espelho. Nesta placa, os poços receberam 180 μ L de meio DMEM (Gibco[®]). Em seguida, foi adicionado ao primeiro poço uma quantidade igual a 20 μ L de solução viral. A partir deste poço foram retirados e transferidos 20 μ L de solução viral já diluída para o poço seguinte. Este procedimento foi feito até que atingisse a diluição de 10^{-11} . As diluições foram feitas em quadriplicatas para as duas amostras de vírus.

Da placa contendo células Vero com confluência de 90%, foi retirado o meio de cultura e adicionado 100 μ L de novo meio de cultura DMEM (Gibco[®]) suplementado com 5% de soro fetal bovino (Gibco[®]) e 1% de PSA - Antibiótico-Antimicótico (Gibco[®]). Foram adicionados aos seus respectivos poços 100 μ L das diluições virais feitas na placa espelho. A quatro poços foram adicionados 100 μ L de solução viral sem diluição (controle viral – CV) e a quatro poços 100 μ L de meio de cultura DMEM (controle de células – CC). O esquema da placa está representado abaixo (Figura 10). Todos os procedimentos foram feitos mantendo as mostras de vírus em banho de gelo.

A titulação do vírus VSV foi realizada da mesma forma que a descrita para o vírus APEUV, porém a diluição utilizada na titulação iniciou-se na diluição de 10^{-4} uma vez que este vírus atinge títulos de valores elevados.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	10 ⁻¹										10 ⁻¹¹	CC
B												CC
C												CC
D												CC
E												CV
F												CV
G												CV
H	10 ⁻¹										10 ⁻¹¹	CV

Figura 10: Esquema da placa de titulação – Titulação de vírus realizada em placa de 96 poços, onde na primeira coluna foram adicionadas aos oito poços, as amostras de vírus em uma diluição igual a 10⁻¹, na segunda coluna uma diluição igual a 10⁻² e assim sucessivamente, até a coluna 11 onde foi adicionada a diluição de 10⁻¹¹. Na coluna 12, foram adicionados aos poços de A até D, o controle de células, onde células Vero receberam apenas meio de cultura, e nos poços de E até H o controle de vírus, onde células Vero foram tratadas com o vírus sem nenhum tipo de diluição.

Após o preparo, a placa foi incubada em estufa úmida a 37°C e atmosfera com 5% de CO₂, e observada diariamente até verificar presença de efeito citopático. A placa ficou incubada por aproximadamente 3 dias, e após este intervalo, a placa foi avaliada através de microscopia óptica para anotação dos poços em que houve ou não efeito citopático. Para confirmar a presença de efeito, a placa foi corada com cristal violeta.

Os títulos dos vírus foram então determinados utilizando o cálculo *Reed & Munch endpoint calculation method* conforme descrito por Reed & Munch (1938). Os valores obtidos com a titulação do APEUV clone 5 cedido pelo laboratório de vírus da UFMG, foram sobrepostos na tabela 3.

Tabela 3: Tabela para cálculo TCID₅₀ para APEUV

Fator de Diluição	SEM CPE células vivas	COM CPE células mortas	Relação (CPE/amostras)	A - Total de células mortas (CPE) Acumulativo ↑	B - Total de células vivas (s/CPE) Acumulativo ↓	% CPE A/(A+B)	Percentual de células infectadas
10 ⁻¹	0	4	4/4	21	0	21/21	100%
10 ⁻²	0	4	4/4	17	0	17/17	100%
10 ⁻³	0	4	4/4	13	0	13/13	100%
10 ⁻⁴	0	4	4/4	9	0	9/9	100%
10 ⁻⁵	0	4	4/4	5	0	5/5	100%
10 ⁻⁶	4	0	0/4	1	4	1/5	20%
10 ⁻⁷	4	0	0/4	1	8	1/9	11%
10 ⁻⁸	4	0	0/4	1	12	1/13	7,6%
10 ⁻⁹	4	0	0/4	1	16	1/17	5,9%
10 ⁻¹⁰	4	0	0/4	1	20	1/21	4,7%
10 ⁻¹¹	3	1	1/4	1	23	1/24	4,16%

De acordo com a tabela 3, o logaritmo da primeira diluição que apresentou um percentual de infecção acima de 50% é **-5**. Desta forma, encontra-se o valor de **100%** para a **% positivo acima 50%** e **20%** para a **% abaixo 50%**. O resultado da distância proporcional é de 0,625.

$$\text{Distância proporcional} = \frac{100 - 50}{100 - 20} = \frac{50}{80} = 0,625$$

Como o fator de diluição varia de -1 em -1, foi considerado **Logaritmo do fator de diluição = -1**, ao calcular o logaritmo na base 10 do título viral encontrou-se o valor -5,625.

$$\text{Log. do TCID 50} = -5 + (0.625 \times -1) = \mathbf{-5,625}$$

$$\text{TCID 50} = \mathbf{10^{5,625}}$$

Foi ainda aplicado o fator de correção relacionado ao volume e diluição do vírus: como foram adicionados 100 µL de vírus em 100 µL de meio, totalizando 200 µL (diluição ½) – por isso o log. do título viral foi multiplicado por dois. Como o cálculo é feito para um volume de 1 mL, o valor foi multiplicado por 5 (200 µL x 5 = 1000 µL ou 1 mL). Logo:

$$\text{Título viral} = 2 \times 5 \times 10^{5,625} = 10 \times 10^{5,625} = \mathbf{10^{6,625}}$$

O título viral encontrado para a amostra de APEUV cedida pelo Laboratório de Vírus da UFMG é de **10^{6,625} PFU/mL**.

Os cálculos de TCID50 para APEUV multiplicado para estoque foram realizados da mesma forma que os cálculos descritos para titulação do APEUV clone 5 cedido pelo laboratório de vírus da UFMG. O título viral encontrado para a amostra de APEUV multiplicado para estoque foi de 10^{7,73} PFU/mL.

Os resultados obtidos com a titulação do vírus VSV cedido pelo Laboratório de Vírus da UFMG, foram sobrepostos na tabela 4, a placa foi montada a partir da diluição de 10⁻⁴ uma vez que se sabe que este vírus atinge títulos elevados.

Tabela 4: Tabela para cálculo TCID50 para VSV

Fator de Diluição	SEM CPE células vivas	COM CPE células mortas	Relação (CPE/amostras)	A - Total de células mortas (CPE) Acumulativo ↑	B - Total de células vivas (s/CPE) Acumulativo ↓	% CPE A/(A+B)	Percentual de células infectadas
10 ⁻⁴	0	4	4/4	22	0	22/22	100
10 ⁻⁵	0	4	4/4	18	0	18/18	100
10 ⁻⁶	0	4	4/4	14	0	14/14	100
10 ⁻⁷	0	4	4/4	10	0	10/10	100
10 ⁻⁸	1	3	3/4	6	1	6/7	85,71
10 ⁻⁹	2	2	2/4	3	3	3/6	50
10 ⁻¹⁰	3	1	1/4	1	6	1/7	14,28
10 ⁻¹¹	4	0	0/4	0	10	0/10	0

De acordo com a tabela 4, o logaritmo da primeira diluição que apresentou um percentual de infecção acima de 50% é **-8**. Desta forma, encontrou-se o valor de **85,71%** para a **% positivo acima 50%** e **14,28%** para a **% abaixo 50%**. O resultado da distância proporcional é de 0,50.

$$\text{Distância proporcional} = \frac{85,71 - 50}{85,71 - 14,28} = \frac{35,71}{71,43} = 0,50$$

Como o fator de diluição varia de -1 em -1, considerou-se o **Logaritmo do fator de diluição = -1**, ao calcular o logaritmo na base 10 do título viral encontrou-se o valor -8,5.

$$\text{Log. do TCID 50} = -8 + (0.5 \times -1) = \mathbf{-8,5}$$

$$\text{TCDI 50} = \mathbf{10^{8,5}}$$

O fator de correção relacionado ao volume e diluição do vírus foi aplicado: como foram adicionados 100 µL de vírus em 100 µL de meio, totalizando 200 µL (diluição ½) por isso o log. do título viral foi multiplicado por dois. Como o cálculo foi feito para um volume de 1 mL, multiplicou-se o valor por 5 (200 µL x 5 = 1000 µL ou 1 mL). Logo:

$$\text{Título viral} = 2 \times 5 \times 10^{8,5} = 10 \times 10^{8,5} = \mathbf{10^{8,5}}$$

O título viral encontrado para a amostra de VSV cedida pelo Laboratório de Vírus da UFMG é de **10^{8,5}/mL**.

5.3 Amostras de células

5.3.1 PBMC

Células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram extraídas de cinco voluntários saudáveis, dos quais foram colhidos aproximadamente 30 mL de sangue através de punção venosa em tubos a vácuo contendo heparina e devidamente identificados. Os voluntários assinaram termo de consentimento livre e esclarecido, previamente aprovado pelo comitê de ética, com número de CAAE: 32379314.0.0000.5091. Estas células foram utilizadas como modelo experimental para avaliação molecular da resposta imune inata contra APEUV.

Para a extração de PBMC, foi utilizado, a metodologia de separação em gradiente descontínuo de densidade e o reagente Histopaque® 1077 (Sigma-Aldrich) e todo procedimento foi feito em capela de fluxo laminar e utilizando material estéril (Figura 11).

Em tubo para centrifuga de polipropileno, fundo cônico e capacidade de 50 mL (Sarstedt), foram adicionados 8 mL de Histopaque® 1077 a temperatura ambiente. Foram adicionados 16 mL de sangue sobre o Histopaque® 1077, sem que ocorresse a mistura do sangue com o reagente. A amostra foi centrifugada em centrífuga 5810R, Rotor A-4-62 (Eppendorf), durante 40 minutos a 400 x g, temperatura ambiente. A centrífuga foi programada para desaceleração mínima, para que não ocorresse perturbação da fase onde se encontram as PBMC durante a frenagem.

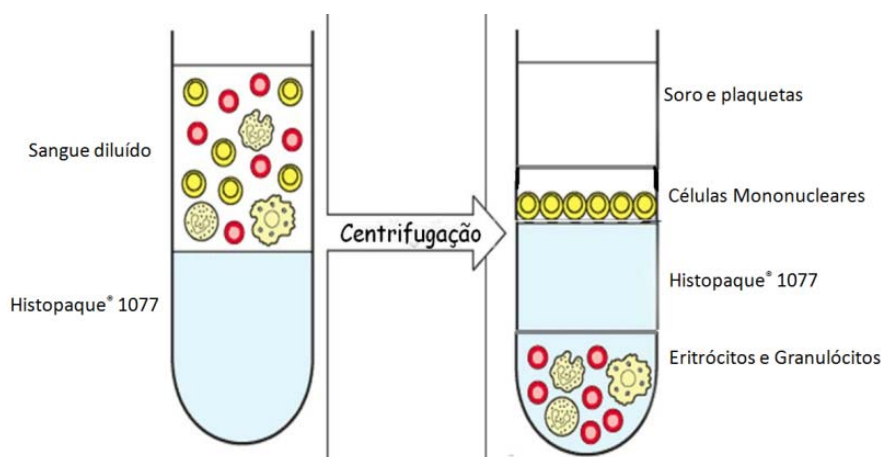


Figura 11: Separação de PBMC por gradiente descontínuo de densidade – O desenho esquemático da amostra de sangue adicionada ao Histopaque®-1077 antes e após a centrifugação.

Adaptado de <http://www.quazoo.com/q/Ficoll>

Após a centrifugação, a camada no qual se localizavam as PBMC foi retirada e as células coletadas foram transferidas para novos tubos estéreis para centrifuga de polipropileno, fundo cônico e capacidade de 50 mL, contendo 5 mL de meio de cultura MEM Gibco® - *Minimum Essential Media* (Life Technologies Corporation) a 4 °C. O volume foi completado para 45 mL com meio de cultura MEM a 4 °C e as amostras foram centrifugadas em centrífuga 5810R, Rotor A-4-62, durante 10 minutos a 400 x g, a temperatura de 4°C. Descartou-se o meio de cultura obtendo o precipitado de células formado no fundo do tubo. O precipitado foi suspenso e em seguida, foram adicionados 30 mL de meio de cultura MEM a 4 °C e as amostras foram centrifugadas em centrífuga 5810R, Rotor A-4-62, durante 10 minutos a 400 x g, a temperatura de 4°C. O meio de cultura foi descartado obtendo o precipitado de células formado no fundo do tubo. O precipitado foi resuspenso, em seguida, foram adicionados 20 mL de meio Gibco® RPMI 1640 (Life Technologies Corporation) a 4°C, centrifugando em seguida por 10 minutos a 400 x g, 4°C. Todo o RPMI foi retirado, ficando apenas o precipitado de células. Foi acrescentado uma quantidade de RPMI suficiente para resuspenso as células em um volume final de 1 mL.

Para fazer a contagem e ajuste do número de células, foi adicionado, em um microtubo de polipropileno com capacidade de 0,6 mL (Eppendorf), 190 µL de azul de Turcks, e em seguida 10 µL da suspensão celular, obtendo uma diluição de 1:20. 10 µL desta solução foram transferidos para uma câmara de Neubauer e aguardando 2 minutos para que todas as células se precipitassem, logo após, foi realizado a contagem de células em microscópio óptico, contando os quatro quadrantes presentes na extremidade da câmara.

Para obter a quantidade de células presentes nas amostras, foi realizado o seguinte cálculo. O valor total encontrado na contagem dos quatro quadrantes, dividido pelo número de quadrantes contados e multiplicado pelo fator de diluição (20), volume final 10³ e pelo fator de correção da câmara (10¹):

$$\text{N}^\circ \text{ de células/mL} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de células contadas} \times 10^3 \times 10^1 \times 20}{\text{N}^\circ \text{ e quadrantes contados}}$$

Este procedimento foi feito com todas as amostras.

5.3.2 Células A549 e Vero

As linhagens celulares Vero (ATCC ® CCL-81™) e A549 (ATCC® CCL-185™) foram cedidas pelo Dr. Paulo Peregrino do laboratório de Vírus, ICB/UFMG. A linhagem celular Vero foi utilizada para os processos de multiplicação e titulação viral. Esta linhagem de células foi iniciada a partir de células renais de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*) adulto normal em 1962, por Y. Yasumura e Y. Kawakita na Universidade Chiba no Japão. Este tipo de célula não secreta IFN do tipo I (SHEETS, 2000) e, portanto, é adequado para procedimentos onde se pretende isolar amostras virais, já que o principal mecanismo de resposta imune contra infecções por vírus está bloqueado, permitindo assim a obtenção de partículas de vírus viáveis (EMENY; MORGAN, 1979).

As células A549 foram utilizadas como modelo experimental de células humanas para avaliação molecular da resposta imune inata frente à infecção por APEUV. Esta linhagem foi iniciada em 1972, por Giard e colaboradores, através da cultura de tecidos de células de carcinoma pulmonar de um indivíduo de sexo masculino, caucasiano e 58 anos de idade. Estas células apresentam tempo de duplicação de aproximadamente 22 horas, permitindo sua multiplicação em um curto período de tempo (GIARD; *et al*, 1973).

As células A549 e Vero foram descongeladas e mantidas em garrafas de cultura de poliestireno T-75 (Sarstedt), meio de cultura DMEM (Gibco®) suplementado com 5% de soro fetal bovino (Gibco®) e 1% de PSA - Antibiótico-Antimicótico (Gibco®). As células foram repicadas sempre que atingiram confluência de 90%, sendo transferidas para garrafas novas. Para o repique, o meio de cultura foi retirado e a garrafa lavada adicionando PBS, homogeneizando e em seguida descartando o PBS. Adicionou-se 1 mL de solução de tripsina (2,500 g/L)/EDTA (250 mg/L) (Cultilab), e em seguida a tripsina foi homogeneizada para que formasse uma película sobre a monocamada celular, e retirou-se o excesso de tripsina. Em seguida, a garrafa contendo as células e a solução de tripsina foi colocada em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂, por um período de 2 minutos, para que a solução de tripsina fosse ativada desprendendo as células da monocamada. Observou em microscópio óptico para verificar se as células haviam se desprendido e as células foram, então, ressuspensas em 6 mL de DMEM (Gibco®) suplementado com 5% de soro fetal bovino (Gibco®) e 1% de PSA - Antibiótico-Antimicótico (Gibco®), homogeneizando para garantir que as células se separem umas das outras. Em

seguida o volume foi distribuído igualmente em três garrafas de cultura de poliestireno T-75 (Sarstedt), (2 mL em cada garrafa), completando o volume em seguida para 12 mL com meio DMEM (Gibco[®]), 5% de soro fetal bovino (Gibco[®]), 1% de PSA - Antibiótico-Antimicótico (Gibco[®]). As garrafas foram incubadas em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂. Todo procedimento foi feito em capela de fluxo laminar e utilizando material estéril.

Tanto as células A549 quanto as células Vero apresentaram crescimento adequado para serem utilizadas nos processos de infecção viral. Foram cultivadas até que as mesmas atingissem confluência de 90% (Figura 15), sendo repicadas e transferidas para outras garrafas sempre que necessário e mantidas até o final do projeto.

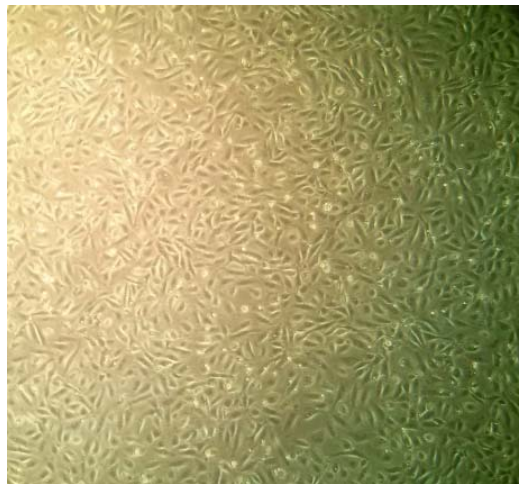


Figura 12: Cultura de células A549 – Células A549, em confluência de 90%, observadas em microscópio óptico invertido no aumento de 40 vezes. (FERREIRA, 2015)

5.4 Infecção viral

5.4.1 Infecção de PBMC

Para estimular as PBMC, estas foram separadas em cinco grupos diferentes feitos em triplicatas, todos contendo 10⁶ células. Cada grupo foi depositado em um poço de uma placa de 6 poços, fundo chato, estéril (Sarstedt[®]). Os grupos consistiram em:

- ✓ m.o.i.=1 – Células infectadas com um m.o.i. = 1 (proporção de 1 vírion para 1 célula);

- ✓ m.o.i.=3 – Células infectadas com um m.o.i. = 3 (proporção de 3 vírion para 1 célula);
- ✓ *mock* – Células em contato com o controle negativo de produção viral *mock*;
- ✓ N.I. – Células que receberam apenas meio de cultura;
- ✓ T0 – Células que não passaram pelo tempo de incubação, tiveram seu RNA extraído antes do processo de infecção.

Inicialmente foram realizados os cálculos para determinar qual o volume de vírus necessário para infectar as células com as m.o.i. determinadas. Em seguida, os vírus ou controles de células foram adicionados. As PBMC (1×10^6 células) foram incubadas com APEUV com m.o.i.=1; APEUV com m.o.i.=3; com sobrenadante de cultura de células Vero sem o vírus (*mock*); e com meio RPMI sem adição de soro fetal bovino (controle negativo). Todos os grupos tiveram seu volume completado para 2 mL utilizando meio RPMI médium 1640 (Gibco[®]) suplementado com 5% de soro humano, sexo masculino, plasma AB (Sigma[®]) e 1% de PSA - Antibiótico-Antimicótico (Gibco[®]) e incubadas durante 4 horas, em atmosfera de 5% de CO₂, a 37°C. Durante a primeira hora a placa foi homogeneizada de 10 em 10 minutos para que ocorresse a adsorção dos vírus. Após o período de incubação, as placas foram centrifugadas em centrífuga 5810R, Rotor A-4-62 (Eppendorf), durante 10 minutos a 350 x g, 4 °C. Após a centrifugação, o meio de cultura foi removido e o precipitado de células formado foi imediatamente utilizado para extração de RNA total.

5.4.2 Infecção de células A549 com APEUV e VSV nos períodos de 4 e 8 horas

A infecção foi realizada, a partir de células A549 previamente cultivadas em garrafas de cultura de poliestireno T-75 (Sarstedt), até que as mesmas atingissem confluência de 90%. O meio de cultura foi retirado das garrafas, descartando-os, e adicionando em seguida PBS, homogeneizando e descartando-o em seguida. Foram adicionados 1 mL de solução de tripsina (2,500 g/L), EDTA (250 mg/L) (Cultilab), e em seguida a tripsina foi homogeneizada para que formasse uma película sobre a monocamada celular e o excesso de tripsina foi retirado. Em seguida, a garrafa contendo as células e a solução de tripsina foi colocada em estufa úmida a 37°C e atmosfera com 5% de CO₂, por um período de 2 minutos, para que a solução tripsina fosse ativada, desprendendo as células da monocamada. As células foram então ressuspensas em 5 mL de DMEM (Gibco[®]) suplementado com 5% de soro fetal

bovino (Gibco®) e 1% de PSA - Antibiótico-Antimicótico (Gibco®), homogeneizando para garantir que as células se separem umas das outras. A suspensão de células foi transferida para um tubo de polipropileno, fundo cônico e capacidade de 50 mL (Sarstedt) e, em seguida, foi centrifugado em centrífuga 5810R, Rotor A-4-62 (Eppendorf), durante 10 minutos a 350 x g e uma temperatura de 4°C. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado formado foi resuspenso em 1 mL de DMEM (Gibco®) suplementado com 5% de soro fetal bovino (Gibco®) e 1% de PSA - Antibiótico-Antimicótico (Gibco®). A contagem das células foi realizada em microscópio óptico, utilizando uma câmara de Neubauer e conforme descrito anteriormente no item 7.3.1. Após determinar a quantidade de células presentes na suspensão, o cálculo foi realizado para definir o volume de suspensão necessário para adicionar em cada poço 8×10^5 células. As placas foram preparadas para infecção das células, adicionando em uma placa de 6 poços, fundo chato, estéril (Sarstedt®), 2 mL de DMEM (Gibco®) suplementado com 5% de soro fetal bovino (Gibco®) e 1% de PSA - Antibiótico-Antimicótico (Gibco®) e, em seguida, foi adicionado o volume de suspensão celular contendo 8×10^5 células. Após este processo, as placas foram incubadas em atmosfera de 5% de CO₂, a 37°C por um período de 18 horas para que as células pudessem aderir à placa.

Após o período de incubação, o meio de cultura foi retirado, as células foram lavadas com PBS, adicionando em seguida 2 mL de meio de cultura DMEM (Gibco®) suplementado com 5% de soro fetal bovino (Gibco®) e 1% de PSA - Antibiótico-Antimicótico (Gibco®). As placas foram, então, separadas em quatro pares, onde o primeiro par recebeu APEUV (m.o.i. = 1); o segundo recebeu *mock* do APEUV; o terceiro VSV (m.o.i. = 1) e o quarto *mock* do VSV. Um dos pares de cada grupo foi incubado por um período de 4 horas e o outro por um período de 8 horas em atmosfera de 5% de CO₂, a 37°C.

5.4.3 Infecção de células A549 com APEUV e VSV no período de 4 horas

As células A549 foram cultivadas em garrafas de cultura de poliestireno T-75 (Sarstedt), até que as mesmas atingissem confluência de 90%. Todas as garrafas foram cultivadas a partir de um mesmo repique onde se adicionou o mesmo volume de suspensão celular em todas as garrafas, para que todas atingissem um nível de confluência de 90% no mesmo período, mantendo uma quantidade de células bem próximas entre as garrafas. O meio de cultura foi retirado de três garrafas e

descartados, em seguida foram adicionados 5 mL de PBS, homogeneizando em seguida para realizar a lavagem da garrafa retirando os resíduos de meio de cultura, descartando-os em seguida. Foi adicionado 1 mL de solução de tripsina (2,500 g/L)/EDTA (250 mg/L) (Cultilab), homogeneizando para que formasse uma película sobre a monocamada celular, o excesso foi retirado e descartado. Em seguida, a garrafa contendo as células e solução de tripsina foi colocada em estufa úmida a 37°C e 5% de CO₂, por um período de 2 minutos, para que a solução de tripsina seja ativada desprendendo as células da monocamada. Observou em microscópio óptico para verificar se as células haviam se desprendido e as células foram, então, ressuspensas em 5 mL de DMEM (Gibco[®]) suplementado com 5% de soro fetal bovino (Gibco[®]) e 1% de PSA - Antibiótico-Antimicótico (Gibco[®]), homogeneizando para garantir que as células se separem umas das outras. As células, então, foram contadas para verificar a quantidade média de células presente em cada garrafa. As garrafas possuíam uma quantidade média de células igual a $7,5 \times 10^6$ células.

Foram utilizadas 6 garrafas para realizar a infecção. A primeira garrafa foi identificada como grupo APEUV (m.o.i.=1) e recebeu APEUV em uma proporção de 1 vírion por célula. O segundo grupo identificado como APEUV *mock*, recebendo o sobrenadante de cultura utilizado como controle na produção de APEUV. O terceiro grupo recebeu o nome de VSV (m.o.i.=1) e recebeu o vírus VSV em um m.o.i. de 1. O quarto grupo recebeu o *mock* do VSV e foi nomeado como VSV *mock*. O quinto grupo recebeu apenas meio de cultura e foi identificado como não infectado (N.I.). Após a infecção ou não, as garrafas (APEUV m.o.i.=1, APEUV *mock*, VSV m.o.i.=1, VSV *mock* e N.I.) foram incubadas por um período de 4 horas em atmosfera de 5% de CO₂, a 37°C.

5.5 Extração de RNA

A extração do RNA das células (PBMC ou A549) cultivadas em contato com os APEUV ou VSV, com o *mock*, ou cultivadas apenas com meio de cultura (grupo controle não infectado), bem como o das células T0 (que tiveram o RNA extraído no momento antes da infecção) foi realizada utilizando TRIzol[®] Reagent (Life Technologies Corporation), conforme as recomendações do fabricante.

Para realizar a extração de RNA, a placa de cultura foi centrifugada a 350 x g, 4°C por 5 minutos, em centrífuga 5810R, Rotor A-4-62. Em seguida, foram descartados os sobrenadantes e resuspensos os precipitados formados em 100 µL

de TRIzol, em seguida, foram transferidos para microtubos de polipropileno com capacidade de 1,5 mL (Eppendorf) e adicionando em seguida, 900 µL de TRIzol em cada amostra, completando o volume para 1 mL. As amostras foram homogeneizadas e incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente.

Após esta etapa, foram adicionados 200 µL de clorofórmio e os tubos em agitados vigorosamente em agitador vórtex por 15 segundos e, em seguida, as amostras foram incubadas à temperatura ambiente por 3 minutos. As amostras foram centrifugadas a uma velocidade de 12.000 x g em microcentrífuga 5415C (Eppendorf) durante 15 minutos a temperatura ambiente. A fase superior e aquosa de cada tubo, contendo o RNA total, foi transferida para novos microtubos de polipropileno com volume de 1,5 mL, evitando a movimentação da interfase para que não houvesse contaminação do RNA com moléculas presentes na fase inferior. Foram adicionados 500 µL de isopropanol, homogeneizando em agitador por 15 segundos, e incubando, em seguida, por 10 minutos à temperatura ambiente, para que o isopropanol permitisse a precipitação do RNA. As amostras foram centrifugadas em microcentrífuga 5415C a 12.000 x g, por 10 minutos a temperatura ambiente.

Os sobrenadantes foram descartados e ao precipitado foi adicionado 1 mL de etanol 75% as amostras foram homogeneizadas em agitador vórtex por 15 segundos e centrifugadas em seguida, em microcentrífuga 5415C a 7500 x g por 5 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e as amostras incubadas em temperatura ambiente, em fluxo laminar, e com a tampa aberta por 10 minutos, para que ocorresse a eliminação de todo etanol. Os precipitados de RNA foram resuspendidos em 20 µL de água livre de RNase, incubando-os em seguida, em banho-maria a 60°C por 10 minutos. O RNA obtido foi dosado em NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), e armazenado em freezer a -80 °C.

5.6 Avaliação da Integridade do RNA

O RNA das amostras obtidas no experimento de Infecção *in vitro* de células A549 com APEUV e VSV no período de 4 horas (infecção em garrafas - $7,5 \times 10^6$ células) teve sua integridade testada em gel de agarose 1%. 0,3 g de agarose (Sigma) foi dissolvido em 30 mL de TAE (Tris-acetate-EDTA) 0,5X. A solução foi aquecida até a completa dissolução da agarose. Após, foram adicionados 1,5 µL de SYBR[®] Safe DNA Gel Stain (Life Technologies) à solução, transferindo-a para cuba

de eletroforese. Sobre o gel, foi adicionado TAE 0,5X até cobri-lo por completo. À primeira canaleta do gel foi adicionado o padrão de peso molecular 0.5-10 Kb RNA Ladder (Invitrogen) e nas canaletas de 2 a 7 foram adicionados o RNA das amostras APEUV m.o.i.1, APEUV *mock*, VSV m.o.i.1, VSV *mock*, N.I. e T0 respectivamente. As amostras presentes no gel foram então submetidas à eletroforese no equipamento Mupid-exU Systeme (Advance) em voltagem de 100 V por um período de 1 hora e em seguida visualizado em transluminador, Safe Imager™ 2.0 Blue Light Transilluminator (Invitrogen).

5.7 Síntese de cDNA

O cDNA das PBMC, foi sintetizado a partir de 1,0 µg do RNA total. O RNA extraído foi transcrito reversamente utilizando 200 U/µL da enzima Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen), iniciadores randômicos hexâmeros (Invitrogen) e o inibidor de RNase, *RNase out* 40 U/µL (Invitrogen), seguindo o protocolo estabelecido pelo fabricante. As amostras foram incubadas por 5 minutos a 65°C, seguidos por 1 minuto a 4°C. Foram adicionados: tampão apropriado para a reação de transcrição reversa contendo 10 mM MgCl₂ e 8mM DTT; 40 U de RNase e 200 U de transcriptase reversa (Superscript III RT). A reação ocorreu por 50 minutos a 50°C, seguida por 5 minutos a 85°C. Logo após, as amostras foram tratadas com 2 U RNase H de *E. coli* por 20 minutos a 37°C. O cDNA foi armazenado a -80°C.

O RNA extraído das células A549 (8 x 10⁵ células) foi ajustado para uma quantidade de 70 ng e o RNA extraído das células A549 (7,5 x 10⁶ células) foi ajustado para utilizar uma quantidade 5 µg na síntese do cDNA. O cDNA foi sintetizado utilizando SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit (Invitrogen) de acordo com o protocolo estabelecido pelo fabricante. Para cada reação foram adicionados, 4 µL de 5X VILO™ Reaction Mix; 2 µL de 10X SuperScript® Enzyme Mix; 10 µL de RNA (700 µg) e 4 µL de água destilada livre de DNase Ultrapure e RNase (Invitrogen). Os tubos foram homogeneizados e em seguida as amostras foram incubadas a 25°C por 10 minutos, 42°C por 60 minutos e 85°C por 5 minutos. Ao final, as amostras foram armazenadas a -20 °C.

5.8 Quantificação da expressão de genes por PCR quantitativa em tempo real.

Para realizar a quantificação da expressão de genes das amostras de PBMC e de células A549 infectadas com APEUV e VSV nos períodos de 4 e 8 horas (infecção em placa - 8×10^5 células), foi utilizado o *kit* de amplificação baseado no sistema TaqMan® Assays (Applied Biosystems). As reações de qPCR foram realizadas em triplicatas seguindo os ajustes-padrão do equipamento em um volume final de 25 μ L, otimizadas para o equipamento StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems), a partir de 50 ng de cDNA obtido do mRNA extraído de células mononucleares do sangue periférico. Em todas as reações foram utilizados o gene β -actina como controle endógeno e o corante ROX utilizado como normalizador de sinal. Para as amostras de PBMC foram feitos ensaios para análise da expressão dos genes TLR3, TLR7, TLR9, IFN β e IFN γ . Os genes avaliados nas células A549, foram TLR3, TLR7, TLR9, MyD88, IRF3, IRF5, IRF7, IFN- β , IRAK4, TRAF3, TRAF6, TICAM1 e JUN.

A análise da expressão de genes por PCR quantitativa em tempo real de células A549 infectadas com APEUV e VSV nos períodos de 4 e 8 horas (infecção em garrafa - $7,5 \times 10^6$ células) também foram realizadas utilizando *kits* de amplificação baseados no sistema TaqMan® Assays (Applied Biosystems) e em placas customizadas (Figura 13), utilizando 50 ng de cDNA, realizando todas as reações em triplicatas e seguindo os ajustes-padrão do equipamento em um volume final de 10 μ L, otimizadas para o equipamento StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Em todas as reações foram utilizados os genes GAPDH, HPRT1, 18S e GUSB como controles endógenos e o corante ROX utilizado como normalizador de sinal. Foram feitos ensaios para análise da expressão dos genes IRF9, TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, ROBO-3(RIG-1), IFIH1(MDA-5), IFN α , IFN β , IFN γ , MyD88, TICAM1.

Amostra 1

Amostra 2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	18S	GAPDH	18S	GAPDH	18S	GAPDH	18S	GAPDH	18S	GAPDH	18S	GAPDH
B	HPRT1	GUSB	HPRT1	GUSB	HPRT1	GUSB	HPRT1	GUSB	HPRT1	GUSB	HPRT1	GUSB
C	IRF9	TLR3	IRF9	TLR3	IRF9	TLR3	IRF9	TLR3	IRF9	TLR3	IRF9	TLR3
D	TLR7	TLR8	TLR7	TLR8	TLR7	TLR8	TLR7	TLR8	TLR7	TLR8	TLR7	TLR8
E	TLR9	ROBO3	TLR9	ROBO3	TLR9	ROBO3	TLR9	ROBO3	TLR9	ROBO3	TLR9	ROBO3
F	IFIH1	IFNA1	IFIH1	IFNA1	IFIH1	IFNA1	IFIH1	IFNA1	IFIH1	IFNA1	IFIH1	IFNA1
G	IFNB1	IFNG	IFNB1	IFNG	IFNB1	IFNG	IFNB1	IFNG	IFNB1	IFNG	IFNB1	IFNG
H	MYD88	TICAM1	MYD88	TICAM1	MYD88	TICAM1	MYD88	TICAM1	MYD88	TICAM1	MYD88	TICAM1

Figura 13: Placa personalizada TaqMan® Assays (Applied Biosystems) – Esquema da placa personalizada, onde pode ser feita a análise de duas amostras. Cada amostra é colocada em uma metade da placa, onde é possível fazer a quantificação em triplicada da expressão dos genes IRF9, TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, ROBO-3(RIG-1), IFIH1(MDA-5), IFN α , IFN β , IFN γ , MyD88, TICAM-1.

5.9 Análise dos dados

Os dados de detecção e quantificação foram coletados e analisados em *software* ABI SDS (versão 2.0 - Applied Biosystems), e utilizando o método $\Delta\Delta Ct$. Foi utilizado o método estatístico *teste t de student* com 95% de confiança, não pareado e assumindo desvios iguais. Os gráficos foram elaborados utilizando o *software* GraphPad Prism versão 4.0.

6 RESULTADOS

6.1 Titulação Viral

Os resultados obtidos demonstraram que tanto o vírus APEUV quanto o vírus VSV, apresentaram títulos que permitiam a continuidade do projeto.

6.2 Obtenção de PBMC

As amostras de PBMC extraídas dos cinco voluntários foram extraídas nas seguintes concentrações.

Amostra 1: $1,13 \times 10^7$ células/mL;

Amostra 2: $2,5 \times 10^7$ células/mL;

Amostra 3: $1,38 \times 10^7$ células/mL;

Amostra 4: $1,4 \times 10^7$ células/mL;

Amostra 5: $1,25 \times 10^7$ células/mL.

6.3 PBMC infectadas com APEUV

Foram realizados ensaios de qPCR baseados na metodologia TaqMan, utilizando cDNA obtido a partir de mRNA extraído de um *pool* de células mononucleares do sangue periférico (PBMC), oriundas de cinco voluntários saudáveis. Estas células foram divididas em cinco grupos, sendo eles, células infectadas com uma m.o.i.=1, um grupo infectado com uma m.o.i.=3, um grupo controle contendo apenas meio de cultura utilizado na multiplicação viral (*mock*), um grupo não infectado, contendo apenas meio de cultura novo (N.I.) e também um grupo onde as células não passaram por nenhum processo de incubação, ou seja, o RNA foi imediatamente extraído após a separação das PBMC (T0). Todos os grupos, com exceção do T0 foram incubados durante 4 horas. Os resultados foram analisados utilizando o método estatístico $\Delta\Delta Ct$, e mantendo T0 como referência. Os grupos N.I. e *mock*, não apresentaram alterações significativas na expressão dos genes avaliados. Verificou-se que houve um aumento significativo da expressão de TLR9, aproximadamente 4 vezes, nos grupos infectados, tanto com m.o.i.=1 quanto com m.o.i.=3 quando comparados com o T0. A expressão de IFN β , foi ainda mais

elevada nestes grupos, apresentando um aumento de aproximadamente 15 vezes em relação ao T0. Ao avaliar a expressão dos genes TLR3, TLR7 e IFN γ , não foram verificadas alterações significativas comparando-os com o T0 (Figura 14).

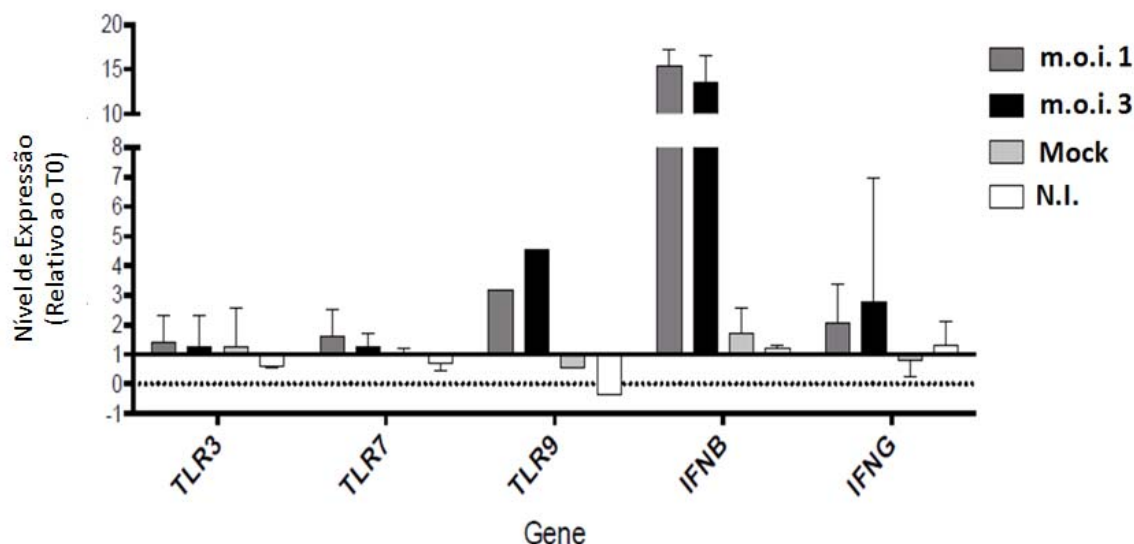


Figura 14: Os níveis de expressão dos genes TLR9 e IFN β estão aumentados em PBMC infectadas por APEUV – Observa-se que não ocorreram alterações significativas na expressão gênica dos grupos não infectados e *mock*. O gene TLR9 e principalmente o gene IFN β (4 e 15 vezes, respectivamente), foram significativamente mais expressos em ambos os grupos infectados (m.o.i.=1 e m.o.i.=3). Não foram observadas alterações significativas na expressão dos genes TLR3, TLR7 e IFN γ .

6.4 Células A549 infectadas com APEUV e VSV nos períodos de 4 e 8 horas

Os resultados descritos referem-se aos ensaios de qPCR baseados na metodologia TaqMan, utilizando cDNA obtido a partir de mRNA extraído de células A549 após 4hs ou 8hs da infecção com APEUV ou VSV virus (vírus ssRNA controle), além de um grupo controle negativo (*mock*) usado como referência para avaliar os níveis de expressão (Figura 15).

Ao avaliar os resultados de células A549 infectadas com APEUV, por um período de 4 horas, comparando-os com os resultados do grupo controle negativo *mock*, observou-se que APEUV induziu um aumento de aproximadamente três vezes na expressão de TLR9. Um aumento discreto na expressão dos genes TRAF3, IRF3, IRF7 foi verificado. Os genes TLR3, TLR7, MYD88, TICAM1, IRAK4, IRF5 e JUN, apresentaram uma pequena diminuição na expressão gênica quando

comparados com o grupo controle negativo. TRAF6 e IFN β não mostraram alterações relevantes nos níveis de expressão.

Após o período de 8 horas de infecção com APEUV apresentou aumento ainda mais significativo na expressão do mRNA de TLR9. Além disso, houve pequeno aumento na expressão dos genes TLR3, TLR7, TRAF3, IRF3, IRF7 e IFN β . Os genes MYD88, TICAM1, IRAK4, TRAF6 e JUN, não apresentaram alterações significativas em suas expressões quando comparados com o grupo controle negativo. Nesta comparação, o gene IRF5 mostrou pequena redução no nível de expressão (Figura 15 A).

Os grupos infectados com o vírus controle (VSV), no período de 4 horas demonstraram aumento de aproximadamente oito vezes na expressão de TLR7 e de aproximadamente seis vezes de IFN β , além de um aumento de aproximadamente duas vezes, na expressão de IRF3 e IRF7. Os genes MYD88, TICAM1, IRAK4 e JUN apresentaram diminuição da expressão quando comparados com o grupo *mock*, sendo que TICAM1 apresentou uma expressão próximo de 0 nesta comparação. TLR3, TLR 9, TRAF3, TRAF6 e IRF5 apresentaram alterações na expressão pouco significativas.

No período de 8 horas, quando comparados com o grupo controle negativo, o grupo infectado com VSV apresentou elevação na expressão dos genes TLR3 (aproximadamente três vezes maior), TLR7 (aproximadamente duas vezes), IRF5 (aproximadamente oito vezes maior) e IFN β (aproximadamente três vezes maior). Um discreto aumento no nível de expressão dos genes IRF7 e JUN também foi observado. Os genes MYD88, TICAM, TRAF3 e IRF3 não apresentaram alterações importantes e os genes TLR9, IRAK4 e TRAF6 apresentaram uma pequena redução no nível de expressão quando comparados com o grupo controle (Figura 15 B).

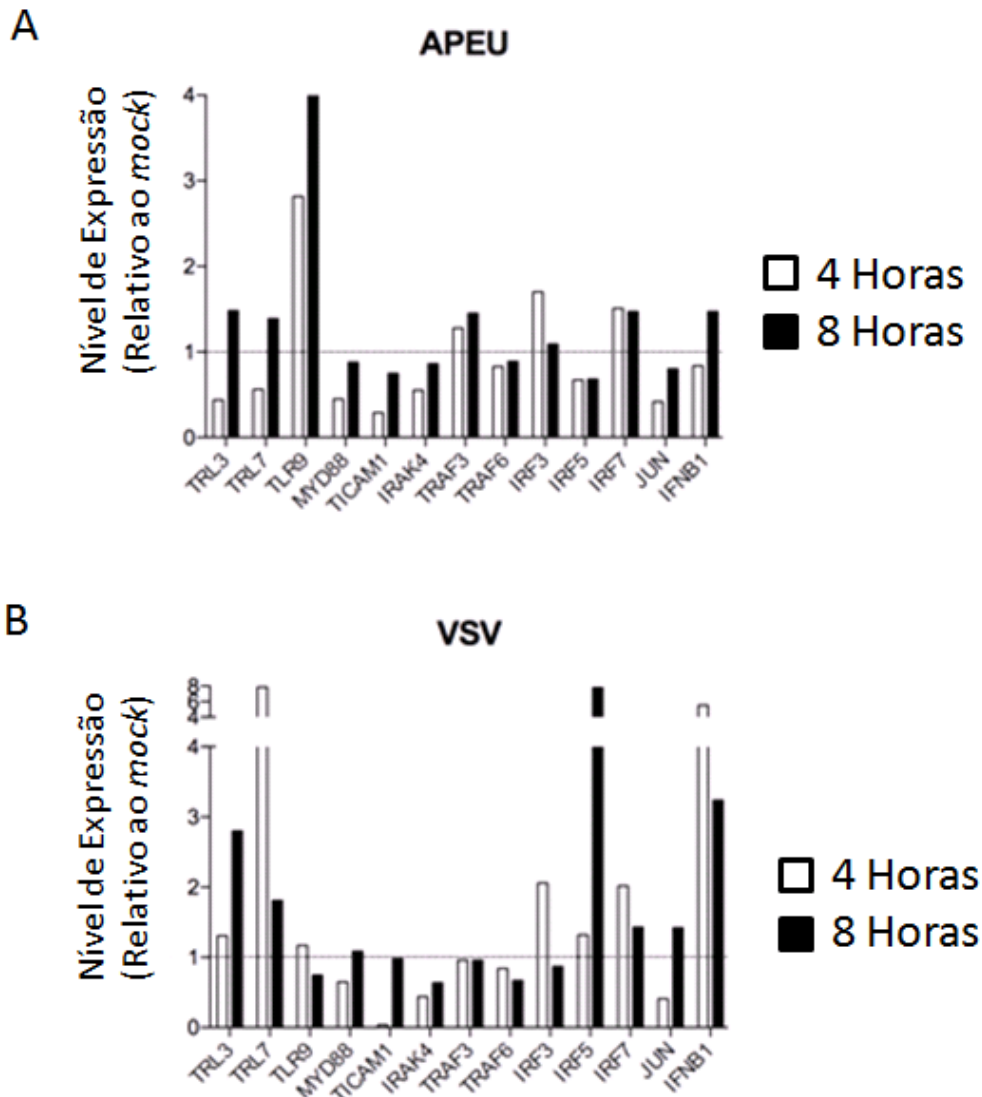


Figura 15: Níveis de expressão de genes envolvidos na resposta imune inata humana (células A549) – Os gráficos representam as alterações nos níveis de expressão, quando comparado o RNA total extraído de células A549 e quantificado por qPCR, após 4 horas ou 8 horas de infecção com APEUV (A) ou com o vírus controle VSV (B) com os do grupo controle negativo (*mock*).

6.5 Infecção de células A549 com APEUV e VSV no período de 4 horas

O RNA extraído das células foi analisado através de eletroforese para verificar a integridade do mesmo. O RNA mensageiro presente na amostra corresponde a cerca de 3% do RNA total na amostra, sendo assim sua integridade não pode ser facilmente confirmada. Porém, O RNA ribossomal, representa cerca de 80% do DNA total de uma mostra, tornando fácil sua detecção. A maior parte deste RNA é composta pelas moléculas 18S e 28S (em mamíferos), e uma das formas mais recorrentes de avaliar a integridade do RNA presente em uma amostra é através da eletroforese do RNA total para em seguida verificar a presença dos segmentos 18S

e 28 S que apresentam, respectivamente, fragmentos de aproximadamente 1,8 Kb e 5 Kb. Quando nítidas, as bandas 18S e 28S são indicativos de que o RNA está intacto (LIFE TECHNOLOGIES, 2015). Neste caso, é possível ver que o RNA das amostras analisadas apresentou certo grau de degradação, devido os rastros presentes no gel, porém grande parte ainda mostrou-se íntegro, uma vez que as bandas 28S e 18S foram visualizadas no gel, sendo assim o RNA estava viável para síntese do cDNA (Figura 16).

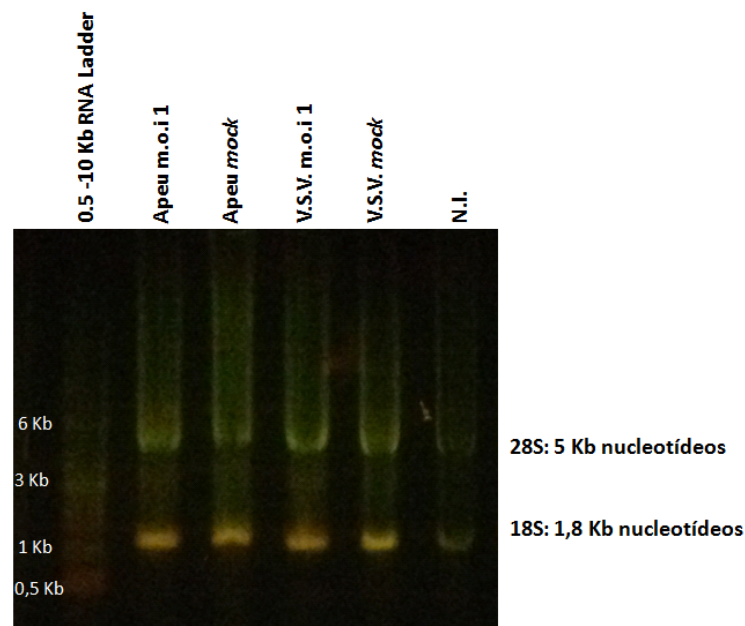


Figura 16: Avaliação da Integridade do RNA extraído de células A549 infectadas com APEUV e VSV no período de 4 horas em gel de agarose a 1% – O gel mostra a viabilidade das amostras para realizar RT-qPCR, através da visualização da presença dos segmentos 18S e 28S que apresentam, respectivamente, fragmentos de aproximadamente 1,8 Kb e 5 Kb.

Após a reação de qPCR, os genes utilizados como controle endógenos para a normalização interna dos dados de expressão dos genes alvo foram submetidos a uma análise estatística no *Software BestKeeper*®. Para determinar qual dos quatro genes testados apresenta melhor resultado para ser utilizado como controle endógeno, determinando como melhor gene para avaliação, o gene HPRT1 (Figura 17).

Os genes estudados foram então avaliados utilizando o gene HPRT1 como controle endógeno, e comparando os resultados dos grupos infectados com seus respectivos *mock* e mantendo como referência para avaliação da diferença de expressão o grupo não infectado (N.I.) gerando os resultados observados na figura

18. A expressão dos genes IFN γ , IFN α e TLR7, foi indeterminada em todos os grupos analisados.

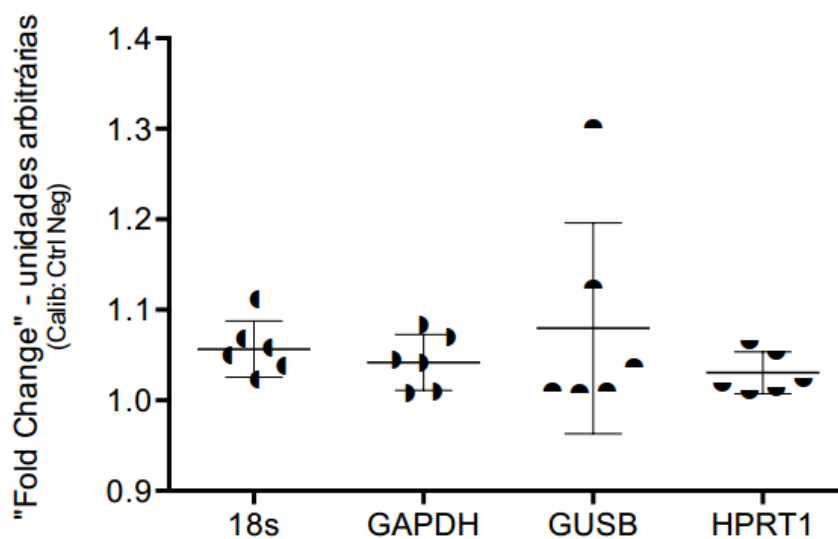


Figura 17: Seleção do gene constitutivo (*housekeeping gene*) – Análise da expressão dos genes constitutivos, para seleção do gene que apresenta expressão mais homogênea dentro dos grupos analisados.

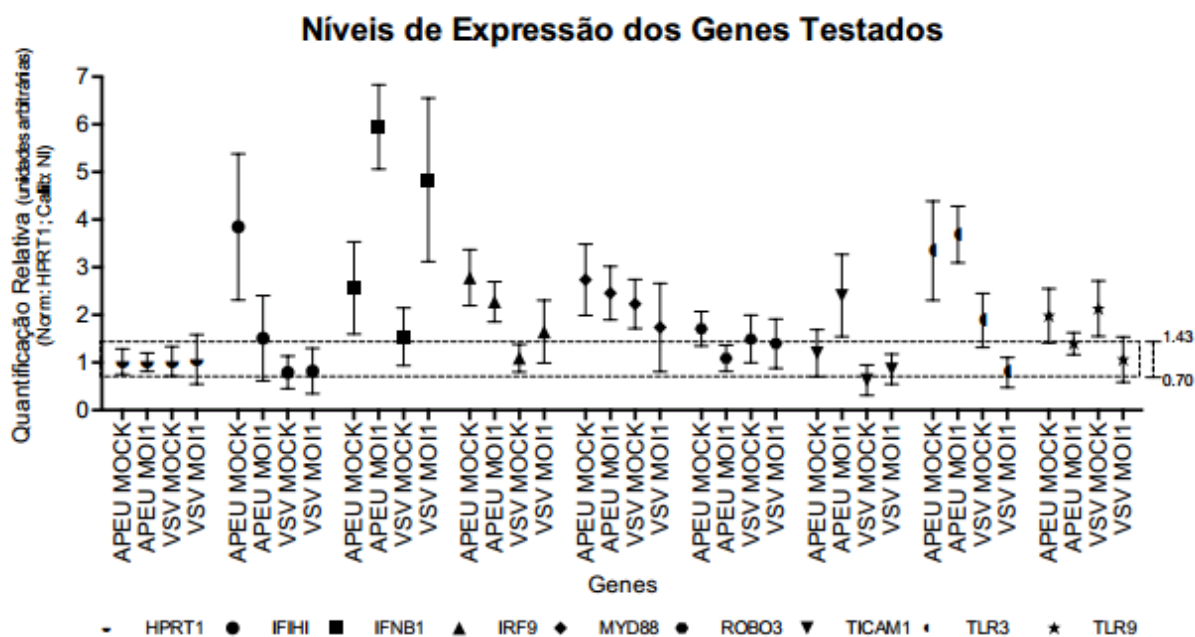


Figura 18: Nível de expressão dos genes avaliados – Análise da expressão dos genes avaliados nas amostras infectadas com APEUV em um m.o.i.=1; em contato com o *mock* do APEUV; infectadas com o vírus VSV e em contato com o *mock* do vírus VSV. Todas as amostras forma comparadas com o grupo não infectado.

Em células infectadas com APEUV e em células em contato com o *mock* deste vírus, verifica-se um aumento da expressão de TLR3 quando comparados com o grupo não infectado. Porém, quando comparados o grupo infectado com APEUV e seu *mock*, é possível ver que não houve diferenças significativas entre esses dois grupos. Além disso, pode-se observar uma diminuição em relação a expressão deste gene em células infectadas com VSV quando comparado com a expressão em células não infectadas, além de uma diminuição significativa da expressão deste gene em células infectadas com VSV quando comparado com o seu *mock*. O *mock* do VSV não apresentou variação da expressão de TLR3 quando comparado com as células não infectadas (Figura 19).

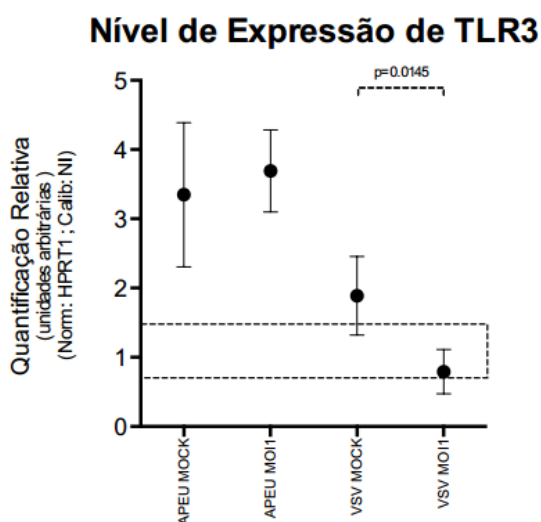


Figura 19: Avaliação da expressão de TLR3 – Expressão do gene TLR3 em células infectadas com APEUV ou VSV e em seus respectivos controles *mock*, comparado com a expressão deste gene em células não infectadas (N.I.).

A avaliação do gene TLR9 evidenciou que em células infectadas com APEUV, não existem alterações significativas na expressão deste gene quando comparado com a expressão deste gene em células que estiveram em contato com o *mock* deste vírus, porém existe um pequeno aumento (2X) da expressão deste gene no grupo *mock* quando comparado com o grupo não infectado. Em células em contato com o *mock* do VSV, verificou-se um aumento da expressão de TLR9 quando comparado com o grupo N.I., e uma diferença significativa na expressão deste gene quando comparados o grupo infectado com o vírus VSV com um m.o.i.=1 e o grupo que esteve em contato com o *mock* (Figura 20).

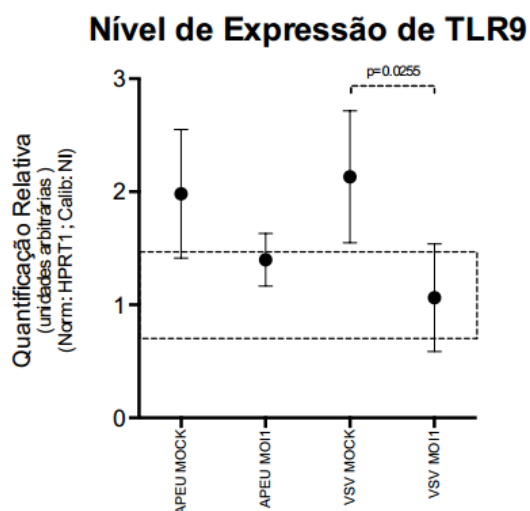


Figura 20: Avaliação da expressão de TLR9 – Expressão do gene TLR9 em células infectadas com APEUV ou VSV e em seus respectivos controles *mock*, comparado com a expressão deste gene em células não infectadas (N.I.).

A expressão do gene IFIH1 (MDA-5), utilizando o grupo N.I. como comparação, não mostrou alterações em células infectadas com APEUV, porém em células que receberam o *mock*, verificou-se um aumento de aproximadamente 4 vezes em relação ao grupo controle. Além disso, comparando o grupo infectado com seu *mock*, observou-se que o *mock* apresenta um aumento significativo na expressão do gene IFIH1 em relação ao grupo infectado. No grupo infectado com VSV e em seu respectivo *mock*, não foram observadas alterações significativas na expressão do gene IFIH1 (Figura 21).

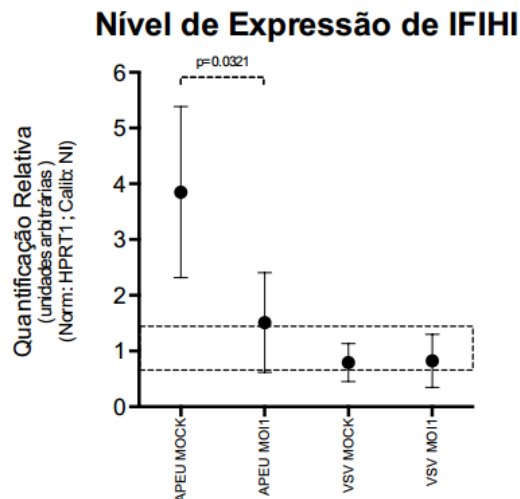


Figura 21: Avaliação da expressão de IFIH1 (MDA-5) – Expressão do gene MDA-5 em células infectadas com APEUV ou VSV e em seus respectivos controles *mock*, comparado com a expressão deste gene em células não infectadas (N.I.).

O gene ROBO3 (RIG-1), não apresentou mudanças em sua expressão, em células infectadas com APEUV, porém, células que receberam o controle *mock* do APEUV, mostraram um pequeno aumento da expressão, quando comparados com células não infectadas. Além disso, entre o grupo infectado com APEUV e o grupo que recebeu apenas o *mock*, verificou-se uma diferença significativa na expressão deste gene, onde células em contato com o *mock* aumentaram a expressão do gene. Em células infectadas com o vírus VSV e em células que receberam o *mock*, não ocorreram alterações consideráveis na expressão deste gene (Figura 22). O gene MyD88, apresentou-se aumentado em todos os grupos, quando comparados com o grupo não infectado (Figura 23).

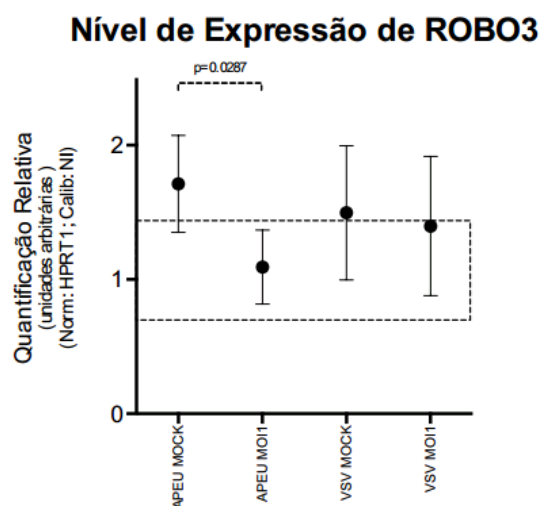


Figura 22: Avaliação da expressão de ROBO3 (RIG-1) – Expressão do gene RIG-1 em células infectadas com APEUV ou VSV e em seus respectivos controles *mock*, comparado com a expressão deste gene em células não infectadas (N.I.).

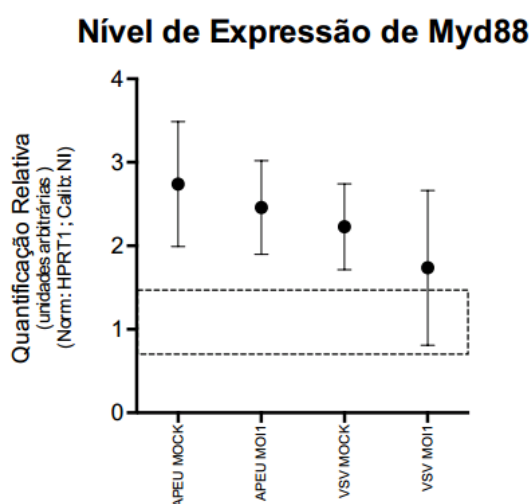


Figura 23: Avaliação da expressão de MyD88 – Expressão do gene MyD88 em células infectadas com APEUV ou VSV e em seus respectivos controles *mock*, comparado com a expressão deste gene em células não infectadas (N.I.).

Para o gene TICAM1, quando os grupos foram comparados com o grupo N.I., foi observado alterações na expressão em células infectadas com o APEUV, e nenhuma alteração na expressão deste gene, nos demais grupos. Comparando ainda o grupo infectado com APEUV com o grupo *mock* deste vírus, verificou-se que ocorreu um aumento significativo na expressão do gene TICAM1 nas células infectadas (Figura 24).

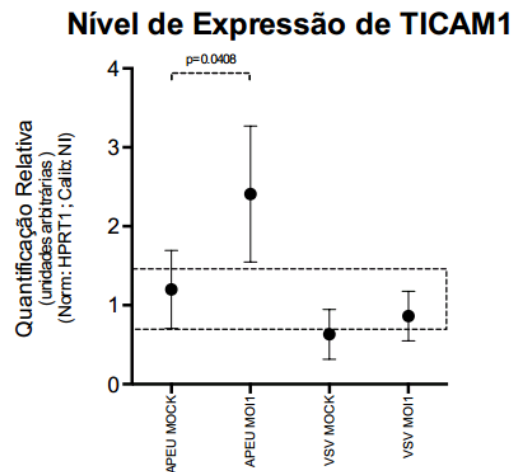


Figura 24: Avaliação da expressão de TICAM1 – Expressão do gene TICAM1 em células infectadas com APEUV ou VSV e em seus respectivos controles *mock*, comparado com a expressão deste gene em células não infectadas (N.I.).

Em células infectadas com o APEUV, observou-se um aumento de aproximadamente 3 vezes do IRF9 e em células que tiveram contato com o *mock* deste vírus, um aumento de aproximadamente 2,5 vezes. Em células infectadas com o vírus VSV e em contato com o seu *mock*, não foram observadas alterações na expressão do gene IRF9 (Figura 25).

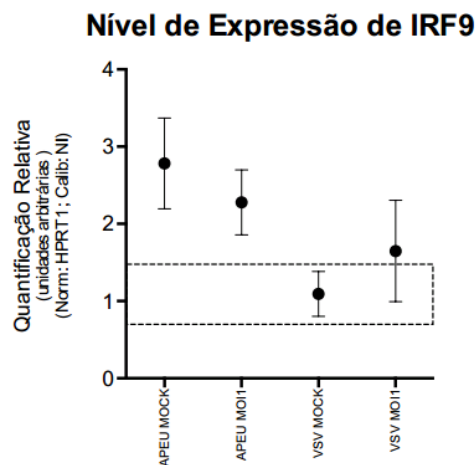


Figura 25: Avaliação da expressão de IRF9 – Expressão do gene IRF9 em células infectadas com APEUV ou VSV e em seus respectivos controles *mock*, comparado com a expressão deste gene em células não infectadas (N.I.).

O gene IFN β (IFNb1), mostrou um aumento em células infectadas tanto com o APEUV, quanto em células infectadas com VSV (6X e 5X respectivamente), quando comparadas com o grupo não infectado. Células que receberam o *mock* dos vírus

não apresentaram alterações na expressão de IFN β . Comparando os grupos infectados com APEUV e VSV com os seus respectivos *mock*, verifica-se um aumento significativo na expressão do gene nos grupos infectados (Figura 26).

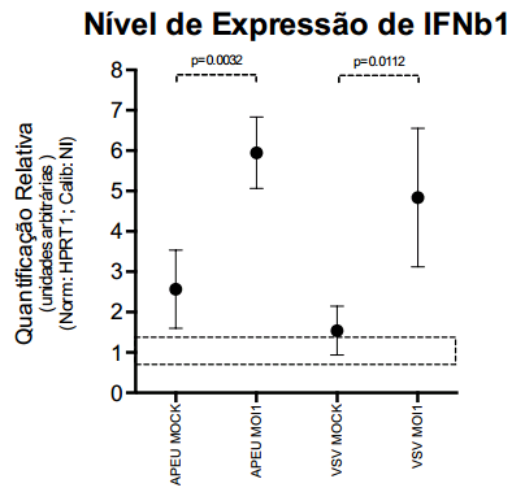


Figura 26: Avaliação da expressão de IFN β 1 (IFN β) – Expressão do gene IFN β em células infectadas com APEUV ou VSV e em seus respectivos controles *mock*, comparado com a expressão deste gene em células não infectadas (N.I.).

7 DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

A infecção por arbovírus geralmente acontece através da inoculação do vírus na pele durante o processo hematofágico feito pelo vetor, no qual o vírus irá infectar inicialmente células dendríticas, como as células de Langerhans, abundantes na epiderme. Estas células infectadas migram para linfonodos próximos, permitindo que o vírus então vá para corrente sanguínea (LE MAY; BOULOY, 2011).

Por se tratar de um arbovírus, a via de infecção do APEUV, ocorre através da infecção vetorial, ocorrendo no momento da hematofagia. Sendo assim, a maneira mais correta de avaliar os primeiros passos da resposta imune inata contra este vírus seria reproduzindo de forma legítima os passos envolvidos no processo infeccioso. O presente projeto objetivou avaliar esta resposta imunológica em seres humanos, e até o presente momento não há metodologias que permitem avaliar este processo tão precoce da infecção em seres humanos. Uma vez que, muito pouco se sabe sobre a interação desses vírus com o sistema imunológico, gerar dados a respeito da resposta celular, mesmo que *in vitro*, é um passo muito importante para entender os mecanismos envolvidos, tanto na infecção viral, quanto na resposta imune do hospedeiro contra o vírus. Desta forma, realizar a infecção *in vitro* de células mononucleares do sangue periférico e de uma célula de linhagem bem estabelecida (A549) com o APEUV, pode induzir importantes alterações na expressão de genes envolvidos na resposta imune inata humana e essas alterações podem ser detectadas pela técnica de qPCR durante as etapas iniciais da infecção, gerando dados significativos que no futuro, podem contribuir para o entendimento da infecção por este vírus.

Na fase aguda de uma infecção viral, o controle da multiplicação e disseminação do vírus é feito principalmente por macrófagos, células NK e IFN tipo I (IFN α e IFN β) (CHADHA; 2004). Utilizar PBMC neste estudo permite uma análise mais próxima do que realmente acontece no organismo após o contato com o vírus, podendo avaliar a alteração da expressão de genes envolvidos com a resposta precoce que ocorre nestas células quando em contato com o APEUV.

Para avaliar a expressão gênica em células mononucleares do sangue periférico após a infecção pelo APEUV por um período de 4 horas. As PBMC foram divididas em cinco grupos, onde um grupo foi infectado com o vírus alvo do estudo (APEUV) com um m.o.i.=1 (m.o.i.1); o segundo grupo infectado com um m.o.i.=3 (m.o.i.3), o terceiro grupo foi utilizado como grupo controle e recebeu apenas o

sobrenadante de meio de cultura utilizado na multiplicação viral (*mock*), o quarto, utilizado também como controle, recebeu apenas o meio de cultura utilizado no processo da infecção (N.I.) e o quinto grupo, consiste em células que não passaram por nenhum processo de incubação, ou seja, o RNA foi imediatamente extraído após a separação das PBMC (T0).

Ao analisar os resultados utilizando o método estatístico $\Delta\Delta Ct$ e mantendo como valor de referência o T0, foi possível observar que os grupos N.I. e *mock*, não sofreram alterações significativas na expressão dos genes avaliados em relação ao T0. Células infectadas com o vírus tanto em m.o.i.=1 quanto em células infectadas com m.o.i.=3, apresentaram um aumento na expressão de TLR9, de aproximadamente 4 vezes.

Sabe-se que TLR9 é um PRR capaz de reconhecer principalmente regiões CpG não metiladas em moléculas de DNA, muito comuns em algumas bactérias e em vírus que possuem genoma de DNA, e induzir a expressão de IFN do tipo 1 (BOWIE; HAGA, 2005). Estas informações despertam a atenção para o dado obtido em relação ao aumento da expressão de TLR9, uma vez que, o APEUV, assim como os demais vírus da família *Bunyaviridae*, possuem seu genoma composto por três segmentos de RNA fita simples. Para vírus de RNA, esperava-se que a célula, induzisse a expressão de PRR envolvidos com o reconhecimento de vírus de RNA, ou seja, TLR3 capaz de reconhecer RNA de fita dupla e/ou TLR7 capaz de reconhecer RNA de fita simples (THOMPSON; LOCARNINI, 2007).

Os receptores de reconhecimento padrão são capazes de identificar componentes de microrganismos estimulando a síntese e liberação de citocinas pró-inflamatórias, mas além disso, os TLR reconhecem ainda, além dos PAMP, moléculas endógenas liberadas em resposta ao estresse ou dano tecidual, conhecidas como Padrão Molecular Associado ao Perigo (DAMP). O acoplamento destas moléculas aos TLR irá ativar múltiplas cascatas de sinalização que irão resultar na indução de genes envolvidos em respostas imunitárias inatas. (AKIRA, 2009; LEE; AVALOS; PLOEGH, 2012; DE MEDEIROS PINHEIRO, 2011; KONDO; KAWAI; AKIRA, 2012).

Sendo assim, este resultado inicial indica que TLR9 pode estar envolvido com a resposta antiviral de um vírus de RNA. Mas também é possível que estes dados tenham relação com a liberação de moléculas próprias das PBMC durante todo o processo de extração e cultura. Ao retirar as células de seu ambiente natural, uma série de fatores exógenos, como temperatura, pH, além da própria manipulação das

células podem ter causado a morte de algumas células, liberação de moléculas de DNA no meio extracelular, induzindo o aumento da expressão de TLR9.

A expressão de IFN β , nos grupos infectados (m.o.i.=1 e m.o.i.=3) foi ainda mais elevada, apresentando um aumento de aproximadamente 15 vezes em relação ao T0. De acordo com a literatura, estes dados são concordantes com o esperado, uma vez que, em geral, após a infecção viral a primeira resposta contra o vírus consiste em uma reação inflamatória, onde serão secretados mediadores solúveis tais como citocinas e quimiocinas. Entre estes mediadores, os IFN (principalmente os IFN I), apresentam grande importância na montagem de uma resposta imunológica rápida que tem como objetivo bloquear a replicação viral. Os IFN tipo I, ao interagir com uma célula não infectada, irão protegê-la contra a infecção viral, e ainda, colaborar com a resposta imune adaptativa (LE MAY; BOULOY, 2011).

Ao avaliar a expressão dos genes TLR3, TLR7 e IFN γ , verifica-se que não ocorreram alterações significativas comparando-os com o T0. Estes resultados indicam que os genes TLR9 e IFN β podem estar relacionados com alterações na resposta imune humana em fases iniciais da infecção por APEUV.

Para verificar se as alterações ocorridas na expressão dos genes relacionados com a resposta imune inata em PBMC realmente estavam relacionadas com a infecção por APEUV, foi feito o segundo experimento que consiste em utilizar uma linhagem de cultura celular bem estabelecida que não passasse por tantos processos de manipulação para sua obtenção, reduzindo assim o estresse sofrido pela célula. Optou-se então em trabalhar com a linhagem celular A549.

As células A549, apesar de serem originadas de carcinoma, apresentam as características de células alveolares, sendo capazes de secretar IFN. Estas células têm sido amplamente utilizadas na avaliação de respostas antivirais, incluindo estudos feitos com Orthobunyavirus (ARNOLD *et al*, 1994; BRASIER, 2004; MOHAMED; MCLEES; ELLIOTT, 2009; VAN KNIPPENBERG; CARLTON-SMITH; ELLIOTT, 2010). As vantagens de se utilizar estas células neste projeto consistem no fato de que, além de reduzir a manipulação das células, ao utilizar uma cultura celular bem estabelecida, garante-se que haja uma redução na variabilidade entre os diferentes grupos, uma vez que em PBMC, existe uma grande diferença entre os indivíduos avaliados como, por exemplo, fator nutricional, processos infecciosos, idade, sexo, população celular diferenciada, entre outros. Estas variações podem interferir na expressão dos genes estudados. Ao trabalhar com células A549 todas

as células apresentam características muito semelhantes umas às outras, uma vez que são originadas do mesmo clone. Além disso, quando comparadas com as PBMC, observa-se uma facilidade maior em se obter o número de células, permitindo reproduzir os experimentos com maior facilidade quando necessário.

Além de utilizar células mais homogêneas, incluiu-se neste experimento um vírus controle. O vírus da estomatite vesicular (VSV) é um membro da família *Rhabdoviridae*, e apresenta genoma de RNA fita simples, não segmentado e de sentido negativo (FLORES, 2007). É um vírus muito sensível a resposta antiviral desencadeada pelos IFN do tipo I, o que faz com que as células sejam induzidas a produzir IFN tipo I quando desafiadas com VSV (HUANG; *et al*, 1993; MULLER; *et al*, 1994; TROTTIER; REISS; LYLES, 2007). Por este motivo, o VSV foi utilizado como vírus controle da indução de IFN.

A fim de verificar os primeiros passos do APEUV na indução da ativação do sistema imune inato, foram feitos ensaios de qPCR baseados na metodologia TaqMan, utilizando cDNA obtido a partir de mRNA extraído de células A549 após 4hs ou 8hs da infecção com APEUV ou VSV vírus (vírus ssRNA controle), além de um grupo controle (*mock*) que foi mantido como referência para as análises.

Verificou-se que o APEUV induziu um aumento da expressão de TLR9, diferentemente do VSV que aumentou a expressão de TLR7. O vírus controle (VSV) apresentou resultados dentro do esperado, induzindo o aumento da expressão de um gene relacionado a um receptor do tipo *toll* envolvidos com o reconhecimento de vírus de RNA, o TLR7 capaz de reconhecer RNA de fita simples (THOMPSON; LOCARNINI, 2007). Porém, o APEUV, que também é um vírus de RNA, induziu o aumento de TLR9, e como descrito anteriormente, o TLR9 é um receptor capaz de reconhecer moléculas de DNA e diante uma infecção com um vírus de RNA, como o APEUV não esperava-se um aumento da expressão deste PRR.

Observa-se também, que após 4 horas de infecção, ocorre a redução da expressão de TICAM tanto em APEUV quanto em VSV, TICAM I, também chamado de TRIF, é uma molécula adaptadora, essencial para sinalização independente de MyD88 mediada pelos receptores TLR3 e 4 (OSHIUMI; *et al*, 2003; SEYA; *et al*, 2005). A redução na expressão deste gene provavelmente se deve ao fato de que, tanto os receptores TLR7 quanto o TLR9, que estão sendo mais expressos diante da infecção com VSV e APEUV respectivamente, dependem da molécula adaptadora MyD88 e não de TICAM I, para induzir a expressão de IFN I, sendo assim, é possível

que a expressão da molécula TICAM I não seja necessária neste período da infecção (THOMPSON; LOCARNINI, 2007).

Os fatores reguladores de interferon (IRF) 3 e 7, desempenham papel importante na resposta inata antiviral. A ativação destes IRF desencadeia a expressão de IFN β (DE LENDONCK; MARTINET; GORIELY, 2014). No período de 4 horas verifica-se um pequeno aumento na expressão de IRF3 e 7, tanto em células infectadas com APEUV quanto em células infectadas com VSV enquanto que, no tempo de 8 horas de infecção, verifica-se que estes genes sofrem uma redução em seu nível de expressão nos dois grupos infectados. Existe a possibilidade, de este resultado ocorrer, devido à necessidade da expressão destas moléculas no período de quatro horas, para que haja um aumento da expressão de IFN, e conseqüentemente a eliminação do vírus, enquanto que, no período de 8 horas, já foram sintetizadas moléculas IRF3 e 7 suficientes para resposta inata contra o vírus.

Os dois vírus foram capazes de aumentar a expressão de TLR3 no período de 8 horas. O TLR3 reconhece principalmente RNA viral dupla fita e ativa uma via independente de MyD88, utilizando uma via alternativa que envolve a proteína adaptadora TRIF. A proteína TRIF ativa um complexo de moléculas e este complexo promove a fosforilação de IRF que são translocados para o interior do núcleo induzindo a expressão de genes de IFN do tipo I, principalmente IFN β . O RNA dupla fita é um intermediário gerado durante o ciclo de replicação do APEUV e VSV (YAMAMOTO; *et al*, 2004; ALEXOPOULOU; *et al*, 2001; MATSUMOTO; SEYA, 2008; CREAGH; *et al*, 2006; THOMPSON; LOCARNINI, 2007; KAWAI; AKIRA, 2008). É provável que neste período de 8 horas, os vírus já iniciaram o processo de replicação, induzindo a célula a expressar o gene responsável pelo TLR3.

Observou-se também o aumento de 8 vezes na expressão IRF5 após 8hs da incubação com VSV. O IRF5 é essencial para a indução de citocinas inflamatórias e também funciona em conjunto com IRF3 e IRF7 para mediar a produção de IFN tipo I nas respostas contra infecções virais (REN; CHEN; CHEN, 2014).

Finalmente, é possível observar a indução da expressão do gene IFN β em células infectadas com VSV, mas não em células infectadas com APEUV, no tempo de 4 horas de infecção. No período de 8 horas de infecção, há uma redução, da expressão de IFN β em células infectadas com VSV, mas ainda assim, mais expresso que no grupo *mock*. Já em células infectadas com APEUV, percebe-se

aumento discreto na expressão de IFN β , mas baixo quando comparado com o grupo controle VSV.

O principal mecanismo da resposta imune inata para o controle das infecções virais ocorre através da secreção dos IFN do tipo I que induz um estado antiviral nas células para protegê-las contra a infecção (MACHADO *et al*, 2004). Este resultado indica que o IFN β , em células infectadas com APEUV em um período de até 8 horas, ou não está sendo muito expresso, devido a expressão de outro tipo de IFN, ou ainda não recebeu o estímulo para o aumento de sua expressão.

Comparando o vírus VSV com APEUV, é possível que estes vírus sejam capazes de reconhecer diferentes gatilhos e vias de sinalização intracelular conduzindo para a diferenças nas respostas imunitárias e, conseqüentemente, na determinação do potencial patogênico dos vírus testado.

Na tentativa de melhorar os resultados obtidos, foi realizada uma busca na literatura onde se verificou a necessidade de um normalizador que possua grande eficiência para evitar erros analíticos referentes à quantidade de DNA alvo presente em cada amostra. Constatou-se então que seria preciso preparar um modelo exato e competente de normalização.

A eficiência e fidelidade dos resultados obtidos através de técnicas avançadas de biologia molecular, como a qPCR é um reflexo da normalização adequada dos dados quantificados. Sendo assim, alguns parâmetros devem ser levados em consideração, como por exemplo, a utilização da mesma quantidade inicial de amostra, a padronização da síntese de cDNA, e a escolha do gene de referência e do modelo matemático para a análise dos dados (THELLIN; *et al*, 1999).

Genes normalizadores (genes de referência) são genes constitutivos também chamados de *housekeeping*, são genes responsáveis por funções essenciais na manutenção do funcionamento celular. Para que um gene seja utilizado como um normalizador, deve apresentar expressão constante independente dos estágios de desenvolvimento, tipos celulares e condições fisiológicas. No entanto, para utilizar estes genes como referência, é necessária uma validação prévia da estabilidade de sua expressão, evitando interpretações erradas dos resultados obtidos (PFAFFL; *et al*, 2004).

Os genes constitutivos quantificados foram submetidos à análise em *Software BestKeeper*[®] onde foi possível observar que dentre os quatro genes avaliados (18S, GAPDH, GUSB e HPRT1), o gene HPRT1 foi o gene que manteve sua expressão

menos variável, dentro dos grupos avaliados e por esse motivo, foi o escolhido para ser o gene normalizador.

De acordo com os dados observados na quantificação da expressão de genes por PCR quantitativa em tempo real de células A549 infectadas nos períodos de 4 horas com APEUV e VSV (Infecção em garrafas - $7,5 \times 10^6$ células). Observou-se que em tanto em células infectadas com APEUV, como em células em contato com o *mock* deste vírus, ocorreu um aumento da expressão de TLR3. Como descrito anteriormente, o TLR3 é um PRR responsável por reconhecer RNA de fita dupla, sendo assim, é possível que estes dados indiquem que o vírus já tenha infectado a célula com o período de quatro horas, e que a replicação viral, que gera fitas de RNA dupla fita, induz a célula a expressar o receptor responsável por reconhecer esta molécula. Porém, o que se observa é que o *mock* deste vírus também está induzindo a expressão deste gene, dificultando a corroboração desta hipótese. Além disso, este gene não está sendo induzido em células infectadas com VSV, que também é um vírus de RNA fita simples e que durante a replicação gera um segmento de RNA fita dupla, e que também deveria induzir a expressão de TLR3. Sendo assim, é possível que o dado indique que o vírus VSV ainda não tenha dado início a sua replicação no período de quatro horas, ou seja, o tempo para o início da replicação do VSV é mais longo que o do APEUV. Outra hipótese provável para este dado, é que tanto no sobrenadante que continha o APEUV, quanto no *mock*, existe a presença de alguma molécula que induz a expressão de TLR3.

É interessante observar que o gene TLR9 também se mostrou mais expresso em células que receberam o controle *mock* do que em células infectadas com os vírus. Este gene reconhece principalmente regiões CpG não metiladas de DNA. Durante o processo de multiplicação viral, o *mock* é feito consecutivamente, de forma que, células Vero, passam por todo processo de manipulação e incubação pelo qual passaram as células Vero que foram infectas pelo vírus no processo de multiplicação. As células ficam incubadas por aproximadamente três dias até que ocorra efeito citopático e o vírus possa ser coletado no sobrenadante de cultura. É possível que durante este processo, as células não infectadas sofram, não com o vírus, mas com um estresse causado pela falta de nutrientes e pela própria manipulação, e que dessa forma, libere uma série de citocinas solúveis no meio extracelular. Estas citocinas, quando em contato com outras células, como no presente projeto, onde o a adição do *mock* pode estar induzindo a transcrição de genes envolvidos com a resposta imunológica. Além disso, células mortas irão

liberar moléculas que, como citado anteriormente, serão reconhecidas pelos PRR como DAMP e dessa forma irão ativar a expressão de genes da resposta imune inata.

Além dos genes envolvidos com a expressão dos TLR3 e 9, nota-se que os genes IFIHI (MDA-5), ROBO3 (RIG-I) e MyD88, ficaram mais expressos no grupo que recebeu o *mock* do APEUV. Estes dados reforçam a ideia de que existem moléculas presente no *mock* deste vírus que induzem a expressão de genes da resposta imune inata das células em contato com o mesmo. Esta teoria faz ainda mais sentido, quando se observa que o APEUV tem um tempo de incubação de 72 horas antes de ser coletado, dessa forma, as células Vero que não recebem o vírus, ou seja, que terão seu sobrenadante utilizado como *mock*, passam pelo mesmo período de incubação, podendo sofrer um estresse que induz a morte celular e liberação de moléculas no meio de cultura, que mais tarde será recolhido para compor o *mock*. O *mock* do VSV não induz a expressão desses genes, e o motivo mais provável é que o vírus VSV é recolhido com apenas 24 horas de incubação, sendo que seu *mock* também é recolhido dentro do mesmo período, dessa forma, as células Vero utilizadas no processo de multiplicação do VSV e da obtenção do *mock* passam por um tempo de cultura muito menor e conseqüentemente um estresse menor, não liberando ou liberando uma quantidade muito pequena de moléculas que possam ser reconhecidas como DAMP.

Outro dado que reforça essa hipótese é o fato de que, como o título do VSV é muito mais alto que o do APEUV utilizado para infectar as células (VSV = $10^{8,5}$ PFU/mL e APEUV = $10^{6,62}$ PFU/mL), o volume de suspensão viral para infectar as células com VSV foi menor que o volume utilizado para infectar as células com APEUV. Como se utilizou o mesmo volume usado da suspensão viral para o seu respectivo *mock*, o volume de *mock* usado para o controle do VSV foi muito menor que o utilizado para o controle do APEUV, e dessa forma, a quantidade de moléculas que poderiam ser reconhecidas como DAMP foi muito maior para o controle do APEUV.

Dados que corroboram com os dados obtidos anteriormente, refere-se ao aumento da expressão de IFN β tanto em células infectadas com APEUV, quanto em células infectadas com VSV, mostrando que no período de quatro horas de infecção, os vírus induzem uma resposta antiviral nas células onde ocorre a secreção de IFN. Observa-se ainda que as células que foram incubadas com o *mock* expressam esse gene em uma quantidade muito menor, indicando que as moléculas presentes no

mock, que induziram a expressão de outros genes, não estão induzindo a expressão de IFN β . Além disso, esse dado indica que no tempo de quatro horas já houve o reconhecimento do vírus e a indução da expressão de IFN tipo I.

O gene TICAM I em APEUV mostrou elevação significativa quando comparado com o *mock* deste vírus, indicando que provavelmente uma via dependente desta molécula será importante na resposta contra este vírus, provavelmente a via TLR3, que será induzida pelas moléculas dsRNA produzidas na replicação do vírus.

Em células infectadas com o APEUV, observou-se um aumento de aproximadamente 3 vezes do IRF9. O gene IRF9 é um fator regulador de IFN que medeia à sinalização de IFN tipo I, após a sinalização que ocorre da ligação de IFN tipo I a receptores celular de superfície. Ou seja, este IRF estimula a expressão de IFN tipo I em resposta à presença de IFN tipo I no meio extracelular (REICH, 2002). A expressão desse gene indica que, provavelmente a célula já está secretando IFN I em resposta a presença do vírus o que induz a expressão do gene IRF9 para auxiliar na indução de um estado antiviral na célula. Este resultado mostra que o tempo de 4 horas não é o ideal para avaliar a expressão de genes que são ativados mais precocemente na resposta imune inata contra o vírus APEUV.

8 CONCLUSÃO

Células A549 infectadas com APEUV com um m.o.i.=1 e em um período de quatro horas tendem a induzir a expressão dos genes IFN β e TICAM I, importantes na indução de um estado celular antiviral.

9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao infectar PBMC com o APEUV ocorreram alterações na expressão de genes envolvidos na resposta imune inicial, e estas alterações foram detectadas através da metodologia de qPCR. Porém, apesar de representar de forma mais fidedigna o processo natural de infecção pelo vírus, as PBMC apresentam um grande número de variáveis, que podem levar a interpretações errôneas a respeito da resposta imune contra o vírus estudado.

Utilizar uma linhagem celular bem estabelecida permite eliminar um grande número de variáveis, auxiliando no estudo da resposta imune inicial contra o APEUV. Sendo necessário também, determinar um gene constitutivo que apresente expressão constante independente dos estágios de desenvolvimento, tipos celulares e condições fisiológicas, sendo que, este gene seja previamente validado evitando interpretações erradas dos resultados obtidos.

No período de 4 horas de infecção em células A549 apresentaram um aumento da expressão de IRF9, indicando que este é um período onde já houve a secreção de IFN pela célula. Um estudo de cinética em diferentes tempos, para verificar a ativação de genes envolvidos com a resposta imune inata é necessário para verificar quais os melhores tempos para analisar as vias de ativação da resposta imune inata em células humanas infectadas com este vírus.

O *mock* utilizado como controle da produção viral, consiste no sobrenadante de cultura coletado de células idênticas às utilizadas na multiplicação viral, e que passaram pelo mesmo processo de incubação. Este controle tem como objetivo detectar alterações que possam ocorrer pela indução de alguma molécula presente no meio de cultura. Porém, o que ficou evidenciado neste projeto é que, os estresses sofridos pelas células usadas no preparo do *mock*, durante o processo de incubação podem causar a liberação de moléculas que irão induzir a expressão de genes que participam da resposta inata. Fazendo com que células em contato com o *mock* também mostrem alterações na expressão desses genes. Dessa forma, a melhor maneira para avaliar a expressão de genes da resposta imune inata frente à infecção por um vírus, seria utilizar o vírus purificado, ou seja, sem meio de cultura, eliminando a necessidade de um controle do meio utilizado (*mock*).

Foi possível quantificar, por qPCR, a expressão de genes relacionados à imunidade inata humana após infecção pelo APEUV. Porém, ainda não foi possível identificar as vias dos mecanismos que fornecem a primeira linha de defesa contra o

vírus. É necessário empregar métodos mais apurados para que seja possível o conhecimento dos principais mecanismos de resposta imune contra o vírus estudado, auxiliando assim na compreensão da patogênese das doenças causadas por este vírus, bem como das diferentes estratégias do hospedeiro e do vírus envolvidas neste processo.

10 PERSPECTIVAS

- Deseja-se obter um número de voluntários maior, para realizar a análise da expressão de genes envolvidos com a imunidade inata em PBMC infectadas com APEUV;
- Multiplicar, purificar e titular os APEUV e VSV, eliminando assim a necessidade do controle *mock*;
- Realizar a análise da expressão de diferentes genes constitutivos, para seleção de genes que apresentam expressão homogênea nas células que serão estudadas determinando o melhor *gene housekeeping*, para o estudo;
- Pretende-se ainda, realizar um estudo de cinética em diferentes tempos inferiores há quatro horas, para verificar a ativação de genes envolvidos com a resposta imune inata, por qPCR, em PBMC e A549 na fase aguda da infecção com o *Apeu virus* e utilizando ainda como controle de vírus ssRNA o VSV;
- Identificar as vias dos mecanismos que fornecem a primeira linha de defesa contra o APEUV em células humanas.

11 REFERÊNCIAS

ARNOLD, R.; HUMBERT, B.; WERCHAU H.; GALLATI, H.; KONIG, W. Interleukin-8, interleukin-6, and soluble tumour necrosis factor receptor type I release from a human pulmonary epithelial cell line (A549) exposed to respiratory syncytial virus. *Immunology*, 1994.82(1):126–133.

BASTOS, M.S., FIGUEIREDO L.T., NAVECA F.G., MONTE R.L., LESSA N., PINTO DE FIGUEIREDO R.M., GIMAQUE J.B., PIVOTO JOÃO G., RAMASAWMY R., MOURÃO M.P. Identification of Oropouche Orthobunyavirus in the cerebrospinal fluid of three patients in the Amazonas, Brazil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 2012. 86(4):732-735.

BHAKAT, S.; KARUBIU, W.; JAYAPRAKASH, V.; SOLIMAN, M.E.S. A perspective on targeting non-structural proteins to combat neglected tropical diseases: Dengue, West Nile and Chikungunya viruses. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2014. 87:677-702.

BOWDEN, T.A., DAVID, B.D.; MCLEES, A.; YEROMONAHOS, C.; ELLIOTT, R.M. Orthobunyavirus Ultrastructure and the Curious Tripodal Glycoprotein Spike. *PLoS Pathog*, 2013. 9(5).

BOWIE, A.G.; HAGA, I.R. The role of Toll-like receptors in the host response to viruses. *Molecular immunology*, 2005.42(8):859-867.

BRASIER, A.R.; SPRATT, H.; WU, Z.; BOLDOGH, I.; ZHANG, Y.; GAROFALO, R.P.; CASOLA, A.; PASHMI, J.; HAAG, A.; LUXON, B.; KUROSKY, A. I. Nuclear heat shock response and novel nuclear domain 10 reorganization in respiratory syncytial virus-infected a549 cells identified by high-resolution two-dimensional gel electrophoresis. *Journal of virology*, 2004.78(21):11461-11476.

CALISHER, C.H. History, classification, taxonomy of viruses in the family bunyaviridae. In: *The Bunyaviridae*. Elliott RM, 1996. New York: Plenum Press, 1–17.

CAUSEY, O.R.; CAUSEY, C.E.; MAROJA, O.M.; MACEDO, D.G. The isolation of arthropod-borne viruses including members of two hitherto undescribed serological groups, in the Amazon Region of Brazil. *Am J Trop Med Hyg*, 1961. 10:227-249

CHADHA, K.C.; AMBRUS, J.L.J.; DEMBINSKI, W.; AMBRUS, J.L. IFN and interferon inhibitory activity in disease and therapy. *Exp Biol Med.*, 2004. 229:285-290.

CIOTA, A.T.; KRAMER, L.D. Insights into arbovirus evolution and adaptation from experimental studies. *Viruses*, 2010. 2(12):2594-2617.

CLETON, N.; KOOPMANS, M.; REIMERINK, J.; GODEKE, G.J.; REUSKEN, C. Come fly with me: Review of clinically important arboviruses for global travelers. *Journal of Clinical Virology*, 2012. 55(3):191-203.

COFFEY, L.L.; FORRESTER, N.; TSETSARKIN, K.; VASILAKIS, N.; WEAVER, S.C. Factors shaping the adaptive landscape for arboviruses: implications for the emergence of disease. *Future Microbiology*, 2013. 8(2):155-176.

DE BRITO MAGALHÃES, C.L.; DRUMOND, B.P.; NOVAES, R.F.V.; QUINAN, B.R., DE MAGALHÃES, J.C.; DOS SANTOS, J.R.; FERREIRA, P.C.P. Identification of a phylogenetically distinct orthobunyavirus from group C. *Archives of virology*, 2011. 156(7):1173-1184.

DE LENDONCK, L.Y.; MARTINET, V.; GORIELY, S. Interferon regulatory factor 3 in adaptive immune responses. *Cellular and molecular life sciences*, 2014. 71(20):3873-3883.

DOMINGO, E. Mechanisms of viral emergence. *Sciences*, 2010. 41(6); 38-52.

ELLIOTT, R.M. Orthobunyaviruses: recent genetic and structural insights. *Nat Rev Microbiol.*, 2014. 12(10):673-685.

EMENY, J.M.; MORGAN, M.J. Regulation of the interferon system: evidence that Vero cells have a genetic defect in interferon production. *Journal of General Virology*, 1979. 43(1):247-252.

EVERETT, H.; MCFADDEN, G. Apoptosis: an innate immune response to virus infection. *Trends in microbiology*, 1999. 7(4):160-165.

FERRAZ, E.G.; SILVEIRA, B.B.B.; SARMENTO, V.A.; SANTOS J.N. Receptores Toll-Like: ativação e regulação da resposta imune, RGO, 2011. 59(3):483-490.

FIGUEIREDO, L.T.M. Emergent arboviruses in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2007. 40(2):224-229.

FLORES, EF. *Virologia veterinária*. Santa Maria: UFSM; 2007. 54-55.

GIARD, D.J.; AARONSON, S.A.; TODARO, G.J.; ARNSTEIN, P.; KERSEY, J.H.; DOSIK, H.; PARKS, W.P. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst.*, 1973. 51(5):1417-1423.

GO, Y.Y.; BALASURIYA, U.B.R.; LEE, C.K. Zoonotic encephalitides caused by arboviruses: transmission and epidemiology of alphaviruses and flaviviruses. *Clin Exp Vaccine Res*, 2014. 3(1): 58-77.

GONZALEZ-SCARANO, F.; SOLDAN, S.S. Emerging Infectious diseases: the Bunyaviridae. *Journal of Neurovirology Reviews*, 2005.11(5):412-423.

GONZALEZ-SCARANO, F.; NATHANSON, N. *Bunyaviridae*. In BN Fields, DM Knipe (eds), *Fields Virology*. Raven Press, New York, 1996. 1473-1504.

GUBLER, D.J. Dengue and hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev*, 1998. 11(3):480-496.

GUBLER, D.J. Human arbovirus infections worldwide. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2001. 951(1):13-24.

GUBLER, D.J. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems - Reviews. Archives of Medical Research, 2002. 33(4):330-342.

GUIDOTTI, L.G.; CHISARI, F.V. Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. Annual review of immunology, 2001. 19(1):65-91.

HART, T.J.; KOHL, A; ELLIOTT, R.M. Role of the NSs protein in the zoonotic capacity of Orthobunyaviruses. Zoonoses Public Health, 2009. 56(6-7):285-296.

HUANG, S.; HENDRIKS, W.; ALTHAGE, A.; HEMMI, S.; BLUETHMANN, H.; KAMIJO, R.; VILCEK, J.; ZINKERNAGEL, R.M.; AGUET, M. Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor. Science, 1993. 259:1742–1745.

LE MAY, N.; BOULOY, M. Antiviral escape strategies developed by bunyaviruses pathogenic for humans. Frontiers in bioscience (Scholar edition), 2011. 4:1065-1077.

LIFE TECHNOLOGIES. Assessing RNA Quality. TechNotes 11(1). Acesso em: 03 de fevereiro de 2015. Disponível em: <http://www.lifetechnologies.com/br/en/home/references/ambion-tech-support/rna-isolation/tech-notes/assessing-rna-quality.html>

MACHADO, P.R.L.; ARAÚJO, M.A.S.; CARVALHO, L.; CARVALHO, E.M. Immune response mechanisms to infections. Anais Brasileiros de Dermatologia, 2004. 79(6):647-662.

MARKLEWITZ, M.; ZIRKEL, F.; RWEGO, I.B.; HEIDEMANN, H.; TRIPPNER, P.; KURTH, A.; JUNGLEN, S. Discovery of a unique novel clade of mosquito-associated bunyaviruses. Journal of virology, 2013. 87(23):12850-12865.

MATSUMOTO, M; SEYA, T. TLR3: interferon induction by double-stranded RNA including poly (I: C). Advanced drug delivery reviews, 2008. 60(7):805-812.

MOHAMED, M.; MCLEES, A.; ELLIOTT, R.M. Viruses in the Anopheles A, Anopheles B, and Tete serogroups in the Orthobunyavirus genus (family

Bunyaviridae) do not encode an NSs protein. *Journal of virology*, 2009. 83(15):7612-7618.

MORELAND, N.C.; HEMMER, L.B.; KOHT, A. West Nile virus infection and postoperative neurological symptoms: a case report and review of the literature. *Journal of Clinical Anesthesia*, 2014. 26: 410-413.

MULLER, U.; STEINHOFF, U.; REIS, L.F.; HEMMI, S., PAVLOVIC. J.; ZINKERNAGEL, R.M.; AGUET, M. Functional role of type I and type II IFN in antiviral defense. *Science*, 1994;264:1918–1921.

NICHOL, S.T.; ARIKAWA, J.; KAWAOKA, Y. Emerging viral diseases. *Proc Natl Acad USA*, 2000. 97(23):12411-12412.

NUNES, M.R.; DA ROSA, A.P.T.; WEAVER, S.C.; TESH, R.B.; VASCONCELOS, P.F. Molecular epidemiology of group C viruses (*Bunyaviridae*, *Orthobunyavirus*) isolated in the Americas. *Journal of virology*, 2005. 79(16):10561-10570.

OSHIUMI, H.; MATSUMOTO, M.; FUNAMI, K.; AKAZAWA, T.; SEYA, T. TICAM-1, an adaptor molecule that participates in Toll-like receptor 3–mediated interferon- β induction. *Nature immunology*, 2003. 4(2):161-167.

PFAFFL, M.W; TICHOPAD, A; PRGOMET, C.; NEUVIANS T.P. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper–Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology letters*, 2004. 26(6):509-515.

REICH, N.C. Review: Nuclear/cytoplasmic localization of IRFs in response to viral infection or interferon stimulation. *Journal of interferon & cytokine research*, 2002, 22(1):103-109.

REN, J.; CHEN, X.; CHEN, Z. J. IKK β is an IRF5 kinase that instigates inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014. 111(49):17438-17443.

REGUERA, J.; WEBER, F.; CUSACK, S. Bunyaviridae RNA polymerases (L-protein) have an N-terminal, influenza-like endonuclease domain, essential for viral cap-dependent transcription. *PLoS Pathog.* 2010.16;6(9):1001101

ROUGERON, V.; SAM, I.C.; CARON, M.; NKOGHE, D.; LEROY, E.; ROQUES, P. Chikungunya, a paradigm of neglected tropical disease that emerged to be a new health global risk. *J Clin Virol*, 2014.1-9.

SALANUEVA, I.J.; NOVOA R.R.; CABEZAS P.; LÓPEZ-IGLESIAS C.; CARRASCOSA, J.L.; ELLIOTT R.M.; RISCO C. Polymorphism and structural maturation of bunyamwera virus in Golgi and post-Golgi compartments. *J Virol.* 2003.77(2):1368-1381.

SCHMALJOHN, C. S.; NICHOL, S.T. The Bunyaviridae. In *Fields Virology*, 5th ed. D.M. Knipe, P.M. Howley (eds.), Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2007.1741-1780.

SEYA, T.; OSHIUMI, H.; SASAI M.; AKAZAWA T.; MATSUMOTO M. TICAM-1 and TICAM-2: toll-like receptor adapters that participate in induction of type 1 IFN. *Int J Biochem Cell Biol.*, 2005. 37(3):524-529.

SHEETS, R; History and characterization of the Vero cell line. The Vaccines and Related Biological Products Advisory Committee Meeting. CBER/FDA, 2000.

SHI, X; KOHL, A; LÉONARD, VH; LI, P; MCLEES, A; ELLIOTT, RM. Requirement of the N-terminal region of orthobunyavirus nonstructural protein NSm for virus assembly and morphogenesis. *J Virol.*, 2006. 80(16):8089-8099.

SIM, S.; JUPATANAKUL, N.; DIMOPOULOS, G. Mosquito Immunity against Arboviruses. *Viruses*, 2014. 6:4479-4504.

SIMMONS, C.P.; FARRAR, J.J.; NGUYEN, V.V.; WILLS, B. Dengue. *N Engl J Med*, 2012. 366:1423-1432.

STEINHAUER, D.A.; HOLLAND, J.J. Rapid evolution of RNA viruses. *Ann. Rev. Microbiol.*, 1987. 41:409-33.

THELLIN O.; ZORZI W.; LAKAYE B.; DE BORMAN B.; COUMANS B.; HENNEN G.; GRISAR T.; IGOUT A.; HEINEN E. Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *Journal of biotechnology*, 1999. 75(2):291-295.

THOMPSON, A.J.V.; LOCARNINI, S.A. Toll-like receptors, RIG-I-like RNA helicases and the antiviral innate immune response. *Immunology and cell biology*, 2007. 85(6):435-445.

TROTTIER M.D.; LYLES D.S.; REISS C.S. Peripheral, but not central nervous system, type I interferon expression in mice in response to intranasal vesicular stomatitis virus infection. *J Neurovirol.*, 2007.13:433–445.

VAN KNIPPENBERG, I.; CARLTON-SMITH, C.; ELLIOTT, R.M. The N-terminus of Bunyamwera orthobunyavirus NSs protein is essential for interferon antagonism. *Journal of General Virology*, 2010. 91(8):2002-2006.

WALTER, C.T.; BARR, J.N. Recent advances in the molecular and cellular biology of bunyaviruses. *Journal of General Virology*, 2011. 92:2467-2484.

WEBER, F.; BRIDGEN, A.; FAZAKERLEY, J.K.; STREITENFELD, H.; KESSLER, N.; RANDALL, R.E.; ELLIOTT, R.M. Bunyamwera Bunyavirus Nonstructural Protein NSs Counteracts the Induction of Alpha/Beta Interferon. *Journal of Virology*, 2002. 76:7949-7955.

WEBER, F.; DUNN E.F.; BRIDGEN, A.; ELLIOTT, R.M. The Bunyamwera virus nonstructural protein NSs inhibits viral RNA synthesis in a mini-replicon system. *Virology*, 2001. 281:67-74.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Dengue and severe dengue. Fact sheet, 2014.117. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Scientific Group on Arboviruses, and Human Disease. Arboviruses and Human Diseases: Report of a WHO Scientific Group, 1967. 369.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Scientific Group. Arthropod-borne and rodent-borne viral diseases. World Health Organization Tech. Rep. Ser. 1985. 719.

ZHENG, W.; TAO Y.J. Genome encapsidation by orthobunyavirus nucleoproteins. PNAS, 2013.110(22):8769-8770.