

GUSTAVO OLSZANSKI ACRANI

Apoptose em infecção pelo vírus Oropouche.

Tese de Doutorado
Apresentada ao Departamento de Biologia Celular,
Molecular e Bioagentes Patogênicos.
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.
Universidade de São Paulo.

Grau pretendido: Doutor
Orientador: Prof. Dr. Eurico Arruda Neto

Ribeirão Preto

2009

Ficha Catalográfica

Acrani, Gustavo Olszanski
Apoptose em infecção pelo vírus Oropouche.
Ribeirão Preto, 2009.
149 p.: fig.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto/USP.

Área de concentração: Biologia Celular, Molecular e Bioagentes
Patogênicos.

Orientador: Prof. Dr. Eurico de Arruda Neto.

1. Oropouche. 2. Bunyavirus. 3. Viroses emergentes.
4. Apoptose. 5. Caspases. 6. Inibidor de caspases.

Esta tese foi redigida seguindo-se todas as normas da ABNT, de acordo com o documento “Diretrizes para apresentação de dissertações e teses da USP: documento eletrônico e impresso.” Vânia M. B. de Oliveira Funaro, coord. et al., São Paulo, SIBi-USP, 2004.

A versão atualizada das normas da ABNT foi também consultada para a confecção deste documento: ABNT NBR14724 “Informação e documentação – Trabalhos acadêmicos – Apresentação.” Segunda edição (30.12.2005) Válida a partir de 30.01.2006.

Apoio e Suporte Financeiro

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro das seguintes entidades e instituições:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP.

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP).

Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FAEPA-HC-FMRP-USP).

Agradecimentos

Agradeço ao Prof. Dr. Eurico de Arruda Neto por ter sido meu orientador durante este trabalho e pelo respeito, dedicação e atenção dedicados a mim nestes quatro anos. E além de tudo, agradeço por ter me ensinado a gostar tanto assim dos vírus. As discussões sobre vírus e evolução me ensinaram muito a respeito do papel dos vírus na árvore da vida. Sou muito grato.

Ao Prof. Dr. Marcelo Brocchi e Profa. Dra. Cláudia Maria Leite Maffei, que, assim como o Dr. Eurico, foram essenciais para a minha formação como microbiologista.

Agradeço aos seguintes amigos e amigas pesquisadores (as) que colaboraram diretamente com o trabalho, através do auxílio em muitos dos experimentos envolvidos. Sem a ajuda dessas pessoas este trabalho não teria sido possível: Alcir Humberto Rodrigues, Ariane Matioli, Humberto Freire Boncristiani Junior, José Luiz Proença Módena, Maria Lucia da Silva, Rodrigo Ivo Marques dos Santos, Rogério Gomes dos Santos, Walter Miguel Turato e à minha esposa Patricia de Oliveira Carminati

Agradeço ao amigo Adilson Pereira Terrivel, que colaborou com as ilustrações da tese.

Aos professores e alunos do Centro de Pesquisa em Virologia, pela constante troca de conhecimento e pelo convívio harmonioso e muito bem humorado.

Agradeço à funcionária Soraya Jabur Badra pelo apoio e pela maneira que ela cuida do Centro de Pesquisa de Virologia.

Um agradecimento especial à funcionária Maria Lucia da Silva (Pitty), tanto pelo seu apoio nos experimentos deste trabalho, principalmente no que se refere à cultura de células e titulação de vírus e na montagem de lâminas de tecidos congelados, quanto pelo carinho e cuidado que ela sempre demonstrou por nós e pelo nosso laboratório. Obrigado.

Agradeço a todos os docentes, funcionários e colegas do departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da FMRP, que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, e para a minha formação durante a pós-graduação.

Um agradecimento especial para os seguintes docentes do departamento, que colaboraram através de empréstimo de reagentes, informações a respeito de experimentos e protocolos, discussão dos resultados e pela permissão por utilizar seus equipamentos e laboratórios durante alguns experimentos realizados no trabalho: Profa. Dra. Ângela Kaysel Cruz, Profa. Dra. Claudia M. L. Maffei, Profa. Dra. Constance Oliver, Profa. Dra. Enilza Maria Espreafico, Prof. Dr. Luiz Ricardo Orsini Tosi, Profa. Dra. Maria Célia Jamur, Profa. Dra. Maria Cristina Roque Barreira, Prof. Dr. Paulo Sérgio Rodrigues Coelho, Prof. Dr. Roy Edward Larson. E aos docentes do departamento de Imunologia e Bioquímica Profa. Dra. Arlete Aparecida Martins Coelho-Castelo, Prof. Dr. Marcelo Damário Gomes.

Agradeço aos docentes Profa. Dra. Enilza Maria Espreafico, Profa. Dra. Tiana Kohlsdorf e Dr. Emerson Soares Bernardes pela colaboração no exame de qualificação de doutorado.

Agradeço aos membros da banca da tese de doutorado que ajudaram bastante na elaboração da versão final desta tese através de sugestões feitas durante a análise da proforma: Dra. Josane de Freitas Souza, Prof. Dr. Luiz Tadeu M. Figueiredo, Prof. Dr. Ricardo Luiz Moro de Sousa e Prof. Dr. Vitor Hugo Aquino.

Às secretárias do departamento Ângela Maria de Souza Vitor, Lucia Helena Picinato Raphael e da pós-graduação Rosângela C. Peral Mesquita e Ana Cristine S. Ferreira por toda a atenção e cuidado.

À funcionária Maria Inês Ambrósio Castania pela ajuda na lavagem e preparação dos materiais esterilizados.

Ao amigo Lenaldo Branco Rocha, funcionário da FMRP do laboratório de microscopia confocal, por toda a ajuda com a aquisição de imagens.

Aos amigos do laboratório: Alberto, Alcir, Ana Elise, Andrei, André, Ariane, Flávia, Henrique, Humberto, Izolete, José Luiz, Luana, Marcus Vinícius, Maria Lucia (Pitty), Marisa, Miriã, Reginaldo, Rodrigo, Rogério e Talita pela amizade e carinho que sempre demonstraram por mim, assim como pela ajuda na realização de muitos experimentos e na discussão dos dados obtidos, e, principalmente pelos momentos de descontração que tornaram esses quatro anos de doutorado um período de aprendizado e crescimento que será lembrado pelo resto da vida. Obrigado.

À minha esposa Patricia, meus pais, Mário e Regina, e minhas irmãs, Elise e Isabela, pelo carinho e amor que sempre souberam demonstrar.

A todos os amigos e familiares pelo carinho, amizade e paciência.

Muito obrigado.

Sumário

Resumo.....	08
Abstract.....	10
1.Introdução.....	12
1.1.A emergência de importantes agentes infecciosos: O Vírus Oropouche.....	13
1.2.Sintomas da infecção e patogênese do vírus Oropouche.....	17
1.3.Diagnóstico.....	18
1.4.Tratamento.....	20
1.5.Estrutura do vírus e seu genoma.....	21
1.6.Ciclo replicativo.....	23
1.7.A relação entre os vírus e as células hospedeiras: indução de apoptose como resposta à infecção viral	26
2.Objetivos.....	37
3.Material e Métodos.....	39
3.1.Cultivo e infecção de células.....	40
3.2.Drogas utilizadas.....	41
3.3.Imunofluorescência indireta para o vírus Oropouche.....	41
3.4.Análise da morfologia de células Hela infectadas por OROV por Fluorescência: características morfológicas de células em apoptose.	42
3.5.Análise da fragmentação de DNA por eletroforese em gel de agarose.....	43
3.6.Ensaio de TUNEL in situ em células Hela.....	44
3.7.Análise da fragmentação de DNA pelo estudo da população sub-G1 por citometria de fluxo.	44
3.8.Análise da exposição de resíduos de fosfatidilserina por Anexina V conjugada com Rodamina.	46
3.9.Ensaio simultâneo de TUNEL e imunofluorescência indireta para OROV em tecidos de animais infectados.	46
3.10.Ensaio de atividade da caspase 3 por citometria de fluxo.....	47
3.11.Ensaio de avaliação de alteração no potencial de membrana mitocondrial.....	48
3.12.Obtenção de extratos protéicos de culturas celulares.....	48
3.12.1.Extrato bruto total de proteínas.	48
3.12.2.Fracionamento celular: Obtenção de proteínas das frações citoplasmática (C) e de membranas pesadas enriquecida de mitocôndria (HM).	49
3.13.Dosagem de proteínas.....	49
3.14."Western blots".....	49
3.15.Inativação de estoque de OROV por radiação ultravioleta.....	51
3.16.Ensaio de efeito de tempo de adição de cicloheximida sobre a replicação de OROV.....	51

3.17. Inibição de apoptose induzida por caspases: aplicação do inibidor de caspases Z-VAD-FMK.	52
3.18. Clonagem e expressão da proteína não estrutural do segmento menor de Oropouche (OROV NSs)	53
3.18.1. Extração de ácidos nucléicos de tecidos infectados por OROV	54
3.18.2. Reações de transcrição reversa e PCR	54
3.18.3. Eletroforese e eluição do produto de PCR de NSs	55
3.18.4. Clonagem em vetor de entrada	55
3.18.5. Preparação de bactérias <i>E. coli</i> DH10- β eletrocompetentes	56
3.18.6. Transfecção de bactérias DH10- β competentes por eletroporação	56
3.18.7. Extração Plasmidial, PCR e sequenciamento dos clones de entrada pDONR201-NSs	57
3.18.8. Transferência do fragmento de interesse (NSs) do vetor de entrada pDONR201 para o vetor de expressão	58
3.18.9. Transfecção de células HeLa com vetor de expressão	59
3.18.10. Imunofluorescência indireta para detecção de proteína recombinante NSs-V5	60
4. Resultados e Discussão	62
5. Conclusões	112
6. Referências Bibliográficas	115
Manuscrito do trabalho a ser enviado para publicação	127

RESUMO

Resumo

Oropouche (OROV) é um vírus de RNA de fita simples pertencente à família *Bunyaviridae*, gênero *Orthobunyavirus* e sorogrupo Simbu, que causa a segunda mais freqüente arbovirose febril aguda no Brasil. Estima-se que mais de meio milhão de casos de febre do OROV ocorreram no país nos últimos 30 anos. A febre do Oropouche é relatada principalmente na região Amazônica, porém, com o aquecimento global, o desmatamento, e a redistribuição de insetos vetores, o risco da disseminação do vírus para outras áreas do Brasil e da América do Sul aumenta. Tem sido demonstrado que grande variedade de vírus induzem apoptose quando infectam células em cultura e modelos animais. Este estudo foi feito para determinar se a apoptose desempenha um papel importante no efeito citopático causado pelo vírus Oropouche *in vitro* em células HeLa. A infecção dessa cultura de células resultou em fragmentação do DNA, detectada pelos ensaios de TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated nicked-end labeling), eletroforese em gel de agarose e análise do conteúdo nuclear por citometria de fluxo (população Sub-G1). Os resultados mostraram que células HeLa infectadas por OROV apresentaram um alto grau de fragmentação do DNA após 36 horas de infecção. Ativação de caspase 9, caspase 3 e liberação de citocromo c da membrana da mitocôndria também foram detectados durante a infecção pelo vírus, conforme revelado em ensaios de “western blot” e citometria de fluxo. A inoculação de vírus inativados por radiação ultravioleta não induziu apoptose neste modelo, revelando que a ligação do vírus com as células não é suficiente para desencadear esta resposta. O tratamento das células com Cloroquina e Cicloheximida também revelaram que a saída do vírus do endossomo e a replicação do mesmo são necessárias para a indução de apoptose. Além disso, foi mostrado que inibidores de caspases impediram a apoptose induzida pelo OROV sem afetar a replicação do vírus. A clonagem e expressão da proteína não estrutural NSs de OROV em células HeLa revelou um potencial papel desta proteína no mecanismo de indução de apoptose pelo vírus. Nossos resultados mostram então que apoptose é uma importante consequência da infecção pelo vírus Oropouche *in vitro*, a qual ocorre através de uma via intracelular que envolve a mitocôndria, e que é provavelmente acionada durante o processo de replicação e síntese das proteínas virais. A análise da indução de apoptose foi também realizada em modelo animal, onde foi observada marcação de TUNEL em tecidos de cérebros de hamsters infectados por OROV, sugerindo que o processo de apoptose também possa ser importante para infecção *in vivo*.

ABSTRACT

Abstract

Oropouche (OROV) is a single-stranded RNA virus of the family *Bunyaviridae*, genus *Orthobunyavirus*, which causes the second most frequent acute arboviral febrile illness in Brazil, where over half a million cases have been recorded in the past 30 years. OROV fever has been registered almost exclusively in the Amazon region, but global warming, deforestation and redistribution of vectors and reservoir animals, increase the risk of Oropouche virus dissemination to other areas of Brazil and South America. Virus isolation was also described in patients in Peru, Venezuela, Panama and Trinidad. OROV causes a highly cytolytical infection in cultured cells with characteristic cytopathic effect appearing 48 hours post infection. OROV experimental infection in hamsters induces serious involvement of the central nervous system, with virtually no inflammation and necrosis. We assessed whether apoptosis plays a role in OROV induced death of HeLa cells. Infection of HeLa cells by OROV resulted in DNA fragmentation, detected by terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated nicked-end labeling (TUNEL) assay, gel electrophoresis and by analysis of the Sub-G1 population on cell cycle analysis by flow cytometry at 36 hours post infection. Activation of caspase 9, caspase 3 and release of cytochrome C from the mitochondrial membrane were also detected during viral infection, as shown by western blot analysis. UV inactivated OROV did not induce apoptosis in this model, revealing that virus-cell binding was not sufficient to induce it. The treatment of cells with chloroquine and cycloheximide indicated that viral uncoating and replication are needed for apoptosis induction. Furthermore, treatment of the cells with pan-caspase inhibitor prevented OROV-induced apoptosis without affecting virus replication. The induction of apoptosis was also analysed *in vivo* on the brain tissue of infected hamsters by TUNEL assay, suggesting that this phenomenon is also reported on animal models. The cloning and expression of the non-structural protein NSs from OROV revealed that this factor may be a potential apoptosis inducer. Our results show that apoptosis is an important consequence of OROV virus infection *in vitro*, which occurred by an intracellular pathway involving the mitochondria, triggered during the process of viral protein synthesis and replication.

1.INTRODUÇÃO

1.Introdução

1.1.A emergência de importantes agentes infecciosos: O Vírus Oropouche

“Some people think I am being hysterical, but there are catastrophes ahead. We live in evolutionary competition with microbes – bacteria and viruses. There is no guarantee that we will be the survivors.”

Joshua Lederberg, (1925 - 2008).

O isolamento do vírus HIV e a conseqüente devastadora epidemia de AIDS que assombrou o início dos anos 80 provocaram um aumento na preocupação da comunidade científica em estudar os mecanismos que envolvem o aparecimento de novos vírus que infectam os seres humanos. Tal fato expôs a potencial vulnerabilidade de nossa espécie frente à inevitável emergência de novos agentes infecciosos.

Neste contexto, uma pergunta se torna fundamental aos pesquisadores que trabalham nessa área: O que causa o surgimento de novos vírus?

Por muitos anos os cientistas que procuravam entender este fenômeno e distinguir um padrão que governasse o surgimento de novos vírus, cientificamente referidos como emergentes, reconheciam um importante fator biológico que seria o principal responsável por esses eventos: mutações genéticas em linhagens de vírus já existentes. Tais mutações poderiam ser importantes para que o vírus cruzasse a barreira entre espécies e se estabelecesse como um agente infeccioso relevante (CULLITON, 1990).

Essa característica natural de acúmulo de mutações, que é conseqüência do ciclo replicativo natural dos vírus, permite que, durante a infecção de múltiplos organismos, os vírus sejam selecionados pelos hospedeiros, permitindo a seleção de linhagens melhor adaptadas (FIGUEIREDO, 2007).

No entanto, a partir da década de 90 começou a ficar claro que além das alterações genéticas presentes no genótipo de tais agentes, as mudanças ambientais causadas pelo homem eram também causa importante da emergência de novos patógenos. As pesquisas na área de epidemiologia indicam que mudanças no comportamento dos seres humanos, envolvendo suas práticas com a agricultura, extrativismo e pecuária, com conseqüente devastação do meio ambiente, permitem que agentes microbianos, antes restritos a animais selvagens, tenham contato com seres humanos e possam rapidamente se espalhar para um grande número de pessoas. A principal modificação ambiental observada em associação com isso tem sido a invasão de regiões selvagens, com desmatamento e destruição de habitats

naturais, permitindo o contato de humanos com a fauna local anteriormente intocada e seus microrganismos. O desmatamento, o uso do subsolo, a construção de represas e rodovias, a colonização humana e a urbanização foram as principais modificações ambientais introduzidas pelo homem e associadas à emergência de agentes infecciosos, detectados em um importante trabalho realizado na região amazônica publicado em 2001 (VASCONCELOS et al., 2001).

Entre os patógenos emergentes mais importantes, destacam-se os vírus transmitidos por artrópodes, denominados arbovírus. Estes vírus têm seu material genético composto de RNA e são mantidos na natureza através de ciclos complexos que envolvem os vetores artrópodes que se alimentam do sangue de animais selvagens.

O Instituto Evandro Chagas (IEC), com sede em Belém, no Pará, se destaca como um importante centro de pesquisa epidemiológica e conta com uma equipe de pesquisadores que por mais de 40 anos vem trabalhando na detecção de novos e importantes vírus transmitidos por insetos vetores. Desde 1954 já foram identificados naquela região mais de 187 diferentes arbovírus, dos quais, 32 são considerados patogênicos para o homem (VASCONCELOS et al., 2001). Dentre esses agentes, quatro arbovírus se destacam: os vírus da dengue, da febre amarela, Mayaro e Oropouche, todos relacionados a doenças febris agudas e febres hemorrágicas, assim como meningites assépticas e encefalites.

Um artigo publicado recentemente por Figueiredo destaca os 10 principais arbovírus que podem vir a se tornar problemas de saúde pública em nosso país (FIGUEIREDO, 2007). Todos esses vírus já foram encontrados em território nacional e já foram relatados em associação com doenças febris, encefalite e meningite: os vírus Mayaro, encefalite eqüina venezuelana, encefalite eqüina do leste, Chikungunya, febre amarela, dengue, Rocio, encefalite de Saint Louis, Oeste do Nilo e Oropouche.

Uma importante indicação de que os seres humanos desequilibram o balanço existente entre os patógenos e seus hospedeiros selvagens ocorreu em 1950 na Amazônia Brasileira (GIBBONS, 1993). A construção da rodovia Belém-Brasília (BR-010) provocou um devastador desmatamento da floresta amazônica no estado do Pará. Logo depois de iniciada a obra da rodovia, pesquisadores da Rockefeller Foundation trabalhando em Belém isolaram vírus do sangue de trabalhadores envolvidos na construção e animais selvagens próximos às áreas das obras. Muitos desses vírus eram desconhecidos e outros eram antes encontrados apenas em animais. Um dos vírus encontrados chamou bastante a atenção dos pesquisadores na época. Em amostras de sangue de uma preguiça (*Bradypus trydactylus*) encontrada morta nos arredores da construção da rodovia foi isolado um vírus até então não detectado na região:

o vírus Oropouche. Até a década de 1960 não existia relato do envolvimento desse vírus com epidemias na região amazônica. No entanto, em 1961 o vírus se espalhou pela cidade de Belém, causando mais de 11.000 casos da doença, com febres altas, dores de cabeça severas e dores musculares, entre outros sintomas não menos importantes.

O primeiro caso de infecção humana pelo vírus Oropouche havia sido descrito em 1955 em uma cidade chamada Vega do Oropouche, em Trinidad e Tobago (ANDERSON et al., 1961). O vírus fora isolado de um trabalhador que vivia numa área florestal perturbada pelo extrativismo de carvão vegetal, que apresentara uma doença febril. Naquele mesmo estudo foi também relatada a presença de anticorpos neutralizantes para este vírus tanto em trabalhadores de áreas florestais, quanto em 8 de 26 macacos do gênero *Cebus* (macaco prego) e também em 9 de 26 macacos roncadores (gênero *Alouatta*), que são amplamente distribuídos na ilha.

Desde então a detecção do vírus tem sido restrita à população amazônica, principalmente no Brasil e, em menor quantidade, no Peru, Venezuela e Panamá (TESH, 1994; BAISLEY et al., 1998). Durante a primeira grande epidemia registrada em Belém em 1961, estima-se que mais de 11000 pessoas tenham sido infectadas pelo vírus, sem nenhum relato de morte. De 1961 a 1996, mais de 30 epidemias da febre do Oropouche foram registradas no Brasil, com evidências sorológicas de que mais de 357.000 pessoas foram infectadas pelo vírus (PINHEIRO;HOCH et al., 1981; BORBOREMA et al., 1982; PINHEIRO, 1997). Entretanto, esta é provavelmente uma subestimativa, pois é possível que mais de meio milhão de pessoas na região Amazônica brasileira tenham sido infectadas com o vírus desde o início da década de 1960 (PINHEIRO, 1997), fazendo com que o vírus Oropouche seja considerado como o segundo mais frequente arbovírus do Brasil, vindo somente após o vírus da Dengue (FIGUEIREDO, 2007).

De 1961 a 1980, ocorrências registradas do vírus Oropouche restringiram-se à região Norte, particularmente o Estado do Pará, com epidemias importantes na cidade de Belém. No entanto, de 1980 a 2004, o vírus Oropouche se espalhou para outras regiões, atingindo mais seis Estados brasileiros: Amazonas, Amapá, Acre, Rondônia, Tocantins e Maranhão, alertando para o seu potencial epidêmico (AZEVEDO et al., 2007). Um estudo conduzido em fevereiro do ano 2000 (NUNES et al., 2005) mostrou pela primeira vez o isolamento do vírus em um macaco do gênero *Callithrix* spp. no Parque Nacional Grande Sertão Veredas, na região de Ainos, Minas Gerais, mostrando que o vírus circulou na região Sudeste do país. Este estudo mostrou pela primeira vez o isolamento do vírus fora da Amazônia Legal, indicando

que sob condições ecológicas adequadas, ele pode atingir as grandes aglomerações humanas do Sudeste.

Figueiredo e colaboradores, em 1986, demonstraram evidência sorológica da exposição humana ao vírus Oropouche na região Sudeste do país, com a detecção de anticorpos para o vírus em um pedreiro e uma doméstica residentes na cidade de Ribeirão Preto (FIGUEIREDO; TRAVASSOS DA ROSA; FIORILO, 1986) .

De 1980 até 2005 pequenos surtos esporádicos de infecção pelo vírus Oropouche foram relatados na região amazônica brasileira (AZEVEDO et al., 2007), o que mostra que o vírus continua circulando na população. No entanto, dois surtos importantes foram relatados recentemente. Um aconteceu em duas comunidades do município de Parauapebas (PA), em abril e maio de 2003, e o outro atingiu outra comunidade próxima a Porto de Moz, (PA), em julho e agosto de 2004 (AZEVEDO et al., 2007).

Em 1981, em um estudo detalhado publicado pelo grupo do Instituto Evandro Chagas (PINHEIRO;TRAVASSOS DA ROSA et al., 1981) realizou-se um levantamento sorológico em animais da fauna do Estado do Pará, na tentativa de encontrar hospedeiros selvagens e domésticos do vírus Oropouche, assim como prováveis vetores. Nesse trabalho, foram realizados ensaios de neutralização *in vitro*, inibição de hemaglutinação e isolamento do vírus no soro de 3.695 vertebrados, incluindo roedores, marsupiais, patos, pombos, primatas, morcegos, gatos, cachorros, bichos-preguiça, répteis, e em mais de 576 espécies de invertebrados. Neste estudo ficou evidente que o vírus Oropouche é mantido na natureza por meio de dois ciclos distintos: os ciclos urbano e silvestre, sendo o homem aparentemente o único hospedeiro natural do vírus no ciclo urbano. Além disso, foi mostrado que o vírus era mantido na natureza em bichos-preguiça, alguns macacos e provavelmente em pássaros. O vetor responsável por manter o ciclo silvático ainda é motivo de discussão, mas evidências apontam para *Aedes serratus* e *Coquillettidia venezuelensis*, ambos pertencentes à família *Culicidae*.

No ciclo urbano (epidêmico) o vírus é transmitido através da picada do inseto *Culicoides paraensis*, pertencente à família *Ceratopogonidae*, conhecido popularmente no Norte do país pelo nome de Maruí, e em menor escala pelo *Culex quinquefasciatus* (família *Culicidae*). Insetos do gênero *Culicoides* spp. são amplamente distribuídos em áreas tropicais e subtropicais das Américas (LINLEY;HOCH;PINHEIRO, 1983), têm hábitos diurnos, atuando especialmente no final da tarde e apresentam uma grande afeição por sangue humano, procriando-se especialmente em matéria orgânica em decomposição, como troncos de bananeira cortadas e cascas de cacau (HOCH;ROBERTS;PINHEIRO, 1986).

Deste modo, o vírus Oropouche pode ser considerado um agente predominantemente enzoótico entre os animais silvestres, que é capaz de invadir áreas urbanas onde pode causar epidemias de largas proporções (PINHEIRO; TRAVASSOS DA ROSA et al., 1981).

1.2. Sintomas da infecção e patogênese do vírus Oropouche

A infecção pelo vírus Oropouche no homem causa a febre do Oropouche, uma doença febril aguda com temperaturas de até 40°C em alguns pacientes. Geralmente a febre é acompanhada de tontura, dores no corpo, calafrios e dores de cabeça, principalmente na região occipital ou frontal, difíceis de serem tratadas com analgésicos comuns. A infecção ainda é caracterizada por mialgia geralmente na nuca, musculatura paravertebral e na região sacral, além de artralgia generalizada e prostração. Muitas vezes o quadro pode se tornar bastante incapacitante, limitando as atividades do paciente por até uma a duas semanas e levando-o por vezes a internação em hospital. No entanto, nenhuma fatalidade ou seqüela foi diretamente atribuída à doença. O período de incubação do vírus em seres humanos é estimado em 4 a 8 dias, sendo que os pacientes tornam-se virêmicos, portanto, possíveis fontes de disseminação do vírus, já nos dois primeiros dias da doença (SCHMALJOHN; HOOPER, 2006).

Um fator marcante associado à febre do Oropouche é a recorrência de um ou mais sintomas, como dor de cabeça e mialgia, acompanhadas de febre baixa, até dez dias depois da recuperação clínica. Esta recorrência ocorre em até 60% dos casos e até hoje não foi possível isolar o vírus a partir de amostras desses pacientes durante a recaída (PINHEIRO; TRAVASSOS DA ROSA et al., 1981; PINHEIRO, 1997).

Pouco se conhece a respeito da patogênese da febre do Oropouche. O vírus causa uma infecção sistêmica no homem, pois ocorre viremia (PINHEIRO; HOCH et al., 1981). Entretanto, não se conhecem fatalidades devidas à infecção e, portanto, não há dados de autópsia publicados. Assim, não se conhecem os órgãos onde o vírus replica em seres humanos. No entanto, alguns trabalhos utilizando modelos experimentais em animais contribuíram para elucidar alguns aspectos da patogênese deste vírus. O primeiro estudo a este respeito foi publicado em 1978 por Araújo e colaboradores, no Instituto Evandro Chagas (ARAÚJO et al., 1978), usando inoculação por via intracerebral em Hamsters de três semanas de idade. Seis horas após a inoculação do vírus foi possível detectar lesões no fígado com importante necrose dos hepatócitos e considerável hipertrofia das células de Kupffer, sugerindo uma via hematogênica de transporte do vírus do cérebro para o fígado. O trabalho

sugere que o vírus pode ser capturado por células de Kupffer e transferido para hepatócitos, onde replicam causando dano ao tecido. No entanto, este estudo não revelou nenhuma partícula viral no tecido hepático analisado por microscopia eletrônica, embora a microscopia tenha mostrado importantes alterações morfológicas celulares, tais como hiperplasia do retículo endoplasmático rugoso, marginação da cromatina e formação de viroplasma no citoplasma, um corpo de inclusão que reflete possível aglomerado de partículas virais em formação (ARAÚJO et al., 1978).

Em 2004, um trabalho realizado por nosso grupo de pesquisa estudou a infecção do vírus também em hamsters, porém utilizando inoculação por via subcutânea (RODRIGUES, 2004). Este estudo demonstrou que ocorre infecção sistêmica, com detecção de altos títulos de vírus no plasma, alcançando um pico de $10^{6.0}$ TCID₅₀/mL no terceiro dia após a infecção. Análises histológicas mostraram ainda lesões nos tecidos cerebrais e hepáticos, sendo possível detectar vírus nestes dois órgãos em altos títulos. O achado mais relevante desse estudo foi a presença de antígeno viral em neurônios por imunohistoquímica. Essa pode ser uma particularidade desse modelo, mas levanta possibilidades de investigar neuroinvasividade/neurovirulência desse agente.

Em seguida, em 2008, nosso grupo realizou um estudo da patogênese do vírus em camundongos BALB/c recém-nascidos, através da inoculação do vírus pela via subcutânea (SANTOS, 2008). Este trabalho mostrou que ocorrem sinais clínicos já no quinto dia após o inóculo, com morte de cerca de 90% dos animais. Após o sacrifício dos animais seus órgãos foram retirados e o título viral foi verificado, revelando uma alta concentração de vírus no cérebro, cujas análises histológicas mostraram inflamação das meninges, virtualmente sem encefalite, mas com gliose e reação astrocitária importantes, confirmando o neurotropismo desse vírus nesse modelo. A presença de OROV replicante no SNC foi comprovada por hibridação *in situ* dirigida contra RNA(+) virais, que são moléculas intermediárias replicativas presentes somente em células onde está ocorrendo replicação viral ativa.

1.3.Diagnóstico

O diagnóstico da febre por Oropouche com base nos sintomas clínicos é difícil devido à natureza inespecífica dos sintomas, fáceis de confundir com outras doenças febris agudas. Comumente, o diagnóstico etiológico tem sido feito através do isolamento do vírus a partir do sangue dos pacientes até o quinto ou sexto dia da doença, quando praticamente 100% dos pacientes apresentam viremia (PINHEIRO, 1997). O vírus pode ser isolado por inoculação em

cérebro de camundongos ou hamsters recém-nascidos ou em células em cultura, tais como HeLa, VERO e BHK.

Pode-se fazer o diagnóstico também por métodos sorológicos, através das provas de fixação do complemento, neutralização *in vitro*, inibição de hemaglutinação e ELISA de captura para anticorpos da classe IgM (PINHEIRO, 1997). No entanto, para a preparação dos testes acima mencionados, é necessária a manipulação do agente infeccioso, o que de acordo com as normas do CDC (Centers for Disease Control and Prevention – Atlanta, GA – EUA), só pode ser feito em laboratórios de bio-segurança de nível 3. Em 2001, um estudo feito em parceria entre o Instituto Evandro Chagas, o Centro de Medicina Tropical da Universidade do Texas em Galveston (EUA), e o Centro de Pesquisa Médica Naval de Lima (Peru) (SAEED et al., 2001) deu início ao uso de uma nova metodologia para detectar anticorpos para o vírus Oropouche em soro. Foi feita a clonagem e expressão da proteína do nucleocapsídeo do vírus em sistema procariótico e a proteína recombinante foi usada como antígeno em ensaio de ELISA. Tal ensaio simplificou o método, pois agora não mais depende da preparação de antígeno bruto de vírus, prescindindo assim dos riscos inerentes à manipulação e crescimento do vírus em larga escala. O estudo mostrou que o método era eficiente em detectar tanto IgG quanto IgM, com alta especificidade (99,5%) e sensibilidade (95%).

Em 2002, o grupo do Prof. Dr. Luiz Tadeu M. Figueiredo do Centro de Pesquisa em Virologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, publicou estudo que resultou em um método de nested RT-PCR para o diagnóstico rápido de vírus Oropouche (MORELI et al., 2002). Esse ensaio foi testado em soros de 30 pacientes que haviam manifestado doença em 1996, durante um surto em Oriximiná, na região Amazônica, e de cujas amostras o vírus havia sido isolado. O amplicon de 300 pares de bases apareceu em 3 dessas amostras testadas (10% dos casos). Apesar de específico, esse resultado não se mostrou suficientemente sensível para todos os 30 casos positivos analisados. Em 2003, um grupo de pesquisadores do Instituto de Microbiologia Médica e Higiene de Freiburg, Alemanha, em parceria com o Instituto Evandro Chagas publicou um trabalho demonstrando o diagnóstico de Oropouche por RT-PCR utilizando o método de PCR em Tempo Real com sonda apropriada (método de Taqman) (WEIDMANN et al., 2003). Esta técnica foi utilizada para testar amostras de soros dos pacientes de Oriximiná, mostrando resultado positivo em 93,3% dessas amostras. Com este ensaio foi possível determinar a carga viral, cujo valor máximo foi de $1,31 \times 10^7$ moléculas/mL e portanto ficou evidente tratar-se de um método mais sensível que a nested-RT-PCR convencional. Esse teste é uma ferramenta útil para a detecção do vírus e vigilância da

ocorrência de surtos em áreas epidêmicas, uma vez que é possível detectar o RNA viral em soro já no primeiro e segundo dias das manifestações clínicas.

Recentemente, em 2007, o grupo do Centro de Pesquisa Médica Naval de Lima (Peru) publicou um novo ensaio, que aumenta a eficiência do isolamento e detecção de diferentes arbovírus em soro de pacientes que eventualmente tenham uma menor carga viral, o que promete aumentar a sensibilidade dos métodos de detecção de vírus no sangue (CACEDA;KOCHEL., 2007). Este ensaio, denominado Modified Shell Vial Culture Procedure, foi testado com soros de pacientes com febre do Oropouche e se mostrou bastante eficiente, mostrando que em altas diluições destes soros já era possível se detectar o vírus, se comparado com o método padrão.

1.4.Tratamento

O tratamento para a febre do Oropouche ainda é baseado em repouso do paciente até o desaparecimento das manifestações clínicas agudas, principalmente para se evitar a recorrência dos sintomas, uma vez que estes são mais verificados em pacientes que reassumem suas atividades normais antes do tempo necessário (PINHEIRO, 1997). Sugere-se ainda o combate aos sintomas da febre usando aspirina ou outros antitérmicos, e o alívio da mialgia, dor de cabeça e artralgia com outros analgésicos comuns.

Em 2006 e 2007 o Centro de Pesquisa em Virologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, coordenado pelo Prof. Dr. Luiz Tadeu M. Figueiredo, publicou três relevantes artigos mostrando os efeitos, tanto *in vivo* quanto *in vitro* da ação de diferentes drogas antivirais frente à replicação de importantes vírus do gênero *Orthobunyavirus*, entre eles o vírus Oropouche (LIVONESI et al., 2006, 2007; LIVONESI;MORO DE SOUSA;MORAES FIGUEIREDO, 2007). Dentre as drogas testadas: Ribavirina, Ácido Micofenólico e Interferon Alfa, somente a última (na dose de 100.000 UI/mL) apresentou um efeito inibitório na replicação do vírus em células Vero, quando analisado por ensaio de placa, e também quando testados em camundongos suíços recém-nascidos. No entanto, devido ao fato da inibição da replicação do vírus se dar apenas quando a droga foi administrada 24 horas antes ou 2 horas após a inoculação do vírus na cultura, ou um dia antes de se inocular o vírus nos animais testados, foi sugerido que a mesma seja eficiente na prevenção e tratamento precoce da infecção pelo vírus Oropouche. Quando a droga foi administrada 3 horas após o inóculo do vírus em camundongos, esta não apresentou efeito inibitório.

1.5. Estrutura do vírus e seu genoma

O vírus Oropouche é membro do gênero *Orthobunyavirus*, sorogrupo Simbu e pertence à família *Bunyaviridae*. Esta família inclui ainda outros agentes patogênicos importantes, nos seus cinco gêneros: *Orthobunyavirus*, *Hantavirus*, *Nairovirus*, *Phlebovirus* e *Tospovirus*. Todos os vírus da família são transmitidos por artrópodes, com exceção dos *Hantavirus*, que são transmitidos por aerossóis formados a partir de secreções e excreções de roedores. Todos os vírus da família causam importantes zoonoses e muitos causam doenças em humanos, com exceção do gênero *Tospovirus*, que inclui apenas agentes causadores de infecções em vegetais (SCHMALJOHN;HOOPER, 2006).

Os vírus do gênero *Orthobunyavirus* são envelopados, esféricos, apresentando de 80 a 120 nm de diâmetro e exibem glicoproteínas de superfície em projeções de 5 a 10 nm, que estão inseridas numa bicamada lipídica de 5 a 7 nm de espessura, formando o envoltório do vírus. Estudos bioquímicos e de microscopia eletrônica do orthobunyavirus La Crosse (sorogrupo Califórnia) sugerem que existem de 270 a 1400 espículas de glicoproteínas por vírus (Figura 1). Estas espículas são constituídas de heterodímeros das glicoproteínas de superfície Gn e Gc (NICHOL, 2001).

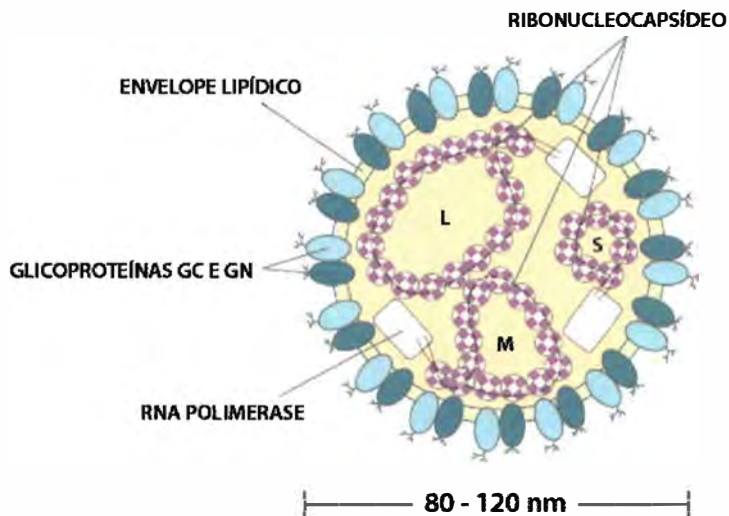


Figura 1: Representação esquemática da estrutura do vírus Oropouche. Modificado de (SCHMALJOHN;HOOPER, 2006) por Adilson P. Terrivel, 2009.

O vírus Oropouche, assim como todos os vírus da família *Bunyaviridae*, possui como genoma três fitas simples de RNA de polaridade negativa (NICHOL, 2001), envolvidas por capsídeos helicoidais formados por subunidades da proteína do nucleocapsídeo (N). Os

segmentos de RNA são nomeados de acordo com o seu tamanho, sendo L (large) a fita maior de RNA, segmento M (medium) a fita de tamanho médio e segmento S (short) a menor fita de RNA do vírus (SCHMALJOHN;HOOPER, 2006). Em associação com os nucleocapsídeos, há uma RNA-polimerase RNA-dependente, codificada pelo segmento maior de RNA (L) que é essencial para a replicação do genoma viral na célula hospedeira.

Os três segmentos de RNA que constituem o material genético do vírus Oropouche foram seqüenciados e essas seqüências foram publicadas por três grupos distintos. O primeiro artigo publicado, em 2000, teve participação do grupo do Instituto Evandro Chagas em Belém (Pará) e do Centro de Doenças Tropicais da Faculdade de Medicina do Texas, em Galveston (SAEED et al., 2000). Naquele artigo foi relatada a seqüência do menor segmento de RNA (segmento S), com 754 nucleotídeos e dois quadros de leitura sobrepostos, um codificando o gene da proteína do nucleocapsídeo N (693bp, 231 aminoácidos) e um codificando proteína não estrutural, denominada NSs (273bp, 91 aminoácidos). Com base em seqüências do gene da proteína N de 27 isolados de vírus obtidos ao longo de 42 anos de estudos e abrangendo uma área significativa da América do Sul, foi possível demonstrar que o vírus pertence a um grupo monofilético abrangendo três genótipos distintos. O genótipo I inclui a cepa protótipo inicialmente isolada em Trinidad em 1954, bem como a maioria dos isolados do Brasil. Ao genótipo II pertencem seis isolados do Peru obtidos entre 1992 e 1998 e mais duas amostras isoladas no nordeste brasileiro em 1991. E no genótipo III foram incluídos quatro isolados do Panamá obtidos no ano de 1989.

Em 2001, novamente o grupo de Galveston (Texas) publicou a seqüência do segmento médio (M) de RNA do vírus, de 4396 nucleotídeos, que codifica os genes das glicoproteínas do envelope do vírus (Gn, com 870 nucleotídeos/290 aminoácidos e Gc, com 2817 nucleotídeos/939 aminoácidos) e uma proteína não estrutural denominada NSm (de 525 nucleotídeos/175 aminoácidos) (WANG et al., 2001). Ficou evidente que a similaridade desta seqüência com a de outras obtidas para outros vírus dos sorogrupos Bunyanwera e Califórnia, pertencentes ao mesmo gênero *Orthobunyavirus*, é bastante limitada, de cerca de 52% para as seqüências de nucleotídeos e de 32% para as de aminoácidos, mostrando que esses dois sorogrupos são filogeneticamente mais próximos entre si do que com o sorogrupo Simbu, ao qual pertence o vírus Oropouche.

Em 2003, Aquino e colaboradores realizaram o sequenciamento do maior segmento de RNA do genoma do vírus Oropouche (segmento L), que tem 6846 nucleotídeos e codifica uma RNA-polimerase RNA-dependente de 2250 aminoácidos. A comparação das seqüências deste gene entre 15 vírus da família *Bunyaviridae* revelou que a proteína L do vírus

Oropouche possui os três domínios funcionais conservados e característicos desta proteína, e um quarto domínio exclusivo, com dois importantes sítios ativos (AQUINO;MORELI;MORAES FIGUEIREDO, 2003).

Em 2004 Figueiredo e colaboradores realizaram o sequenciamento do segmento M do genoma da cepa de vírus Oropouche primeiramente isolada no Brasil em 1960, a cepa BeAn 19991, usando um novo método bastante eficaz em amplificar seqüências de DNA desconhecidas (AQUINO;FIGUEIREDO, 2004). Esse método, baseado no ensaio de Genome Walking, foi denominado LASP-PCR e revelou um segmento de 4385 nucleotídeos, um tanto menor do que o obtido no estudo anterior - 4396 (WANG et al., 2001). Tal diferença entre a cepa BeAn19991 e as cepas Tr9760 e 01-812-98, está na região não codificante, pois a ORF apresenta o mesmo tamanho e seqüência (4260pb). Além disso, parece ter havido um erro na seqüência publicada pelo grupo de Wang et al., no que se refere aos terminais 3' e 5' do genoma. Aparentemente houve um erro ao colocar a seqüência no Genebank, gerando um resultado um pouco maior. Portanto, o genoma do vírus teria o tamanho obtido pelo grupo de Ribeirão Preto: 4385 nucleotídeos (AQUINO;FIGUEIREDO, 2004).

1.6.Ciclo replicativo

Ainda não se conhecem muitos detalhes a respeito do ciclo replicativo do vírus Oropouche. Um trabalho realizado por nosso grupo de pesquisa mostrou que a partir de 10 horas após a inoculação do vírus em células HeLa ocorre liberação de progênie, com pico em torno de 24 horas (Figura 2) (SILVA, 2008). Tal resultado é importante para se determinar eficiência replicativa *in vitro* e essencial para estudar-se outros processos relacionados com a biologia do vírus Oropouche.

Ainda não foram identificados receptores celulares para a maioria dos vírus da família, entretanto, as integrinas β_3 , que são proteínas de superfície encontradas em células endoteliais, foram identificadas como facilitadoras da entrada de alguns hantavírus em células em cultura (GAVRILOVSKAYA et al., 1999). A interação com o receptor celular é provavelmente mediada pelas glicoproteínas de superfície Gn e Gc, as quais estão intimamente envolvidas com o ciclo replicativo do vírus nas células hospedeiras. Em vírus La Crosse, sugeriu-se que a proteína Gc se liga ao receptor das células de mamíferos e Gn se ligaria às células do inseto vetor (LUDWIG et al., 1991). Ainda não foi determinado se ambas as proteínas do envelope são necessárias para a entrada do vírus nas células eucarióticas. Por outro lado, sabe-se que para o gênero *Orthobunyavirus*, a proteína Gc provavelmente está

também relacionada com o processo de fusão de membranas que possibilitaria a saída do vírus do endossomo e conseqüente liberação do mesmo no citoplasma da célula hospedeira (SCHMALJOHN;HOOPER, 2006).

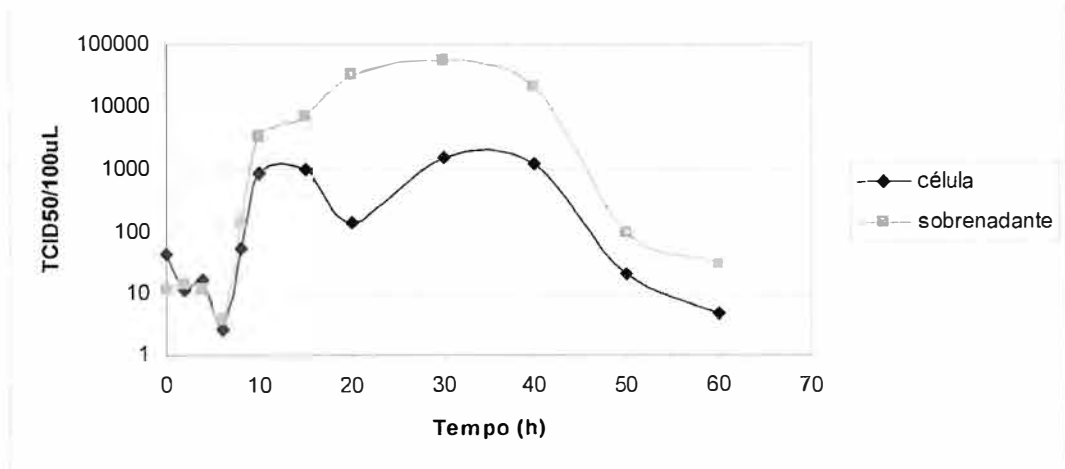


Figura 2: Curva de Replicação de um passo de vírus Oropouche em células HeLa. Retirado sob permissão de (SILVA, 2008).

Em 2008 foi publicado um trabalho pelo nosso grupo mostrando que o vírus Oropouche tem acesso ao citoplasma de células HeLa através de endocitose mediada por vesículas dependentes de clatrina, e que a saída do mesmo do endossomo requer acidificação (SANTOS et al., 2008).

Uma vez no citoplasma, o RNA viral sofre transcrição primária, a qual é realizada pela RNA-polimerase RNA-dependente que vem com o vírus, permitindo a produção de fitas de RNA positivas (mRNA), que serão usadas na tradução de proteínas virais e servirão de molde (cRNA) para transcrição do RNA viral (vRNA) (SCHMALJOHN;HOOPER, 2006). Este processo de transcrição ocorre somente quando os ribonucleocapsídeos (RNA do vírus envolvido pela proteína N), mas não RNA livre, são utilizados como molde (SCHMALJOHN;HOOPER, 2006). Em 2006 foi demonstrado que a proteína N atua como uma chaperona, participando no início do processo de transcrição e na facilitação da dissociação da estrutura enovelada da molécula de RNA viral, mantendo-se ligada à extremidade 5' da fita, permitindo que a extremidade 3' fique livre para interagir com a RNA-polimerase (MIR;PANGANIBAN, 2006).

Os vírus da família *Bunyaviridae* utilizam os caps 5' dos mRNAs celulares presentes no citoplasma como iniciadores para a síntese dos mRNAs virais, através de um processo conhecido como "cap snatching". Durante esse processo ocorre a clivagem desses caps 5' através da atividade endonuclease da enzima RNA-polimerase RNA dependente do vírus. Em

seguida, o cap de RNA parecia com os primeiros nucleotídeos da região 3'-OH da fita de RNA genoma do vírus e é utilizado como iniciador para a síntese da molécula de mRNA viral, processo este também realizado pela RNA polimerase RNA dependente (PATTERSON;HOLLOWAY;KOLAKOFSKY, 1984). Como resultado deste processo, é possível distinguir uma região de cerca de 10 a 20 nucleotídeos nas regiões 5' dos mRNAs virais que não estão presentes nos RNA genômicos dos mesmos, que é importante para o processo de tradução das proteínas virais pela maquinaria celular (SCHMALJOHN;HOOPER, 2006). A tradução dos mRNAs dos segmentos S e L de OROV produzem as proteínas do nucleocapsídeo, polimerase, e a proteína não estrutural NSs. A tradução do mRNA do segmento médio do genoma viral resulta na produção de uma poliproteína que é posteriormente clivada por proteases celulares, dando origem às proteínas de envelope Gn e Gc e a não estrutural Nsm.

Um esquema geral do ciclo replicativo da família *Bunyaviridae*, com base nos vírus mais estudados dessa família, tais como os vírus La Crosse, Punta Toro, Hantaan, Ukuniemi e Bunywvvera é mostrado na figura 3 a seguir.

O saída dos vírus da família *Bunyaviridae* se dá através da membrana do complexo de Golgi, com exceção de alguns membros, como os hantavirus Sin Nombre e Black Creek Canal, que brotam da membrana plasmática (SCHMALJOHN;HOOPER, 2006). Todas as proteínas do envelope, Gc e Gn analisadas, possuem oligossacarídeos, tanto os complexos quanto os ricos em manose (simples), ligados a asparaginas (SCHMALJOHN;HOOPER, 2006). Além disso, através do sequenciamento do segmento M de todos os vírus desta família analisados até o presente, incluindo o vírus Oropouche, foi possível observar que possuem mais de um sítio possível de glicosilação. Como os oligossacarídeos complexos são formados através da adição de resíduos à estrutura inicial rica em manose durante a passagem da proteína pelo complexo de Golgi, acredita-se que as proteínas Gn e Gc são processadas após a tradução e sofrem glicosilação no Golgi.

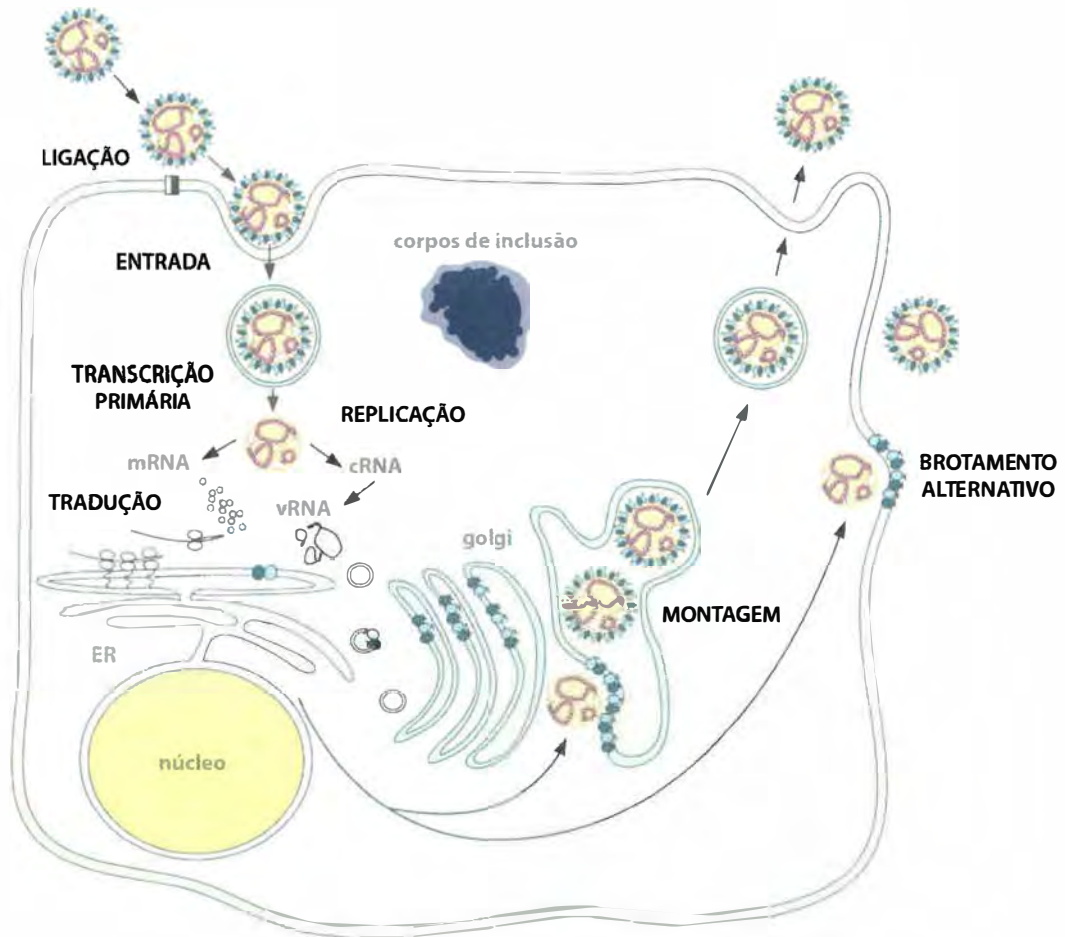


Figura 3: Esquema representando o ciclo de replicação de vírus da família *Bunyaviridae*. Os passos do ciclo consistem em: ligação das partículas virais nos receptores da superfície da célula; entrada por endocitose mediada por receptores em vesículas envoltas por clatrina. Ainda no endossomo o envelope do vírus se funde à membrana do endossomo liberando o ribonucleocapsídeo e a RNA polimerase RNA-dependente para o citoplasma. Em seguida ocorre a transcrição primária, tradução das proteínas virais e replicação do RNA viral (vRNA) de fita negativa via intermediários (cRNA) de fita positiva. Em seguida ocorre a montagem dos vírions na membrana do Golgi e brotamento. Modificado de (SCHMALJOHN;HOOPER, 2006) por Adilson P. Terrivel, 2009.

1.7.A relação entre os vírus e as células hospedeiras: indução de apoptose como resposta à infecção viral

Os vírus são exclusivamente dependentes da maquinaria celular para sobreviver e replicar, o que ocorre através de uma relação bastante intrincada e muitas vezes harmoniosa. Entender os detalhes desta relação é o papel da virologia moderna, uma vez que compreender os mecanismos pelos quais os vírus causam a doença em seu hospedeiro é o primeiro passo em busca da cura ou tratamento. Para tanto, é necessário estudar o que acontece com uma célula quando ela é invadida por um vírus.

Quando o hospedeiro vertebrado é infectado por um vírus seu sistema imunológico monta um número variado de respostas. Muitas destas respostas envolvem a produção de anticorpos específicos contra antígenos expressos pelo patógeno via sistema imune adaptativo, com envolvimento de células T CD4, CD8 e linfócitos B (SCHMALJOHN;HOOPER, 2006).

No entanto, o hospedeiro também desenvolve uma resposta não específica, rápida e bastante eficiente, que é de suma importância no início da invasão. Tal resposta constitui a primeira linha de defesa do organismo e é marcada pela produção de citocinas, tais como IFN (interferon) e TNF (tumor necrosis factor), assim como o envolvimento do sistema complemento e células especializadas em fagocitose, tais como macrófagos e células natural killers (NK). Esta resposta genérica a diferentes patógenos, denominada resposta imune inata, ao contrário do sistema imune adaptativo mencionado anteriormente, não confere uma proteção duradoura ao hospedeiro, mas sim uma proteção imediata e inicial contra a infecção. Os eventos que envolvem essa resposta culminam na morte da célula infectada por apoptose, desta forma diminuindo a replicação do vírus no hospedeiro e reduzindo a proliferação de progênie (EVERETT;MCFADDEN, 1999).

O termo apoptose foi cunhado em 1972 em um importante trabalho publicado por John Foxton Kerr, Andrew Wyllie e Alastair Currie (KERR;WYLLIE;CURRIE, 1972) e descreve um tipo específico de morte celular programada, marcado por características morfológicas específicas que são importantes para se determinar sua ocorrência. A morte celular por apoptose é um processo natural das células e está envolvida com seu ciclo normal de desenvolvimento e maturação, sendo componente de muitas respostas dos tecidos vivos a agentes externos, como drogas ou patógenos, e a modulações endógenas, como inflamação e distúrbios ao material genético (dano no DNA). Além disso, a apoptose é importante na formação do organismo como um todo, sendo crucial no desenvolvimento do embrião e na manutenção da homeostase dos tecidos. Apoptose também desempenha um papel de proteção no organismo, eliminando células que podem se tornar prejudiciais se continuassem vivas e se multiplicando, tais como células com danos ou mutações no DNA que poderiam levar ao desenvolvimento de tumores (O'BRIEN, 1998).

O estudo da apoptose envolve a análise de vários aspectos morfológicos e bioquímicos da célula que são bem característicos: encolhimento e redução do volume da célula, condensação e fragmentação da cromatina, e clivagem do DNA da célula por endonucleases em sítios entre os nucleossomos, gerando vários múltímeros de unidades nucleossomais de DNA (fragmentação do DNA). Este processo resulta na desintegração da célula formando os

corpos apoptóticos, que são rapidamente fagocitados por macrófagos ou por células vizinhas. Durante os estágios iniciais da apoptose, a assimetria dos fosfolípidios da membrana citoplasmática da célula é alterada, resultando no deslocamento dos resíduos de fosfatidilserina para a superfície celular (KROEMER et al., 2009).

Cada vez mais se acumulam evidências de que as perturbações celulares causadas por uma infecção viral são capazes de acionar a maquinaria de apoptose. Em muitos casos esta resposta celular tem um efeito negativo na replicação do vírus, principalmente em vírus cujos ciclos de replicação são mais demorados. Nestes casos, muitos vírus codificam em seu genoma proteínas que foram selecionadas durante a evolução de modo a permitir que o mesmo bloqueie ou retarde o processo de morte celular prematura, podendo assim prolongar o tempo de vida da célula e otimizar a produção de progênie (O'BRIEN, 1998). Por outro lado, muitos vírus podem iniciar o processo apoptótico devido à interação de proteínas indutoras de apoptose específicas codificadas por seus genes e que de certa forma facilitam sua disseminação no hospedeiro (EVERETT;MCFADDEN, 1999). Esta indução parece ser favorável para a disseminação do vírus, pois o resultado da morte celular por apoptose é silencioso, não ocorrendo resposta inflamatória, fazendo com que o vírus se dissemine pelo organismo sem ser percebido pelo sistema imunológico (HAY;KANNOURAKIS, 2002).

Durante o processo apoptótico ocorre a formação de pequenas porções celulares envoltas por membrana denominados corpos apoptóticos. Estes corpos se desprendem da célula que está morrendo e são prontamente fagocitados pelas células vizinhas. Desta maneira, o vírus contido nestes corpos apoptóticos conseguem se disseminar sem iniciar a resposta imunológica do hospedeiro, que seria esperada se a progênie viral fosse liberada no espaço extracelular, caso houvesse extravasamento de conteúdo celular.

Esta relação entre a replicação viral e a maquinaria de morte celular é tão intrincada que muitas vezes o mesmo vírus apresenta proteínas que funcionam tanto no bloqueio quanto na indução de apoptose. As tabelas 1 e 2 abaixo apresentam alguns exemplos de proteínas codificadas por genes virais de várias famílias que são comprovadamente importantes na indução ou na inibição do processo de morte celular por apoptose.

Tabela 1: Exemplos de proteínas virais com ação anti-apoptótica.

Vírus	Produto	Mecanismo
Adenovírus	E1B-19K	
Vírus da febre suína Africana	A179L/5-HL	
Epstein-Barr	BHRF-1	Homólogo de Bcl-2
Herpesvírus saimiri	ORF16	
Herpesvírus humano 8	KSbcl-2	
Vírus da febre suína Africana	A224L/4CL	
Baculovírus	P53.IAP	Inibição de Caspase
Poxvírus	crmA/SPI-2	
Adenovírus	RID/E3-14.7K	
Epstein-Barr	LMP-1	
Herpesvírus Eqüino	E8	
Herpesvírus saimiri	orf71	Inibição da via Fas/TNF
Herpesvírus humano 8	K13	
Mixoma Vírus	M-T2	
Vírus do Molusco Contagioso	MC159L	
Adenovírus	E1B-55K	
Papilomavírus Humano	E6	Antagonista de p53
Simian Vírus 40	Antígeno-T	
HIV-1	tat	
Vírus Influenza	NS1	Inibição de PKR
Reovírus	$\sigma 3$	
Vírus Vaccinia	E3L, K3L	

Tabela 2: Exemplos de proteínas virais com ação indutora de apoptose.

Vírus	Produto	Mecanismo
HIV-1	gp120, gp41	
Reovírus	$\sigma 1$	Sinalização de receptor
Vírus Sindbis	E2	
HIV-1	Tar mRNA	Indução de PKR
Reovírus	S1 mRNA	
Adenovírus	E1A	
Papilomavírus Humano	E7	Potencialização de p53
Síman Vírus 40	Antógeno-T	
Vírus da Leucemia de células-T humano	tax	Desregulação da transcrição
Papilomavírus Humano	E2	

O processo de morte celular programada por apoptose é finamente controlado por proteínas celulares especializadas, as quais são ativadas e arranjadas em módulos de sinalização seqüencial. Didaticamente, o processo de apoptose pode ser dividido em duas vias principais, as quais muitas vezes se intercomunicam e compartilham das mesmas moléculas ativadoras. A primeira é a via extrínseca, que é acionada através da ligação de um ligante ao receptor de morte, como CD95 ou Fas, um membro da superfamília do receptor de Fator de Necrose Tumoral (TNF). Durante uma infecção viral esta via pode ser ativada, através da ligação do vírus com seu receptor na membrana plasmática da célula hospedeira, conforme é observado para os vírus HIV, Herpes Simplex (HSV) e Vaccinia (EVERETT;MCFADDEN, 2001). Apesar deste mecanismo ainda não ser muito bem descrito, aparentemente a ligação das proteínas do envelope viral com receptores celulares parece ser suficiente para dar início ao processo de apoptose.

A segunda é a via intrínseca, a qual é dependente da liberação de citocromo c da mitocôndria, que culmina na ativação da cascata que leva ao sinal de morte. Geralmente esta via é acionada durante a replicação do vírus no interior da célula e é dependente da interação de proteínas virais com proteínas celulares da via apoptótica (EVERETT;MCFADDEN, 2001). Em ambos os casos a via final que leva à execução do sinal de morte é a ativação de uma série de proteases denominadas caspases.

O termo caspase se refere a uma família de cisteíno-proteases celulares altamente conservadas ao longo da evolução, presentes desde em humanos até insetos, nemátodos e cnidários (HENGARTNER, 2000), que são normalmente encontradas no citoplasma das células na forma inativada, denominada pró-caspase (THORNBERRY;LAZEBNIK, 1998). Estas proteínas, quando ativadas frente a um estímulo apoptótico, clivam seus substratos em resíduos de ácido aspártico e são responsáveis pela execução do processo de apoptose. Estas enzimas são consideradas bastante específicas, pois reconhecem um “motif” de aproximadamente quatro aminoácidos próximos ao sítio de clivagem que é diferente para cada tipo de caspase, o que possibilita a elas desempenharem funções específicas e bem variadas. A ação das caspases é tão específica e eficiente que quando uma célula em apoptose é analisada não se observa uma digestão de proteínas generalizada e indiscriminada, mas sim apenas uma parcela das proteínas celulares é clivada, resultado da ação de caspases específicas (THORNBERRY;LAZEBNIK, 1998).

A ação das caspases promove, em consequência, a inativação de proteínas que são importantes para a manutenção da célula. A enzima CAD (desoxiribonuclease ativada por caspase) é uma enzima nuclear que é encontrada na forma inativa por se ligar a um inibidor

denominado I^{CAD}/DFF45. Durante a apoptose, a ação das caspases cliva este inibidor, permitindo que a enzima CAD se torne ativa e promova a digestão do DNA entre as porções nucleossomais, ocorrendo assim a fragmentação do DNA celular (ENARI et al., 1998). Além disso, caspases específicas parecem promover a clivagem de Bcl-2, uma importante proteína anti-apoptótica que é responsável por manter a célula viva por impedir que ocorra liberação de citocromo c da membrana da mitocôndria, um importante sinal ativador da via intrínseca da apoptose. Outras ações das caspases incluem a destruição da lâmina celular através da clivagem das moléculas de lamininas, resultando na condensação da cromatina, característica bastante marcante do processo de apoptose (THORNBERRY;LAZEBNIK, 1998). A ação destas proteínas resulta ainda na clivagem de proteínas quinases celulares tais como FAK (focal adhesion kinase) e PAK2 (p21-activated kinase), importantes para a manutenção do metabolismo celular, assim como a clivagem de proteínas do citoesqueleto e proteínas envolvidas com o reparo ao dano no DNA, como DNA-PK. São elas as responsáveis pela manifestação das características morfológicas típicas de uma célula em apoptose, como a vesiculação e formação de invaginações na membrana (“blebbing”), por exemplo.

A proteólise resultante da ação das caspases é um processo irreversível, o que implica um processo de regulação bastante intrincado para que a ação destas enzimas não aconteça de maneira aleatória em uma célula normal. O estímulo que induz a célula a entrar em apoptose passa por uma cascata de ativação onde uma pró-caspase inativada se torna ativa e passa a clivar a forma inativa de outra caspase, a qual se torna ativa e repete o processo até uma caspase final que será responsável por praticar o suicídio daquela célula (DANIAL;KORSMEYER, 2004). Deste modo, a forma precursora de uma caspase é sempre uma enzima com pouca ou nenhuma atividade proteolítica, que se torna ativa quando é clivada por outra protease específica, ou por ela mesma, quando estímulos apoptóticos permitem que ela se aglomere em algum ponto da célula.

As caspases humanas são subdivididas em dois grupos: as ativadoras (caspases 2, 8, 9, 10 e 12) e as efetoras (3, 6 e 7). As caspases ativadoras são importantes em momentos precoces da cascata apoptótica, com fundamental papel de clivar especificamente e de maneira irreversível as caspases efetoras, que são as caspases executoras do processo de apoptose. Por sua vez, as caspases efetoras são responsáveis por clivar os alvos protéicos celulares específicos que levarão a célula ao processo de morte.

Durante a infecção de uma célula eucariótica por vírus, várias vias que levam à morte celular podem ser ativadas. Uma destas vias é a produção de Interferons do tipo I (interferons α e β). A presença de RNAs de fita dupla (dsRNAs), produzidos durante a replicação viral, é

detectada por Toll-like receptors 3 (TLR3), os quais recrutam adaptadores protéicos e fatores de transcrição (IRF3 e NF- κ B) que promovem a expressão de interferon β . Estas moléculas, através da ativação de uma via que inclui algumas proteíno-quinases citoplasmáticas específicas (JAK-STAT) induzem a expressão da Proteína Quinase R (PKR). A expressão desta proteína é um importante componente da resposta inata da célula frente a uma infecção viral (EVERETT;MCFADDEN, 2001). Foi demonstrado que o vírus Influenza A parece ativar esta proteína de maneira bastante eficiente (BALACHANDRAN et al., 2000). A ação de PKR induz a fosforilação da sub-unidade α do fator de iniciação de transcrição eIF2 α , um importante fator de transcrição celular, tornando-o inativado e reduzindo assim a transcrição eucariótica (BALACHANDRAN et al., 2000). Na maioria dos estudos realizados com vírus de RNA de polaridade negativa, incluindo os vírus da família *Bunyaviridae*, não é possível detectar a presença de RNAs de dupla fita durante a replicação viral, provavelmente devido à proteção das mesmas pelas proteínas do nucleocapsídeo (WEBER et al., 2006). No entanto, a produção de IFN do tipo 1, assim como a importância de TLR3 e a ativação de PKR já foram demonstradas em infecções com os bunivírus Punta Toro e Bunyanwera, o que indica que ao menos pequenas quantidades indetectáveis de RNA dupla fita possa existir nas células infectadas (STREITENFELD et al., 2003; GOWEN et al., 2006). Entretanto, outra via de ativação de IFN pode estar sendo envolvida nesse processo, como, por exemplo, a via que envolve o reconhecimento de resíduos de guanidina trifosfato (GTP), que é incorporado à porção 5' do RNA genômico do vírus durante a replicação, por proteínas celulares específicas, como a RNA helicase RIG-1, por exemplo, que sinalizam para produção de IFN, conforme já foi demonstrado em influenza e vírus da raiva (HORNUNG et al., 2006; PICHLMAIR et al., 2006).

Outra via ativada pela replicação viral e que resulta na indução de apoptose é uma consequência direta do stress causado no retículo endoplasmático, induzido, por exemplo, pelo vírus Sincicial Respiratório Humano (hRSV) (BITKO;BARIK, 2001). Esta via é dependente de caspase 12, que é ativada quando ocorre uma ruptura na homeostase de cálcio ou acúmulo de proteínas em excesso no retículo endoplasmático (NAKAGAWA et al., 2000).

A replicação de vírus em seus hospedeiros pode ainda ativar uma outra via que converge na morte celular por apoptose, que é a via ativada por sensores nucleares que detectam dano ou uma elevada atividade transcricional atípica no DNA, tais como a proteína p53 (NEIL;CAMERON;BAXTER, 1997). A proteína p53 é um importante supressor de tumor que se liga em regiões específicas do DNA promovendo ou reprimindo a expressão de genes determinados relacionados com o ciclo celular e com a indução de apoptose. Exemplos

de genes ativados por p53 são p21, uma proteína inibidora de quinase dependente de ciclina que promove a parada do ciclo celular na fase G1 e a proteína pró-apoptótica da família Bcl-2 denominada Bax, que está envolvida com a liberação de citocromo c da membrana da mitocôndria (NEIL;CAMERON;BAXTER, 1997). Esta via é tão importante que muitas proteínas virais foram selecionadas evolutivamente por se ligarem em p53 de uma maneira bastante específica e inibir sua ação, permitindo assim que o vírus se replique sem que a célula entre em apoptose. Tal fato ocorre principalmente durante o ciclo de vida de vírus de DNA, que necessitam da maquinaria nuclear para replicação, tais como Vírus SV40 (AHUJA;SAENZ-ROBLES;PIPAS, 2005), Vírus da Hepatite B (WANG et al., 2002) e Vírus Epstein-Barr (NEIL;CAMERON;BAXTER, 1997), por exemplo.

Uma outra via de indução da resposta apoptótica envolve diretamente a mitocôndria. Além de estar envolvida com a síntese de ATP e fornecimento de energia para a célula, esta organela é um importante alvo das caspases e moléculas envolvidas com a morte celular. A liberação de citocromo c de sua membrana externa é um irreversível sinal ativador de caspase 9 e conseqüentemente de caspase 3, contribuindo assim com a efetivação da cascata de apoptose e indução do suicídio celular (IRUSTA;CHEN;HARDWICK, 2003). No entanto, antes da liberação de citocromo c, a membrana da mitocôndria sofre uma importante modificação estrutural que acarreta em uma redução de seu potencial ($\Delta\psi_m$). Esta alteração no gradiente eletroquímico da membrana interna da mitocôndria provavelmente acontece devido à abertura de poros transitórios (MTP – mitochondrial permeability transition pores) tanto na membrana externa quanto interna da mitocôndria (YANASE et al., 2000). O MTP parece ser composto de várias proteínas que aparentemente auxiliam na liberação de citocromo c para o citoplasma. Acredita-se que esta despolarização é conseqüência direta também da permeabilização da membrana externa da mitocôndria (KNUDSON;BROWN, 2008). Este processo aparentemente é regulado por membros da família de proteínas Bcl-2. Foi demonstrado que um membro pró-apoptótico desta família, denominado Bax- α se transloca do citoplasma para a membrana da mitocôndria e seria responsável pela formação de canais iônicos e pela constituição dos MTPs (YANASE et al., 2000).

Uma conseqüência da despolarização da membrana da mitocôndria é a liberação de citocromo c no citoplasma. Originalmente envolvido na cadeia de transporte de elétrons durante a síntese de ATP celular, quando é liberado no citoplasma, esta molécula desempenha uma nova e bastante eficiente função, que de certa forma é oposta à sua função normal na célula e se torna um dos principais mensageiros para o suicídio celular (IRUSTA;CHEN;HARDWICK, 2003). No citoplasma o citocromo c se liga à proteína

adaptadora Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1) tornando-se um co-fator para a pró-caspase 9. Desta maneira é formado o complexo que é denominado apoptossomo, responsável por ativar a pró-caspase 9, a qual, em seguida, ativa a pró-caspase 3 (SLEE et al., 1999).

A relação entre a replicação viral e a ativação da cascata de morte celular é um assunto bastante intrigante, uma vez que parece existir uma grande variedade de mecanismos pelos quais os vírus promovem a morte celular programada em suas células hospedeiras. Uma maneira de se estudar este aspecto é conduzir ensaios que analisam a ativação da via apoptótica em diferentes pontos do ciclo de replicação de um determinado vírus. É sabido que muitos vírus precisam se replicar ativamente na célula hospedeira para que ocorra a resposta de morte da célula (CARRASCOSA et al., 2002).

No entanto, já foram mostrados vários exemplos de apoptose induzida na ausência da replicação viral. Por exemplo, para o vírus da Herpes Simplex Tipo 1 humano, não é necessário que ocorra síntese das proteínas virais para ocorrer a apoptose, que acontece antes de 6 horas após a infecção de células Hep-2 *in vitro* (AUBERT;O'TOOLE;BLAHO, 1999). Em outro exemplo bastante interessante foi demonstrado que para o Herpesvírus Bovino Tipo 1, a simples ligação do vírus com o receptor da célula do hospedeiro já seria suficiente e essencial para a indução de apoptose, sem a necessidade da penetração do vírus na célula (HANON et al., 1998). O mesmo acontece com o Reovírus Tipo 3, cuja ligação da proteína estrutural sigma-1 com o receptor celular já é suficiente para a ativação da maquinaria de apoptose (TYLER et al., 1995), mesmo quando a replicação do vírus na célula é impedida.

Um estudo realizado com o vírus Vaccinia em células de ovário de hamster chinês (CHO) mostrou ainda que o processo de apoptose induzida pelo vírus ocorre mesmo quando a síntese de proteínas viral é inibida, sugerindo que um evento que ocorre após a ligação do vírus associado com a entrada na célula é suficiente para a indução de apoptose (RAMSEY-EWING;MOSS, 1998). Foi demonstrado também que o vírus Sindbis da família Togaviridae, um importante arbovírus africano, também induz apoptose no momento da fusão entre o envelope do vírus e a membrana da célula, com importante ação das proteínas estruturais do envelope viral E1 e E2, não sendo necessária a replicação do vírus no citoplasma da célula (JAN;GRIFFIN, 1999).

No entanto, na maioria das vezes a replicação do vírus no interior da célula e a conseqüente síntese de proteínas virais específicas é indispensável para que ocorra a indução de apoptose. Tal fato sugere que um balanço entre os fatores celulares que regulam a morte celular e proteínas virais que regulam a sua replicação deve existir de modo determinante para a eficiência da infecção (ROULSTON;MARCELLUS;BRANTON, 1999).

O estudo da relação entre os vírus da família *Bunyaviridae* e a indução de apoptose se iniciou em 1996 com um trabalho que revelou que o vírus La Crosse (gênero *Orthobunyavirus*) induz apoptose em células BHK e Neuroblastoma em cultura, e em cérebros de camundongos recém-nascidos (PEKOSZ et al., 1996). Em seguida, resultados semelhantes foram obtidos com o hantavírus Hantann em células Vero (KANG et al., 1999), vírus Bunyanwera (gênero *Orthobunyavirus*) (KOHL et al., 2003), vírus Akabane e vírus Aino (gênero *Orthobunyavirus*) em células Vero (LIM et al., 2005) e vírus Punta Toro (gênero *Phlebovirus*) em hepatócitos quando em modelo *in vivo* utilizando-se hamsters (DING et al., 2005).

Baseado nestas evidências, foi proposto realizar um estudo para compreender a interação do vírus Oropouche com a célula hospedeira, com o objetivo de determinar se durante a replicação do vírus ocorre ativação da maquinaria que leva à morte da célula por apoptose, assim como estabelecer a importância deste fenômeno para a replicação do vírus, conforme já fora demonstrado para outros vírus estudados (O'BRIEN, 1998). O estudo da relação entre a morte celular programada e a replicação viral é importante para se compreender como os vírus modulam a resposta celular e como eles utilizam a maquinaria da mesma de modo a replicar sua progênie da maneira mais eficiente. Como a apoptose é um fenômeno comum que ocorre durante a infecção viral (IRUSTA;CHEN;HARDWICK, 2003), seja ela induzida diretamente pelo vírus, ou como uma resposta da célula infectada, ela é provavelmente um importante fator que pode contribuir com a patogênese do vírus em seu hospedeiro. Portanto, o estudo deste processo é importante para se compreender esta interação, de modo a buscar maneiras de conter a proliferação do vírus no organismo e, possivelmente, procurar possíveis alvos para drogas anti-virais.

Foi utilizada como modelo de infecção para OROV no presente trabalho a inoculação *in vitro* de células HeLa em cultura. Essa é uma linhagem de células imortalizadas, originárias de câncer epitelial de ovário, e foi escolhida como modelo para o presente trabalho porque é uma linhagem de origem humana, fato este que aproxima os resultados observados com a realidade de uma célula do hospedeiro natural do vírus, se comparada ao uso de outra linhagem celular, como VERO (macaco), MDCK (cão) e BHK-21 (hamster), por exemplo, que são bastante utilizadas em estudos da replicação de vírus *in vitro*. Além disso, por ser uma linhagem contínua, a obtenção e manipulação dessas células em cultura é uma tarefa simples. Muitos trabalhos que envolvem estudo de apoptose *in vitro* utilizam culturas de células HeLa como modelo, pois ela permite realizar a observação das características morfológicas e bioquímicas típicas de uma célula em apoptose. Ademais, o vírus Oropouche replica nesta

célula com bastante eficiência, provocando um efeito citopático observável (SANTOS et al., 2008).

Sabe-se que a linhagem de células HeLa, assim como outras linhagens de carcinoma de ovários humanos, tais como CaSKi, SiHa e ME180 se tornaram imortalizadas através de infecção por papilomavírus humano (HPV) (YEE et al., 1985). Já foi demonstrado que o genoma de HeLa contém genes de HPV-16 e HPV-18, e esta linhagem de células expressa constitutivamente algumas proteínas deste vírus, incluindo E6 e E7, que influenciam na maquinaria de apoptose da célula via proteína p53. A proteína E6, por exemplo, atua como ubiquitina ligases específicas para a proteína pró-apoptótica p53, diminuindo a quantidade desta proteína na célula (SCHEFFNER et al., 1991). Desta maneira, a análise do processo de apoptose nessa linhagem celular deve sempre levar este fato em consideração. No entanto, a expressão destas proteínas de HPV não altera a biologia da célula a ponto de torná-la inviável para os estudos propostos pelo presente trabalho, uma vez que vários trabalhos de apoptose vêm sendo desenvolvidos com este modelo, inclusive para o estudo da relação de p53 com a morte celular programada (NGUYEN et al., 2007). Alguns trabalhos apontam ainda para a ativação desta proteína em células HeLa infectadas, fato este que mostra que a ação das proteínas E6 e E7 de HPV podem ser suplantadas e a função pró-apoptótica de p53 reestabelecida, pois o seu gene na célula continua intacto (NEIL;CAMERON;BAXTER, 1997; GOMES, 2007). Portanto, este fato não interfere de maneira negativa nos estudos de apoptose, o que torna o modelo proposto de infecção de células HeLa por OROV bastante confiável.

2.OBJETIVOS

2.Objetivos

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a indução de apoptose em células HeLa pela replicação do vírus Oropouche, através das seguintes investigações:

- Verificar se a apoptose ocorre durante a infecção viral, mediante identificação de marcadores moleculares e morfológicos característicos de células apoptóticas;
- Determinar em que momento do ciclo de replicação do vírus ocorre o acionamento da maquinaria de morte celular, procurando-se associar a cinética de replicação viral com a indução de apoptose.
- Determinar a relação da proteína não estrutural NSs de OROV com a indução de apoptose através da análise da expressão desta proteína em cultura de células HeLa.
- Analisar a indução de apoptose por OROV em modelo animal para comprovar se este processo também ocorre em infecção *in vivo*.

3.MATERIAL E MÉTODOS

3. Material e Métodos

3.1. Cultivo e infecção de células

Monocamadas de células HeLa (carcinoma cervical de ovário humano) foram mantidas em Meio Essencial Mínimo-MEM (Gibco/Invitrogen-EUA) contendo 10% de Soro Fetal Bovino-SFB (Gibco/Invitrogen-EUA), 1% de uma suspensão de antimicótico-antibiótico (Gibco/Invitrogen-EUA) e 100 mM de L-glutamina (Gibco/Invitrogen-EUA), a 37°C em estufa com atmosfera contendo 5% de CO₂.

O estoque de vírus Oropouche (OROV) utilizado nesse estudo pertence à cepa de referência BeAn19991 e foi gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Luis Tadeu Figueiredo. O vírus foi inicialmente amplificado em cérebro de camundongo e posteriormente propagado em monocamadas de células VERO por três passagens seriadas seguindo métodos convencionais. Tal estoque, que foi denominado P12.1, foi titulado pelo ensaio de TCID₅₀ com cálculos segundo Reed e Muench (REED;MUENCH, 1938), tendo sido obtido título de 10^{6,75} TCID₅₀/mL. Neste cálculo o título é determinado através de diluições seriadas do estoque de vírus e analisada em placas contendo células VERO em cultura. O título do vírus é considerado a maior diluição que causa efeito citopático em 50% das cavidades da placa contendo a cultura de células analisada 48 horas após o inóculo. As alíquotas deste estoque foram então armazenadas em nitrogênio líquido e usadas em todos os experimentos.

Monocamadas semiconfluentes de células HeLa foram infectadas com vírus OROV utilizando uma M.O.I = 10 para garantir que todas as células da cultura fossem infectadas por pelo menos uma partícula viral. Essas culturas de células foram incubadas à 4°C por uma hora, para adsorção. Decorrido este período, as células foram lavadas com PBS (Gibco/Invitrogen-EUA), receberam MEM fresco suplementado com 2% de SFB e foram incubadas a 37°C, em estufa com 5% de CO₂, pelo tempo adequado a cada experimento.

Foram também realizados experimentos nos quais determinadas drogas foram acrescentadas ao estoque de vírus e em diferentes intervalos de tempo pós-infecção (experimentos de tempo de adição). Os títulos da progênie viral resultante desses experimentos foram determinados a partir do extrato total de células mais sobrenadante, pelo ensaio de TCID₅₀ através do método de Reed e Muench (REED;MUENCH, 1938).

3.2. Drogas utilizadas

Para se estudar a cinética de replicação do vírus Oropouche e a indução de apoptose, foram utilizadas drogas que interferem com o ciclo do vírus e com a biologia da célula, tais como cloroquina (Sigma Aldrich-EUA) na concentração de 32µg/mL (KEYAERTS et al., 2004), cicloheximida (Sigma Aldrich-EUA) na concentração de 20µg/mL (modificado de SHIH et al., 2008) e o inibidor de pan-caspases Z-VAD-FMK (Promega-EUA) na concentração de 40µM (modificado de MARTIN et al., 2007). As drogas foram adicionadas em meio MEM com 2% de SFB juntamente com o estoque de vírus, ou em tempos diferentes, conforme será especificado. Foi utilizada também uma droga indutora de apoptose como controle positivo para os ensaios, actinomicina D (Sigma Aldrich-EUA), na concentração de 0,25µg/mL. Esta concentração foi determinada através de ensaio de viabilidade celular. Para tanto, foi utilizada uma placa de 24 cavidades com cultura de células HeLa tratadas com diferentes concentrações da droga (0,1; 0,25; 0,5; 1,0 e 2,0µg/mL). No tempo de 24 horas após a adição da droga as células foram coletadas e a viabilidade foi determinada utilizando o corante Azul de Tripán (Sigma Aldrich-EUA) e a contagem das células viáveis realizada em Câmara de Neubauer (Hausser Scientific-EUA).

3.3. Imunofluorescência indireta para o vírus Oropouche

Células HeLa foram crescidas sobre lamínulas de 24 milímetros de diâmetro (Knittel Glaser-Alemanha) em placas de 24 cavidades (TPP-Tissue Culture Labware-Suíça) contendo meio MEM com 10% de SFB e incubadas em 5% de CO₂ a 37°C. Após as monocamadas atingirem semiconfluência, foram infectadas com vírus OROV (M.O.I. = 10) e incubadas a 37°C. Decorrido o período de infecção, as lamínulas contendo as monocamadas de células HeLa foram imediatamente processadas para imunofluorescência.

Todos os passos a seguir foram realizados à temperatura ambiente. Inicialmente as células nas lamínulas foram fixadas em paraformaldeído a 2% (Sigma Aldrich-EUA) diluído em PBS, por 10 minutos, e em seguida, lavadas com PBS. Depois, as lamínulas foram incubadas em PBS contendo 0,1 M de Glicina (Vetec-Química Fina-Brasil) por 10 minutos. Decorrido este período as lamínulas foram lavadas em PBS e permeabilizadas com 0,3% de Triton X-100 (Sigma Aldrich-EUA) em PBS por 15 minutos, a seguir lavadas em PBS e os sítios de ligação de anticorpos inespecíficos foram bloqueados através de incubação por 1 hora com 1% de soro-albumina bovina-BSA (Sigma Aldrich-EUA) e anticorpo IgG de

jumento diluído a 1/1000 (Jackson Immunoresearch-EUA). Após nova lavagem em PBS, as células nas lamínulas foram incubadas por 1 hora em PBS contendo 1% de BSA adicionado do anticorpo primário na diluição de 1:500. O anticorpo primário anti-OROV utilizado consiste em soro de fluido ascítico de camundongo (MIAF), que foi cedido gentilmente pelo Prof. Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo. Em seguida foi realizada nova lavagem e incubação por 45 minutos com o anticorpo secundário diluído 1:500 em PBS, acrescido de 1% de BSA. Foi utilizado anticorpo de jumento anti-camundongo conjugado com FITC (Molecular Probes/Invitrogen-EUA). Por fim, as lamínulas foram lavadas em PBS, montadas invertidas com Fluoromount-G Slide Mounting Medium (Electron Microscopy Sciences-EUA) em lâminas de microscopia, seladas e estocadas a 4°C. Em seguida o material foi examinado e imagens foram adquiridas em microscópio de fluorescência (Olympus Modelo BX40-EUA).

3.4. Análise da morfologia de células HeLa infectadas com OROV por fluorescência: características morfológicas de células em apoptose

Células HeLa crescidas em monocamadas em uma placa de seis cavidades (TPP-Tissue Culture Labware-Suíça) foram utilizadas para a contagem de células com morfologia característica de apoptose.

As células foram infectadas com o vírus (M.O.I. = 10) ou tratadas com a droga actinomicina D (Sigma Aldrich-EUA) na concentração de 0,25µg/mL e incubadas em estufa com 5% CO₂ a 37°C por 12, 24, 36 e 48 horas. Em seguida, o sobrenadante contendo células que se soltaram da monocamada foi coletado e armazenado em um tubo de centrifuga de 2mL (Eppendorf-Alemanha). As células ainda aderidas foram lavadas com 50µL de PBS e em seguida foram removidas utilizando 300µL de tripsina com EDTA 1mM (Gibco/Invitrogen-EUA). Em seguida, o sobrenadante previamente coletado foi adicionado às células obtidas por tripsinização e foi produzida um precipitado (“pellet”) por centrifugação a 500×g, que foi ressuspendida em 100µL de meio e tratada com 2µL de uma solução de corantes (5µg/mL de Iodeto de Propídeo + 15µg/mL de Diacetato de Fluoresceína diluído em DMSO + 2µg/mL de Hoechst 33342) (Sigma Aldrich-EUA), seguido de incubação por cinco minutos a 37°C. Depois, 15µL desta suspensão foram depositados em uma lâmina de vidro e devidamente montados com lamínula. As células foram contadas em microscópio de fluorescência com filtros para DAPI, Iodeto de Propídeo e FITC. Foram então contadas 500 células para cada experimento e as células marcadas em azul (Hoescht 33342), com morfologia indicando fragmentação nuclear, foram consideradas como positivas para apoptose.

3.5. Análise da fragmentação de DNA por eletroforese em gel de agarose

Para a análise da fragmentação de DNA por eletroforese em gel de agarose foram utilizadas monocamadas semiconfluentes de células HeLa cultivadas em garrafas de cultura de célula de 25cm² (TPP – Tissue Culture Labware-Suíça). As células foram infectadas com OROV (M.O.I. = 10) em MEM com 2% de SFB, incubadas em estufa de CO₂ a 37°C e coletadas 12, 24, 36 e 48 horas após a infecção. Como controle positivo foram usadas células tratadas com a droga actinomicina D a 0,25µg/mL e coletadas após 24 horas. Para coleta, as células que ainda estavam aderidas à monocamada foram removidas mecanicamente por raspagem, sem descartar as que já haviam se desprendido da garrafa (sobrenadante). As células foram ressuspensas no meio de cultura, centrifugadas a 1.000×g por 10 minutos, ressuspensas em 500µL de solução de lise (Tris 10mM, pH7,4 + EDTA 1mM + 0,2% Triton X-100) (Sigma Aldrich, Gibco/Invitrogen e Invitrogen, respectivamente-EUA) e a seguir incubadas por 20 minutos a 4°C. Depois o lisado de células foi centrifugado a 12.000×g por 20 minutos e o sobrenadante foi transferido para tubo novo.

Ao sobrenadante foram adicionadas 100µg/mL de RNase A (Invitrogen-EUA) e incubou-se a 37°C por 1 hora. Em seguida foi adicionada Proteinase K (Invitrogen-EUA) na concentração final de 20mg/mL (SAMBROOK;RUSSELL, 2001) e incubou-se a 57°C por 1 hora. A seguir, volume igual ao da amostra (aproximadamente 500µL) de fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) (Sigma Aldrich-EUA) foi adicionado e homogeneizado. Esta solução foi então submetida à centrifugação a 12.000×g por 5 minutos e a fase aquosa foi transferida para um tubo novo. A este sobrenadante foram adicionados 6% de NaCl 3M (Synth-Brasil), com homogeneização e adição de 1mL de etanol absoluto gelado (Merck-Alemanha). A solução foi agitada levemente e deixada a -20°C por pelo menos 12 horas para precipitação do DNA.

Em seguida, a amostra foi centrifugada a 13.000×g por 20 minutos, o sobrenadante foi descartado, e o precipitado foi lavado com 1mL de etanol 70% gelado, seguido de centrifugação a 13.000×g por 5 minutos e nova lavagem com 500µL de etanol absoluto. A amostra foi centrifugada a 13.000×g por 5 minutos e o precipitado foi seco ao ar por 30 minutos. Em seguida o precipitado foi ressuspensado em 50µL de tampão TE (Tris-HCL 10mM + EDTA 10mM, pH8,0) e armazenado em freezer a -20°C. O DNA extraído foi quantificado por espectrofotômetro (Eppendorf-Alemanha) e analisado para a presença de um padrão de bandas semelhantes a uma escada (“ladder”) por eletroforese em gel de agarose a

1,2% (Invitrogen-EUA). Em cada canaleta do gel de agarose foi aplicada sempre a mesma quantidade de DNA em cada experimento realizado (30ng).

3.6. Ensaio de TUNEL in situ em células HeLa

Células HeLa foram mantidas sobre lamínulas de 24 mm de diâmetro em placas de 24 cavidades contendo MEM suplementado com 10% de SFB e incubadas em estufa de CO₂ a 37°C. Após atingirem semiconfluência, as culturas foram infectadas com OROV (M.O.I. = 10) e incubadas em estufa de CO₂ a 37°C por 12, 24, 36 e 48 horas, após o que as lamínulas contendo células foram testadas pelo ensaio de TUNEL. Como controle positivo foram usadas células tratadas com a droga actinomicina D a 0,25µg/mL e coletadas após 24 horas.

Inicialmente as lamínulas contendo a monocamada de células foram fixadas em paraformaldeído a 2% diluído em PBS por 10 minutos, e em seguida lavadas com PBS. Depois desta lavagem, as lamínulas foram incubadas em PBS contendo 0,1 M de Glicina por 10 minutos, lavadas com PBS e permeabilizadas com Triton X-100 a 0,3% em PBS, por 15 minutos. Em seguida as lamínulas foram lavadas em PBS e submetidas ao protocolo para marcação por TUNEL pelo KIT *In Situ* Cell Death Detection, TMR Red (Roche-Suíça), de acordo com as especificações do fabricante.

Após a marcação por TUNEL, as lamínulas foram lavadas em PBS e montadas sobre lâminas com Fluoromount-G.

3.7. Análise da fragmentação de DNA pelo estudo da população sub-G1 por citometria de fluxo

A fragmentação do núcleo de células em apoptose foi determinada por citometria de fluxo pela análise da quantidade de ácido nucléico presente em cada célula corada com iodeto de propídeo-PI (Sigma Aldrich). Essa análise identifica células em diferentes fases do ciclo celular, como exemplificado na figura 4. O gráfico gerado mostra quatro picos distintos e as células com núcleo fragmentado se encontram no pico correspondente à população Sub-G1 (pico 1 do gráfico).

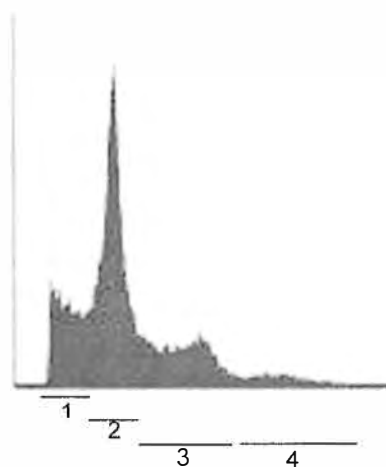


Figura 4: Modelo de gráfico característico obtido em análises de ciclo celular com células tratadas com iodeto de propídeo submetida à leitura em citometria de fluxo (FACS). O eixo X representa a intensidade da fluorescência lida pelo aparelho, que corresponde à quantidade de material genético presente na célula. O eixo Y representa o número de células. 1-população sub-G0/G1 = células com núcleo fragmentado (em apoptose). 2-população G0/G1 = células com número normal de DNA (n). 3-população G2/S = células com o dobro do material genético ($2n$). 4-células com 3 vezes ou mais material genético ($n > 3$).

Para realizar esse ensaio, células HeLa semiconfluentes crescidas em placas de 24 cavidades em MEM com 10% de SFB foram infectadas com OROV (M.O.I. = 10) e incubadas na estufa de CO_2 a 37°C por 12, 24, 36 e 48 horas. Como controles positivos foram usadas células tratadas com a droga actinomicina D a $0,25\mu\text{g}/\text{mL}$ e coletadas após 12 e 24 horas.

Decorrido o período determinado, células já destacadas da monocamada foram coletadas e separadas e em seguida, as células ainda aderidas foram lavadas com 1mL de PBS, removidas por tratamento com Tripsina-EDTA e misturadas às primeiras. As células foram então centrifugadas a $500 \times g$ por 5 minutos e cuidadosamente ressuspensas em $250\mu\text{L}$ de etanol a 70% gelado e armazenada a 4°C por 20 minutos.

Em seguida, as suspensões de células foram submetidas a tratamento para leitura em Citômetro de Fluxo, como se segue. A suspensão de células foi centrifugada a $1000 \times g$ por 5 minutos e o precipitado foi ressuspendido em $500\mu\text{L}$ de etanol a 30% e deixado por 2 minutos no gelo. Em seguida, a amostra foi centrifugada a $1000 \times g$ por 5 minutos e o precipitado foi ressuspendido em $500\mu\text{L}$ de PBS com 0,05% BSA, e deixado por 2 minutos no gelo. A amostra foi novamente centrifugada a $1000 \times g$ por 5 minutos e o precipitado foi ressuspendido em $200\mu\text{L}$ de Solução de Coloração (Iodeto de Propídeo $50\mu\text{g}/\text{mL}$ + RNaseA $40\mu\text{g}/\text{mL}$ diluídos em PBS com 0,05% de BSA). Logo depois as suspensões celulares foram submetidas à análise por citometria de fluxo.

Todos os ensaios de citometria de fluxo foram realizados no citômetro de fluxo FACScan Advantage (BD – Becton & Dickinson Company-EUA) e os dados obtidos foram analisados através do software FCS Express V2 (De Novo Software – 2002-EUA).

3.8. Análise da exposição de resíduos de fosfatidilserina por Anexina V conjugada com Rodamina

Células HeLa cultivadas sobre lamínulas de 24 milímetros em placas de 24 cavidades com MEM suplementado com 10% de SFB, foram mantidas em estufa de CO₂ a 37°C. Após atingirem semiconfluência, as monocamadas foram infectadas com o vírus OROV (M.O.I. = 10) e incubadas na estufa de CO₂ a 37°C por 12, 24, 36 e 48 horas. Como controle positivo foram usadas células tratadas com a droga actinomicina D a 0,25µg/mL e coletadas após 24 horas. Decorrido o período de infecção/tratamento, as lamínulas foram tratadas para o ensaio de Anexina V de acordo com o protocolo do fabricante do Kit Dual Apoptosis Assay (Biotium Inc.-EUA). Sucintamente, 5µL da solução Sulforhodamine 101-annexin-V foi aplicada sobre a lamínula e incubada a temperatura ambiente por 40 minutos. Foi também utilizado o corante de DNA DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride, Invitrogen-EUA) diluído 1:8000 em PBS. As lamínulas foram a seguir lavadas em PBS e montadas invertidas com Fluoromount-G em lâminas de vidro próprias para microscopia e analisadas em microscópio de fluorescência.

3.9. Ensaio simultâneo de TUNEL e imunofluorescência indireta para OROV em tecidos de animais infectados

Hamsters Sírios com 21 dias de vida foram infectados pela via sub-cutânea com 10^{5,75} de OROV e foram sacrificados após 12 dias de infecção (RODRIGUES, 2004). Após o sacrifício dos animais, seus órgãos foram retirados e inseridos em um bloco plástico apropriado contendo Tissue Tek O.C.T. Compound (Sakura-Japão) adequada ao congelamento dos tecidos. Em seguida este bloco foi mergulhado em um copo de Béquer contendo Acetona (Merck-Alemanha) esfriada com gelo seco, de modo a congelar o tecido de maneira rápida e eficiente. Em seguida, cortes dos tecidos foram obtidos em criostato, em cortes de 5 µm, que foram colocados sobre lâminas de vidro. Em seguida, as lâminas contendo os cortes foram deixadas por 30 minutos em câmara de vácuo, seguido de 30

minutos em PBS sob leve agitação. O passo seguinte foi fixar o tecido com paraformaldeído a 2% por 30 minutos, seguido de duas lavagens de três minutos em PBS, sob leve agitação.

As lâminas foram incubadas em solução de permeabilização (0,3% de Triton X-100 em PBS) por 2 minutos em gelo e em seguida lavadas por três minutos em PBS sob leve agitação. Depois o material foi embebido em solução 0,1M de glicina em PBS por 10 minutos, lavado em PBS com 1% BSA por 30 minutos e incubado com o anticorpo primário MIAF anti-OROV na diluição de 1:400 em PBS com 1% de BSA, por uma hora em câmara úmida a 37°C.

Depois da incubação com anticorpos primários, as lâminas foram submetidas a cinco lavagens de 3 minutos em PBS, sob leve agitação. Em seguida as lâminas foram bloqueadas com soro de jumento diluído 1:300 por 15 minutos, em ambiente úmido e escuro, a 37°C e submetidas a três lavagens, de três minutos cada, em PBS, sob leve agitação. A seguir, as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário diluído 1:300, por 30 minutos, em câmara úmida, em estufa a 37°C. O anticorpo secundário usado foi de jumento anti-camundongo conjugado com Alexa 488 (Molecular Probes-EUA). Em seguida, as lâminas foram submetidas a oito lavagens de três minutos cada, em PBS sob leve agitação, e submetidas ao procedimento de marcação por TUNEL pelo KIT *In Situ* Cell Death Detection, TMR Red (Roche-Suíça), de acordo com as especificações do fabricante. Após a marcação pelo ensaio de TUNEL, os cortes foram lavados em PBS, montados sob lamínulas com Fluoromount-G e imediatamente analisadas em microscópio de fluorescência.

Os procedimentos adotados para trabalho com animais neste projeto foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CETEA) da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, em reunião de 25 de abril de 2005 (protocolo número 031/2005).

3.10. Ensaio de atividade da caspase 3 por citometria de fluxo

Monocamadas de células HeLa infectadas com OROV, não infectadas (controle negativo) e tratadas com actinomicina D a 0,25µg/mL (controle positivo) foram coletadas mecanicamente nos tempos 12, 24, 36 e 48 horas após a infecção, através de raspagem com “cell scraper” adequado. Em seguida elas foram lavadas, ressuspensas em PBS na concentração de 10⁶ células/mL e a esta suspensão foi adicionado o substrato fluorogênico de caspase 3 (Z-Asp-Glu-Val-Asp)₂-rodamina 110-bisamida (Calbiochem-EUA) na concentração final de 50 µM. Em seguida, as células foram incubadas em banho-maria, a

37°C, por 10 minutos, ao abrigo da luz. Ao término desse período, as células foram lavadas com PBS para remover excesso de substrato e a fluorescência foi avaliada por citometria de fluxo usando o aparelho FACScan Advantage (BD – Becton & Dickinson Company-EUA). Os dados obtidos foram analisados através do software FCS Express V2 (De Novo Software – 2002-EUA).

3.11. Ensaio de avaliação de alteração no potencial de membrana mitocondrial

Para o ensaio de avaliação de alteração do potencial de membrana mitocondrial foi utilizado o corante JC-1 Mitoprobe (Molecular Probes/Invitrogen-EUA), de acordo com as especificações do fabricante. Para isso, monocamadas de células HeLa infectadas com OROV, não infectadas (controle negativo) e tratadas com actinomicina D a 0,25µg/mL (controle positivo) foram coletadas em 12, 24, 36 e 48 horas, através de raspagem com “cell scraper” adequado, e lavadas com PBS. Essas células foram então ressuspensas na concentração aproximada de 10^6 células/mL e incubadas com o corante JC-1 na concentração de 10µg/mL, por 10 minutos a 37°C, ao abrigo da luz. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e a fluorescência foi analisada por citometria de fluxo no aparelho FACScan Advantage (BD – Becton & Dickinson Company-EUA). Os dados obtidos foram analisados através do software FCS Express V2 (De Novo Software – 2002-EUA).

3.12. Obtenção de extratos protéicos de culturas celulares

3.12.1. Extrato bruto total de proteínas

Monocamadas de células HeLa infectadas com OROV, não infectadas (controle negativo) e tratadas com actinomicina D a 0,25µg/mL (controle positivo) foram coletadas através de raspagem nos tempos 12, 24, 36 e 48 horas e tratadas para a obtenção do extrato bruto de proteínas. Para tal, as células foram lavadas com PBS e ressuspensas em solução tampão de lise que consiste de: Tris-HCl 25 mM pH 7.5; PMSF 0,1 mM (Sigma Aldrich-EUA); EDTA 0,5 mM; KCl 10 mM (Synth-Brasil); MgCl₂ 5 mM (Synth-Brasil); DTT 1 mM (Sigma Aldrich-EUA); glicerol 5% (Merck-Alemanha); Aprotinina 1mM (Sigma Aldrich-EUA), Leupeptina 5mM (Sigma Aldrich-EUA). Este material foi lisado com três pulsos de cinco segundos de ultrasom em gelo, e centrifugado a 15.000×g por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi estocado em freezer a -70°C para ser utilizado nos ensaios de “western blot”.

3.12.2. Fracionamento celular: Obtenção de proteínas das frações citoplasmática (C) e de membranas pesadas enriquecida de mitocôndria (HM)

Monocamadas de células HeLa infectadas por OROV, não infectadas (controle negativo) e tratadas com actinomicina D a 0,25µg/mL (controle positivo), foram lavadas em PBS e coletadas por raspagem em solução tampão isotônica gelada – solução MB (manitol 210 mM; sucrose 70 mM; EDTA 1 mM; HEPES 10 mM pH 7.5) (Sigma Aldrich-EUA), suplementado com mistura de inibidores de proteases (PMSF 0,1 mM; Aprotinina 1mM, Leupeptina 5mM), para isolamento de mitocôndrias. As células contidas nessa solução foram rompidas com o auxílio de uma agulha de calibre 25G1 (BD-Becton, Dickinson Company-EUA), em seringa de 5mL (BD-Becton, Dickinson Company-EUA) e, posteriormente, transferidas para tubo de microcentrífuga (Eppendorf-Alemanha) e centrifugadas a 500xg, por 5 minutos, a 4°C. para eliminação de núcleos e células não-lisadas. O sobrenadante resultante foi novamente centrifugado a 10.000xg por 30 minutos a 4°C, para a obtenção de um precipitado de membranas pesadas (HM) enriquecido de mitocôndrias. Esse precipitado foi ressuspenso em solução MB suplementada com 1% de Triton X-100. O sobrenadante desta centrifugação foi coletado e centrifugado a 100.000xg por 1 h a 4°C em tubo de ultracentrífuga (Beckman Coulter-EUA), obtendo-se assim um precipitado de membranas leves (não analisado) e uma fração solúvel final citoplasmática (C) que foi posteriormente analisada por ensaio de “western blot” junto com a fração HM para detecção de citocromo c e proteína Hsp70 de mitocôndria.

3.13. Dosagem de proteínas

A concentração de proteínas extraídas dos materiais foi determinada utilizando o kit de dosagem de proteínas “BCA Protein Assay” (Pierce-EUA), conforme descrito no manual do produto.

3.14. “Western blots”

Os “western blots” foram realizados a partir de extratos protéicos de células HeLa infectadas com OROV, células não infectadas (controle negativo) e células tratadas com actinomicina D a 0,25µg/mL (controle positivo), obtidos conforme acima descrito. Esse material foi separado por eletroforese em gel de poliacrilamida (Sigma Aldrich-EUA) em

condições desnaturantes (SDS-PAGE) a 200 volts, utilizando-se o sistema Hoefer Mighty Small SE 245 dual Gel Caster (Amersham Pharmacia/GE Healthcare-Inglaterra). Terminada a corrida em SDS PAGE, as bandas protéicas obtidas foram transferidas para membranas de Nitrocelulose Protran de 0,2 μ M (Whatman/Schleicher & Schuell Inc./GE Healthcare-Inglaterra) utilizando-se o sistema Hoefer TE 22 (Amersham Pharmacia/GE Healthcare-Inglaterra). A eletrotransferência foi realizada em solução tampão apropriada (Tris-HCl 25 mM pH 8,3, glicina 192 mM e 20% de metanol) em uma corrida a 150 mA, por 20 horas em câmara fria. A seguir a membrana de nitrocelulose foi tratada com solução de bloqueio com Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, leite desnatado a 5%, Tween 20 a 0,3 % (Sigma Aldrich-EUA, Molico/Nestlé-Brasil e Argos Organic-EUA, respectivamente) e incubada até o dia seguinte, quando então foi lavada em solução tampão Tris-HCl 10 mM, pH 7,5 (tampão de lavagem).

Após a lavagem, a membrana foi incubada por 30 minutos com solução tampão de “western blot” (Tris-HCl 50 mM pH 7,5, leite desnatado a 5%, NaCl 150 mM, Tween-20 a 0,1%) e, em seguida, foi adicionado o anticorpo primário específico contra cada molécula a ser analisada, dependente do experimento (ver Tabela 3), e incubado por aproximadamente 18 horas em câmara fria (ver tabela abaixo). A membrana foi mais uma vez lavada em solução tampão de lavagem e incubada em tampão de western blot por 30 minutos e, logo depois, foi incubada com anticorpo secundário específico conjugado com peroxidase por 90 minutos em temperatura ambiente. Decorrido esse período, a membrana de nitrocelulose foi novamente lavada em solução tampão de lavagem e a reação antígeno-anticorpo foi revelada em Tris-HCl 0,05 M, pH 7,5 (Sigma Aldrich-EUA); 0,03 % de DAB (3,3'-diaminobenzidine, Sigma Aldrich-EUA) e 0,06 % de H₂O₂ (Merck-Alemanha). As diluições, tempos e anticorpos secundários utilizados em cada experimento estão listados na tabela 3 abaixo:

Tabela 3: Anticorpos utilizados nos ensaios de “western blot”.

Anticorpo primário	Diluição	Fabricante	Anticorpo secundário	Diluição	Fabricante
Mouse-Anti-Citocromo C	1:500	BD Pharmingen	Rabbit-Anti-Mouse-HRP	1:1000	Molecular Probes
Mouse-Anti-Caspase 9	1:200	BD Pharmingen	Rabbit-Anti-Mouse-HRP	1:1000	Molecular Probes
Mouse-Anti-HSP70 mitocondrial	1:500	Molecular Probes	Goat-Anti-Mouse-HRP	1:1000	Molecular Probes

3.15. Inativação de estoque de OROV por radiação ultravioleta

Um volume de 500 μ L do estoque de OROV P12.1 (volume suficiente para realizar vários experimentos posteriores) foram aplicados a uma cavidade de uma placa de seis cavidades, de modo que o conteúdo ficasse bem espalhado na superfície da mesma. Esta placa destampada foi colocada sobre gelo em um isopor aberto e exposta a luz ultravioleta germicida com comprimento de onda de 254nm a uma distância de aproximadamente 5cm da fonte (SHIH et al., 2008), pelos tempos de 3 e 5 horas. Como controle negativo foram utilizadas as mesmas condições de incubação pelo mesmo tempo sobre gelo, porém sem ligar a fonte de luz ultravioleta.

3.16. Ensaio de efeito de tempo de adição de cicloheximida sobre a replicação de OROV

Neste experimento foi utilizada uma placa de 24 cavidades contendo células HeLa que foram infectadas com o estoque de OROV P12.1 (M.O.I. = 10). A droga cicloheximida foi acrescentada em tempos diferentes (incluindo antes da infecção, concomitante a esta e em tempos diferentes após a mesma. A concentração de cicloheximida utilizada foi de 20 μ g/mL em MEM contendo 2% de SFB. Foram aplicados 250 μ L da droga de modo a cobrir toda a monocamada. Inicialmente, a droga foi adicionada à cultura 1 hora antes da infecção e a placa foi incubada por 1 h na estufa a 37°C. Em seguida, foi adicionado o estoque de vírus em todas as cavidades da placa (M.O.I = 10), diluído em meio MEM com 2% de SFB. Neste mesmo momento, foram adicionados 250 μ L da droga na cavidade correspondente ao experimento do tempo 0h (vírus adicionado junto com a droga). A placa foi deixada sob leve agitação na câmara fria por uma hora para ocorrer a adsorção das partículas virais à superfície das células e depois de transcorrido este tempo o meio de cultura de cada cavidade foi trocado por 250 μ L de meio fresco, exceto as cavidades dos tempos de -1h e 0h, que receberam meio contendo a droga). A seguir, a intervalos apropriados (30 minutos, 1 hora, 1 hora e 30min, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 20, 24, 30 e 34 horas pós-infecção) a placa foi retirada da estufa e a droga foi adicionada ao meio já existente de modo a atingir concentração adequada e a placa foi reincubada por 36 horas, quando os conteúdos de todas as cavidades foram coletados. Após 36 horas o sobrenadante de cada cavidade da placa foi coletado e armazenado até a titulação de OROV pelo método de TCID₅₀. Neste momento as células ainda aderidas também foram coletadas para análise da fragmentação de DNA (análise da população Sub-G1). Após coleta do sobrenadante, utilizou-se 200 μ L de Tripsina –EDTA para soltar as células ainda aderidas,

que foram adicionados àquelas contidas no sobrenadante. Essa suspensão celular foi centrifugada a $1000\times g$ por 10 minutos e os sobrenadantes foram armazenados em criotubos (Corning-EUA) em nitrogênio líquido para ensaio posterior de titulação viral. O precipitado obtido foi ressuspensionado em $250\mu\text{L}$ de etanol a 70% gelado e submetido ao protocolo de marcação com iodeto de propídeo para análise da população Sub-G1 de modo a determinar a porcentagem de fragmentação do DNA (ver protocolo em tópico acima).

3.17. Inibição de apoptose induzida por caspases: aplicação do inibidor de caspases Z-VAD-FMK

O peptídeo Z-VAD-FMK (Promega-EUA), um forte inibidor de pan-caspases, foi utilizado na concentração de $40\ \mu\text{M}$ (MARTIN et al., 2007). Para a realização deste experimento foi utilizada uma placa de 24 cavidades contendo células HeLa que foram infectadas com OROV (M.O.I. = 10). O peptídeo foi adicionado à cultura de células no mesmo momento da infecção viral. Para cada cavidade da placa contendo a monocamada de células HeLa foram adicionados $200\ \mu\text{L}$ de MEM suplementado com 2% de SFB contendo Z-VAD-FMK na concentração adequada. Algumas cavidades da placa foram deixadas apenas com meio de cultura MEM com 2% de SFB como controles. Foi utilizado também DMSO diluído 1:500 (Sigma Aldrich-EUA) como controle negativo, pois o inibidor de caspases vem diluído nesta substância.

As monocamadas de células foram, em seguida, infectadas com OROV diluído em MEM com 2% de SFB mais o inibidor z-VAD-FMK na mesma concentração, seguido imediatamente por incubação em estufa de CO_2 a 37°C . A placa foi deixada na estufa por 36 horas e depois coletada para determinação do título viral e da porcentagem de células com fragmentação do DNA. Primeiramente foi coletado o sobrenadante contendo células soltas, as quais foram posteriormente misturadas às ainda aderidas, removidas por tratamento com $200\ \mu\text{L}$ de Tripsina-EDTA. Estas células removidas com tripsina foram coletadas e adicionadas às contidas no sobrenadante e a seguir centrifugadas a $1000\times g$ por 10 minutos. Os sobrenadantes foram armazenados em nitrogênio líquido para serem utilizados para se realizar ensaios de titulação viral. Em seguida o precipitado obtido foi ressuspensionado em $250\mu\text{L}$ de etanol a 70% gelado e submetido ao protocolo de marcação com iodeto de propídeo para análise da população sub-G1, de modo a determinar a porcentagem de células com fragmentação do DNA.

3.18. Clonagem e expressão da proteína não estrutural do segmento menor de Oropouche (OROV NSs)

O método escolhido para a clonagem e expressão da proteína não estrutural do menor segmento de RNA genômico de OROV (NSs) foi o sistema de clonagem e expressão Gateway (Invitrogen-EUA). Esse sistema baseia-se nas propriedades de recombinação sítio-específica do bacteriófago Lambda, as quais facilitam a integração deste vírus no cromossomo de seu hospedeiro natural, a *E. coli*. A tecnologia Gateway utiliza esses sítios de recombinações de Lambda (*att*) para promover a transferência de seqüências de DNA heterólogas flanqueadas pelos sítios recombinantes *att* entre diferentes vetores, dispensando, desta forma, a utilização de enzimas de restrição e reações de ligação, permitindo clonagens e sub-clonagens de fragmentos de DNA com maior facilidade e rapidez. Uma vez que o fragmento de interesse é inserido no chamado vetor de entrada, este inserto pode facilmente ser sub-clonado em diversos outros vetores disponíveis para expressão em mamíferos, células de insetos, bactérias e leveduras.

Para a utilização desse sistema de clonagem foi indispensável que o inserto a ser colocado no vetor de entrada tivesse como uma característica essencial a presença dos sítios de recombinação homóloga que são denominados *attB1* e *attB2*, complementares aos sítios *attP1* e *attP2* do vetor de clonagem. Por isso, foi necessária a construção de iniciadores (“primers”) para a amplificação do gene NSs que tivessem estas caudas específicas. Esses “primers” foram sintetizados conforme a orientação do fabricante e possuem as seguintes seqüências:

“Primer” NSs Forward: 5’-G GGG ACA AGT TTG TAC AAA AAA GCA GGC TTC GAA GGA GAT AGA ACC ATG GGG ATG TAC CAC AAC GGA CTA CAT C-3’.

“Primer” NSs Reverse: 5’-GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC CTA GGT ATC CTG ACA GAC GGT G-3’.

Observação: a região sublinhada corresponde à seqüência específica complementar à fita de RNA genômico de OROV. A região sem o grifo corresponde à seqüência do “primer” referente à cauda com sítio para recombinação homóloga.

Os iniciadores (“primers”) foram construídos para as regiões codificadoras da proteína NSs de OROV a partir de dados de seqüências disponíveis no GeneBank (SAEED et al., 2000) (NCBI BLAST Accession number AF164532.1).

3.18.1.Extração de ácidos nucleicos de tecidos infectados por OROV

Hamsters sírios com 21 dias de vida foram infectados por via subcutânea com $10^{5,75}$ de vírus Oropouche. Após 15 dias, em média, os animais manifestaram sinais da infecção, e então foram sacrificados e seus cérebros retirados em condições adequadas, com uso de material tratado com DEPC (Invitrogen-EUA), para evitar degradação de RNA. Em seguida, este material foi macerado em meio contendo Trizol (Invitrogen-EUA) com o auxílio de um homogenizador Power Gen 125 (Fisher Scientific-EUA) e em seguida submetido à extração de RNA total por Trizol, de acordo com as especificações do fabricante.

Para tanto, uma alíquota de 250 μ L de cada macerado de órgão foi adicionada a 750 μ L de Trizol e em seguida centrifugada a 12.000xg por 15 minutos para separação das frações ricas em RNA e fração com DNA e proteínas. A fração superior, rica em RNA, foi coletada e extraída pela adição de 500 μ L de clorofórmio (Merck-Alemanha), seguida de centrifugação a 12.000xg por 15 minutos, e em seguida precipitada pela adição de 500 μ L de isopropanol (Merk-Alemanha), seguido de centrifugação a 12.000xg por 15 minutos. O RNA precipitado em isopropanol foi lavado com álcool 70% (Merck-Alemanha), secado e ressuscitado em água tratada com DEPC (Invitrogen-EUA) com 0,1% de RNase OUT (Invitrogen-EUA). Depois de extraído, o RNA total foi quantificado em espectrofotômetro (Biofotômetro-Eppendorf-Alemanha) pela leitura no comprimento de onda de 260nm.

3.18.2.Reações de transcrição reversa e PCR

A partir de 300ng de RNA foi realizada a reação de transcrição reversa (RT) com 25pmol do “primer” NSs Reverse, que é complementar à porção terminal do gene de NSs do segmento menor do vírus Oropouche, iniciando a síntese da fita de cDNA. Para a reação de RT foram utilizados 10 μ l do RNA extraído, 100U da enzima transcriptase reversa de alta fidelidade IMPROM (Promega-EUA) e dNTPs a 10 mM (Invitrogen-EUA), incubadas por 1 hora a 37°C em termociclador (Eppendorf-Alemanha). Em seguida, a transcriptase reversa foi inativada a 95°C por 10 minutos.

Após a obtenção do cDNA, o material foi submetido a uma reação de PCR utilizando 1U da enzima Taq Polimerase High Fidelity (Invitrogen-EUA), acrescido de 5 μ L da solução tampão própria da enzima, 10mM de dNTP (Invitrogen-EUA), 50mM de MgCl₂ (Gibco BRL-EUA) e 10pmol de cada “primer”: NSs Forward e NSs Reverse. A reação foi incubada

em termociclador por 35 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão, a 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto e 72°C por 3 minutos, respectivamente.

3.18.3. Eletroforese e eluição do produto de PCR de NSs

Os produtos de PCR de tamanho esperado de 300 pares de base foram comprovados e analisados por eletroforese em gel de agarose 1.5%, corados com brometo de etídio. Em seguida, o fragmento de interesse foi eluído do gel utilizando o kit Concert Rapid Gel Extraction System (Gibco BRL-EUA) seguindo as especificações do fabricante.

3.18.4. Clonagem em vetor de entrada

O primeiro passo do processo de clonagem e expressão de proteínas heterólogas pelo Sistema Gateway (Invitrogen-EUA) consistiu em gerar um produto denominado clone de entrada. Este clone nada mais é do que o vetor pDONR201 do sistema Gateway (Figura 5) contendo como inserto o fragmento de PCR desejado, que no caso é o gene para NSs de OROV, amplificado anteriormente. Nesta construção, o fragmento de interesse fica flanqueado pelos sítios de recombinação homóloga, o qual permite que ele posteriormente seja retirado deste clone de entrada e transferido, também por recombinação homóloga, para outros vetores.

O produto de PCR do gene NSs de OROV eluído e purificado do gel de agarose foi clonado em vetor de entrada. Esse vetor (Figura 5) contém regiões *attP1* e *attP2* complementares às das caudas *attB1* e *attB2* do produto de PCR, que auxiliam na entrada do gene de interesse no plasmídeo. O produto de PCR de NSs foi adicionado ao vetor vazio pDONR201 (Invitrogen-EUA) através da enzima BP Clonase (Invitrogen-EUA) de acordo com as especificações do fabricante. 300ng do produto de PCR foram adicionados a 2µL do vetor pDONR201. Em seguida acrescentaram-se 4µL da enzima BP Clonase e 4µL de solução tampão específica (tampão BP – Invitrogen-EUA) em um volume final de 20µL. Essa reação foi incubada a 25°C por 1 hora. Deste modo, foi gerado um vetor de entrada contendo o fragmento de PCR de interesse denominado pDNOR201-NSs.

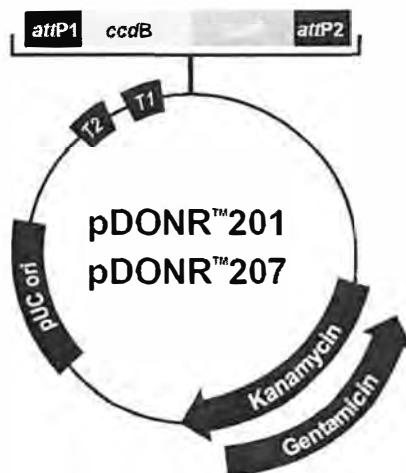


Figura 5: Mapa do vetor pDONR201 (Invitrogen-EUA). *attP1* e *attP2* são os respectivos sítios de recombinação homóloga complementares às caudas dos “primers” utilizados para amplificar o gene NSs.

3.18.5. Preparação de bactérias *E. coli* DH10-β eletrocompetentes

A preparação de *E. coli* DH10-β eletrocompetentes, utilizadas para a clonagem do vetor de entrada pDONR201, foi feita através do seguinte protocolo: uma alíquota da bactéria DH10-β foi semeada por 12 horas a 37°C em 5mL de meio de cultura LB (Gibco BRL-EUA). Posteriormente, 500μL dessa cultura foram semeados em 100mL de meio LB até atingir densidade óptica (OD₆₀₀) de 0.6, e a cultura resultante foi resfriada em gelo por 15 minutos e centrifugada a 5.000xg por 10 minutos. O precipitado resultante foi ressuscitado em 50mL de água MiliQ gelada e centrifugado a 5.000xg por 20 minutos a 4°C. Esse procedimento foi repetido três vezes. Na quarta e última vez, o precipitado foi homogeneizado e centrifugado em 50mL de glicerol 10% gelado (Invitrogen-EUA). Após a última centrifugação, o precipitado foi ressuscitado em 500μL de glicerol 10% gelado. O material resultante foi aliquotado em volumes de 50μL e estocado em freezer a -70°C. Essas bactérias foram usadas para transformação por eletroporação até uma semana depois de preparadas.

3.18.6. Transfecção de bactérias DH10-β competentes por eletroporação

Para a eletroporação das bactérias DH10-β eletrocompetentes com o vetor pDNOR201-NSs, foram adicionados 50μL de células eletrocompetentes a 2 μL do vetor, em cubetas de eletroporação de 2mm (Biorad-EUA). Esse material foi eletroporado em um eletroporador Biorad Gene Pulse (Biorad-EUA) nas seguintes condições: voltagem de 12,5 KV/cm, capacitância de 25μF e resistência de 200 Ω. O material eletroporado foi inoculado

em 1mL de meio SOC (Invitrogen-EUA) e incubado a 37°C por 1 hora. Em seguida o material foi centrifugado a 2.000xg por 2 minutos a 4°C. O precipitado resultante foi plaqueado em meio seletivo LB Agar (Gibco BRL-EUA) com 50µg/mL de kanamicina e a 37°C por 24 horas.

3.18.7.Extração Plasmidial, PCR e sequenciamento dos clones de entrada pDONR201-NSs

A extração plasmidial, PCR e sequenciamento foram realizadas para algumas colônias que cresceram após a eletroporação. As colônias escolhidas foram cultivadas por 12 horas em meio LB líquido com 50µg/mL de kanamicina. Em seguida esse material foi centrifugado a 2.000xg por 2 minutos e o precipitado resultante foi submetido a uma extração plasmidial por lise alcalina (“miniprep”).

Nesse procedimento, o precipitado de bactérias foi ressuscitado e incubado por 5 minutos em 200µL de solução tampão de lise (glicose a 50mM, Tris-HCl-pH 8.0 a 25mM, EDTA 10mM e lisozima a 4mg/mL). Após esse tempo, foi acrescentada a essa mistura 400µL de uma solução alcalina fresca (0,2N NaOH, 1% SDS). Essa solução foi, então, incubada em gelo por 5 minutos e foi adicionada a ela 300 µL de uma solução de acetato de amônio para a precipitação das proteínas, de RNA de alto peso molecular e do DNA cromossomal. Após centrifugação a 10.000xg por 3 minutos, o sobrenadante foi coletado e acrescido de 500µL de isopropanol. A precipitação do plasmídeo ocorreu após incubação por 10 minutos à temperatura ambiente e centrifugação a 12.000xg por 20 minutos. O precipitado resultante foi, então, lavado com etanol 70%, centrifugado e ressuscitado em 50µL de solução Tris-EDTA (Invitrogen-EUA). Em seguida os produtos dos “minipreps” foram quantificados por espectrofotometria.

Todos os clones de NSs no vetor pDONR201 que foram submetidos a extração plasmidial por lise alcalina tiveram o produto dessa extração confirmado por PCR e sequenciamento automático. As reações de PCR foram realizadas com os “primers” específicos para o gene NSs descritos acima, seguindo o mesmo protocolo, e também com um par de “primers” para uma região flanqueadora ao inserto denominados SeqLA e SeqLB, cujas seqüências estão presentes no manual do fabricante (SeqLA: 5'-TCG CGT TAA CGC TAG CAT GGA TCT C-3'; SeqLB: 5'-GTA ACA TCA GAG ATT TTG AGA CAC GGG A-3'). A temperatura de anelamento usada para a amplificação com os primers SeqLA e SeqLB foi de 55°C.

Aqueles clones que tiveram PCR positivo e do tamanho esperado (aproximadamente 300pb) foram seqüenciados com o objetivo de se verificar a integridade do inserto e o seu posicionamento dentro do vetor. Para tanto foram utilizados o BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems-EUA) e um seqüenciador automático de DNA (ABI Prism 377 DNA) utilizando os primers SeqLA e SeqLB. Essas reações de seqüenciamento foram montadas com 10pmol de um dos “primers”, 3 μ L de tampão, 1 μ L de BigDye e 300ng de plamídio. O ciclo utilizado no termociclador foi o seguinte: um passo de 95°C por 3 minutos seguido por 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C por 4 minutos.

3.18.8. Transferência do fragmento de interesse (NSs) do vetor de entrada pDONR201 para o vetor de expressão

Os clones pDONR201-NSs seqüenciados tiveram então seus insertos transferidos para vetores de expressão com o objetivo de se realizar a expressão desta proteína em células de mamíferos (células HeLa).

O vetor de expressão escolhido foi o pcDNA3.2-V5 (Invitrogen-EUA), também pertencente ao sistema Gateway, o qual apresenta uma “tag” do epítipo V5 localizada na posição C-terminal em relação ao inserto (Figura 6). Deste modo, a proteína sintetizada é conjugada a esse peptídeo de 14 aminoácidos denominado V5, o que é importante para se detectar a proteína em “western blot” e também imunofluorescência para saber se ela foi corretamente expressa.

Para transferir o inserto NSs do vetor de entrada (pDONR201) para o vetor de expressão (pcDNA3.2) foi realizada reação de recombinação homóloga mediada pela enzima LR Clonase do sistema Gateway (Invitrogen-EUA). A reação de transferência do inserto para o vetor de expressão foi realizada com 2 μ L do clone de entrada (aproximadamente 300ng), 1 μ L do vetor de destino (pcDNA3.2) e 2 μ L da enzima LR Clonase (Invitrogen-EUA) na presença da solução tampão específica da enzima Tampão LR (Invitrogen-EUA). Essa reação foi incubada a 4°C por 12 horas. O produto dessa reação foi utilizado para realizar a transformação de bactérias DH10- β por eletroporação, conforme descrito anteriormente, e a seleção dos clones positivos foi feita pelo crescimento em LB-Agar com 50 μ g/mL de ampicilina (Gibco BRL-EUA). As colônias resultantes foram crescidas em 5mL de meio LB, e foram submetidas à extração plasmidial por lise alcalina conforme descrito anteriormente. Para confirmação da clonagem, todos os clones foram submetidos à reação de

sequenciamento automático com “primers” específicos para o gene alvo (NSs). Após a confirmação dos clones através desse procedimento, os vetores de expressão foram denominados pcDNA3.2-NSs.

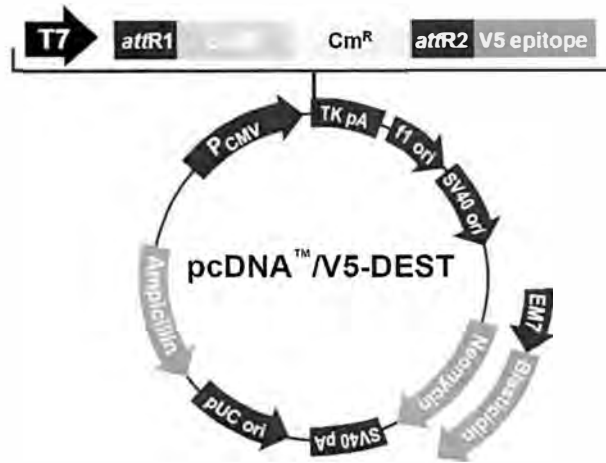


Figura 6: Mapa do vetor pcDNA3.2-V5 onde foi transferido o inserto de NSs. *attR1* e *attR2* são os respectivos sítios de recombinação homóloga complementares à região de recombinação homóloga *attL1* e *attL2* presente no vetor de entrada pDONR201-NSs. Pcmv é o promotor do vírus citomegalovírus, necessário para expressão em células eucarióticas.

3.18.9. Transfecção de células HeLa com vetor de expressão

Para realizar a transfecção de células HeLa com o vetor de expressão, foi efetuada eletroporação utilizando o aparelho Gene Pulser Xcell Electroporation System (Biorad-EUA). Para tal, foram utilizadas células HeLa mantidas em cultura com meio MEM com 10% de SFB, em frascos de 75cm². No momento da eletroporação elas foram tratadas com tripsina-EDTA e depois que se soltaram da garrafa, elas foram ressuspensas em 4mL de meio MEM sem soro no próprio frasco. Em seguida, 800µl de suspensão de células foram aplicados em cubetas de 4mm próprias para eletroporação (Biorad-EUA) e foram adicionados 30µg de vetor. As cubetas foram então mantidas em temperatura ambiente e levadas ao aparelho logo em seguida. As condições da eletroporação foram as seguintes: voltagem de 260V, capacitância de 850uF e resistência de 720Ohms.

Como controle positivo para certificar que a eletroporação ocorreu adequadamente foi utilizado o vetor peGFP, que expressa a proteína verde fluorescente (GFP). Ademais, foi utilizado o mesmo vetor pcDNA3.2 contendo o gene da cloranfenicol acetil transferase seguido da “tag” de V5, denominado (pcDNA3.2-GWCAT) (Invitrogen-EUA) como controle da expressão e detecção da proteína (Figura 7).

Foram realizadas eletroporações com os seguintes vetores e controle negativo:

1. células na presença do vetor controle pcDNA3.2-GWCAT.
2. células na presença do vetor pcDNA3.2-NSs.
3. células na presença do vetor eGFP (para mostrar que a eletroporação deu certo)
4. células eletroporadas somente com meio, sem adição de nenhum vetor.

Após a eletroporação, as células foram coletadas das cubetas e transferidas para uma placa de 24 cavidades. Depois de 12 horas o meio sem soro que estava sendo utilizado foi trocado por meio com 10% de soro. No tempo de 24 horas após a eletroporação as células foram analisadas quanto à presença de efeito citopático por microscopia óptica e em seguida foram coletadas e submetidas aos protocolos de imunofluorescência para detectar presença da proteína heteróloga conjugada com o epítipo V5, e análise de fragmentação de DNA por TUNEL e análise da população subG1 por FACS.

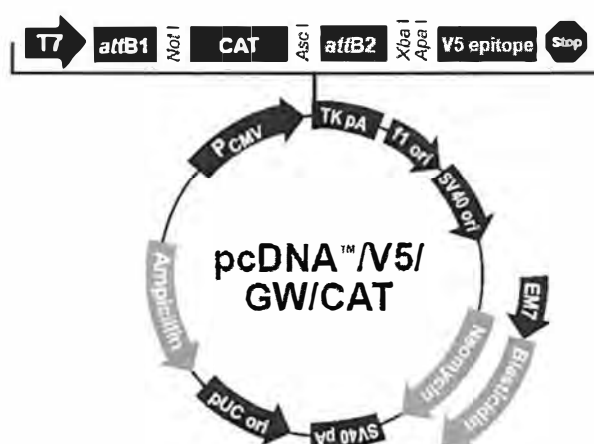


Figura 7: Mapa do vetor controle pcDNA3.2-GWCAT (Invitrogen-EUA).

3.18.10. Imunofluorescência indireta para detecção de proteína recombinante NSs-V5

Após a eletroporação de células HeLa com os vetores pcDNA3.2-NSs, pcDNA3.2-GWCAT e peGFP, estas células foram cultivadas sobre lamínulas de 24 milímetros de diâmetro em placas de 24 cavidades contendo meio MEM com 10% de SFB e incubadas em 5% de CO₂ a 37°C. Depois de 24 horas as lamínulas contendo as monocamadas de células HeLa foram imediatamente processadas por imunofluorescência.

Todos os passos a seguir foram realizados à temperatura ambiente. Inicialmente as células nas lamínulas foram fixadas em paraformaldeído a 2% (Sigma Aldrich-EUA) diluído em PBS, por 10 minutos, e em seguida, lavadas com PBS. Depois, as lamínulas foram incubadas em PBS contendo 0,1 M de Glicina (Vetec-Química Fina-Brasil) por 10 minutos.

Decorrido este período as lamínulas foram lavadas em PBS e permeabilizadas com 0,3% de Triton X-100 (Sigma Aldrich-EUA) em PBS por 15 minutos, a seguir lavadas em PBS e os sítios de ligação de anticorpos inespecíficos foram bloqueados através de incubação por 1 hora com 1% de soro-albumina bovina-BSA (Sigma Aldrich-EUA) e anticorpo IgG de jumento diluído a 1/1000 (Jackson Immunoresearch-EUA). Após nova lavagem em PBS, as células nas lamínulas foram incubadas por 1 hora em PBS contendo 1% de BSA adicionado do anticorpo primário mouse-anti V5 (Invitrogen-EUA) na diluição de 1:500. Em seguida foi realizada nova lavagem e incubação por 45 minutos com o anticorpo secundário diluído 1:500 em PBS, acrescido de 1% de BSA. Foi utilizado anticorpo de jumento anti-camundongo conjugado com Alexa 488 (Molecular Probes/Invitrogen-EUA). Por fim, as lamínulas foram lavadas em PBS, montadas invertidas com Fluoromount-G Slide Mounting Medium (Electron Microscopy Sciences-EUA) em lâminas de microscopia, seladas e estocadas a 4°C. Em seguida o material foi examinado e imagens foram adquiridas em microscópio de fluorescência (Olympus Modelo BX40-EUA).

4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. Resultados e Discussão

O primeiro passo do presente trabalho foi detectar se culturas de células HeLa infectadas pelo vírus Oropouche apresentavam morfologia típica de células em apoptose. O estoque de OROV ($10^{6.75}$ TCID₅₀/mL) inoculado em células HeLa com M.O.I. de 10, induziu depois de 36 horas o efeito citopático observado na figura 8.

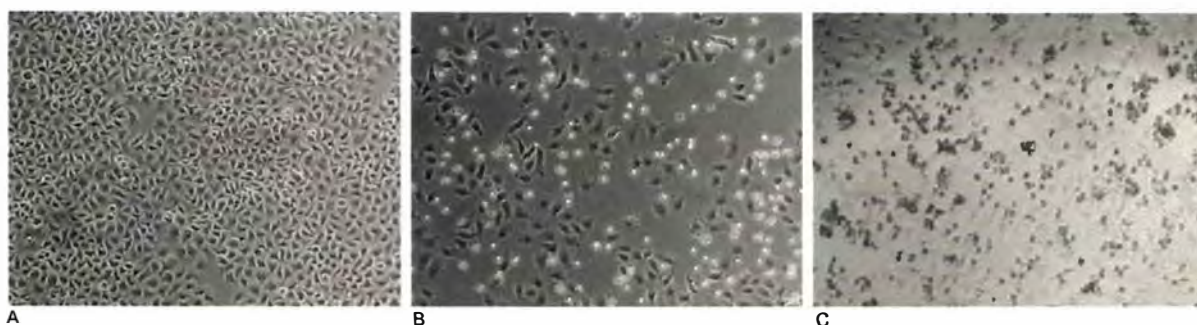


Figura 8: Monocamada de células HeLa observada em microscopia óptica (aumento de 10X).
 A) Cultura de células HeLa não infectadas observada após 48 horas de incubação em estufa a 37°C.
 B) Cultura de células HeLa infectadas com OROV (M.O.I. = 10) observada após 36 horas de infecção.
 C) Cultura de células HeLa infectadas com OROV (M.O.I. = 10) observada após 48 horas de infecção.

No tempo de 36 horas após a infecção com OROV (Figura 8B), foi possível observar muitas células com morfologia arredondada, indicando perda de contato com a superfície da garrafa de cultura e aproximadamente 70% das células soltas, enquanto que no tempo de 48 horas após a infecção praticamente todas as células se soltaram do substrato (Figura 8C). A análise da curva de replicação de OROV (Figura 2) mostra que o pico de produção de vírus se dá por volta de 30 horas após a infecção, o que coincide com o efeito observado aqui no tempo 36 horas. A presença de OROV nessas células foi confirmada por imunofluorescência utilizando MIAF (fluido ascítico imune de camundongo) anti-OROV (Figura 9).

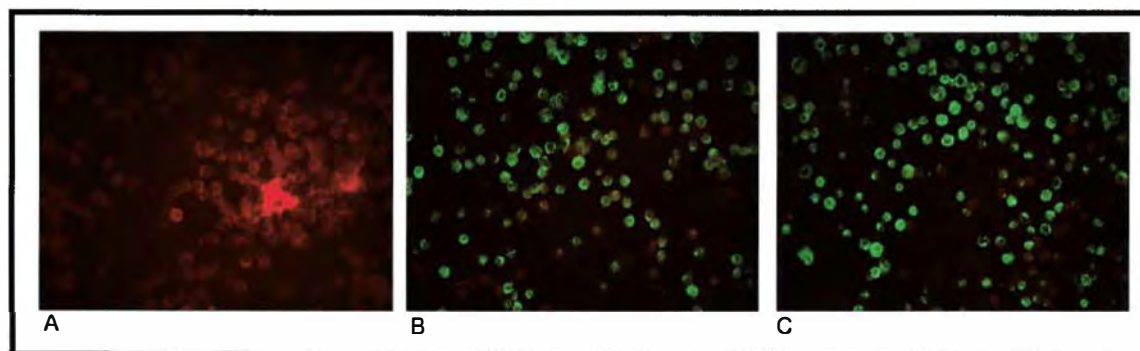


Figura 9: Imunofluorescência de células HeLa infectadas por OROV (M.O.I. = 10) analisadas 24 (B) e 36 horas (C) após a infecção. Foi utilizado como anticorpo secundário um anti-mouse conjugado com FITC. Células não infectadas (A) mostram apenas a coloração vermelha de fundo resultante do Azul de Evans (aumento: 10X).

O primeiro indício de que células HeLa infectadas com OROV entram em apoptose foi observado durante análise por microscopia de fluorescência de células tratadas com o intercalante de DNA iodeto de propídeo e o corante de DNA fluorescente Hoechst 33342. Este ensaio foi realizado com células ainda vivas, sem passar pelo processo de fixação (Figura 10). O intercalante de DNA iodeto de propídeo emite uma fluorescência vermelha (562-588nm) quando excitado e é excluído das células vivas, cujas membranas íntegras são a ele impermeáveis. Desta maneira, ele detecta células que já estão mortas (necrose). O corante de DNA Hoechst 33342 emite uma fluorescência azulada (461nm) e penetra na célula por um processo ativo, corando o núcleo de células viáveis ou em estágios não muito avançados de apoptose.

Observou-se que 36 horas após a infecção por OROV haviam células em necrose (núcleos vermelhos), algumas células intactas viáveis (núcleos azuis íntegros) e células com o núcleo se fragmentando em várias porções, o que indica formação de corpos apoptóticos, evento característico de células em estado avançado de apoptose (Figura 10A).

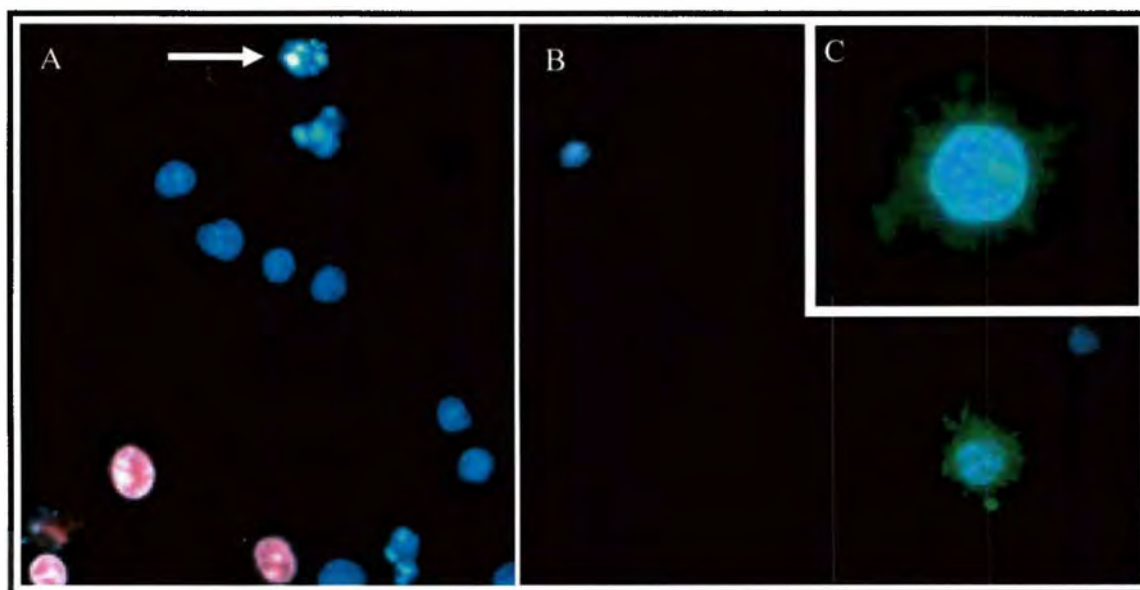


Figura 10: Células HeLa infectadas por OROV (M.O.I. = 10). A) Células coradas com Hoechst 33342 (azul) e iodeto de propídeo (vermelho) analisadas 36 horas após a infecção. A seta indica uma célula com núcleo fragmentado. B) Células marcadas com Hoechst 33342 e diacetato de fluoresceína (verde) analisadas 24 horas após infecção. C) Detalhe de uma célula com pronunciadas invaginações na membrana (“blebbing”). (aumento: 40X).

Foram observadas também a formação de projeções e invaginações (“blebbings”) na membrana da célula, 24 horas após a infecção por OROV (Figuras 10B e 10C), visualizadas através do uso de diacetato de fluoresceína, um substrato não fluorescente que é incorporado por células viáveis e a seguir hidrolisado por acetil esterases celulares, que o transformam num composto fluorescente verde retido no citoplasma da célula. Esta é uma característica

cujos surgimento é mais precoce durante o processo de apoptose do que a formação de corpos apoptóticos (Figura 10B e 10C).

A frequência de células cujos núcleos apresentaram morfologia característica de apoptose foi determinada através da contagem visual de 500 células infectadas por OROV e coradas com Hoechst 33342 nos tempo 12, 24 e 36 horas após a infecção. Esta frequência foi denominada de índice apoptótico. A porcentagem de células em apoptose obtida através dessa contagem foi de cerca de 5% em 24 h após a infecção, subindo para 30% após 36 horas (Figura 11).

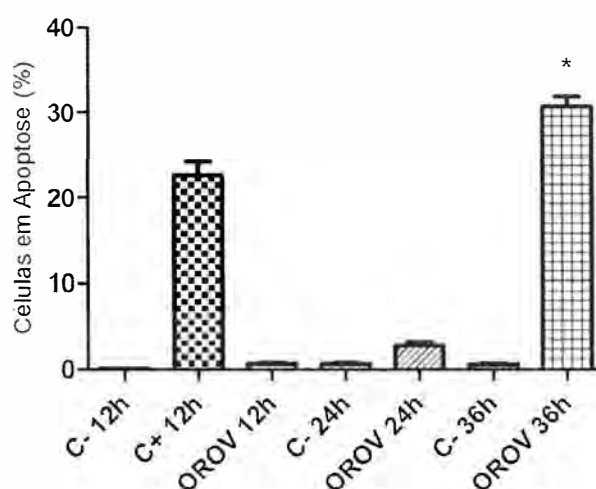


Figura 11: Determinação do Índice Apoptótico: porcentagem de células HeLa infectadas por OROV que apresentavam morfologia característica de célula apoptótica através da análise de coloração do núcleo por HOECHST33342 e analisadas em microscopia de fluorescência. Os controles negativos (C-) são células HeLa não infectadas e o controle positivo (C+) foi uma cultura de células HeLa tratada com 0,25µg/mL de actinomicina D. * indica diferença estatisticamente significativa entre OROV 36h e C-36h, de acordo com o teste T ($p=0,0017$).

Como controle positivo nos experimentos de análise de apoptose foi utilizada actinomicina D, que é um antibiótico isolado de *Streptomyces*, que se liga a porções ricas em GC do DNA nos complexos de iniciação da transcrição, impedindo a ligação da RNA polimerase e ativando apoptose. Nos experimentos seguintes esta droga foi utilizada como indutora de apoptose na concentração de 0,25 µg/mL. Esta concentração foi determinada através de ensaio de viabilidade celular em células HeLa tratadas com diferentes concentrações da droga (0; 0,25; 0,5; 1,0 e 2,0µg/mL) (Figura 12).

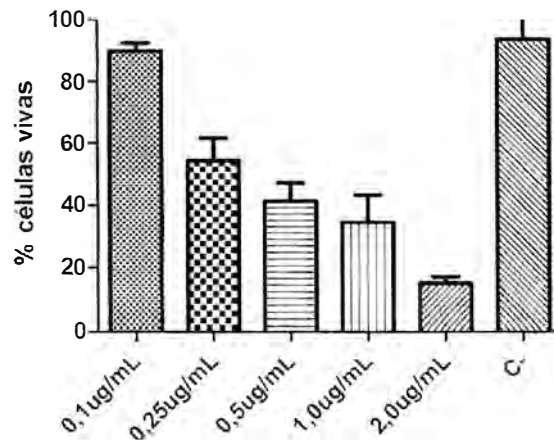


Figura 12: Ensaio de viabilidade celular em células HeLa tratadas com diferentes concentrações da droga actinomicina D (0,1; 0,25; 0,5; 1,0 e 2,0 µg/mL). No tempo de 24 horas após a adição da droga as células foram coletadas e a viabilidade foi determinada utilizando o corante azul de tripan e contagem das células viáveis realizada em câmara de Neubauer. C-: cultura de células HeLa sem adição da droga.

A concentração de actinomicina D escolhida para uso nos experimentos (0,25 µg/mL) manteve em torno de 60% das células viáveis (Figura 12), ao contrário de concentrações maiores, que provocam a morte de mais da metade das células (50% de células viáveis para 0,5 µg/mL, 40% para 1,0 µg/mL e 20% para 2,0 µg/mL). Esta concentração é adequada para a análise de alterações morfológicas e bioquímicas ocorridas em células em apoptose.

O Comitê de Nomenclatura em Morte Celular (NCCD), (KROEMER et al., 2009) considera a clivagem do DNA da célula entre os nucleossomos, denominada de fragmentação do DNA, um importante marcador de morte celular por apoptose, já que ela não é observada em outros tipos inespecíficos de morte celular, tal como a necrose. Esta fragmentação ocorre através da ação de uma DNase específica (CAD) que é ativada quando sua subunidade reguladora (ICAD) é clivada pela ação de caspases. Desta forma, este fenômeno pode ser considerado um importante marcador de morte celular por apoptose e tem sido utilizado em muitos estudos do processo de apoptose induzida por vírus (ROULSTON; MARCELLUS; BRANTON, 1999). O método mais empregado para visualizar a clivagem do DNA é a análise do DNA celular extraído e submetido à eletroforese em gel de agarose, sendo possível a observação de bandas de tamanhos variáveis, com diferenças de tamanhos constantes, correspondendo à organização dos nucleossomos, que recebe o nome de escada de DNA (DNA "ladder").

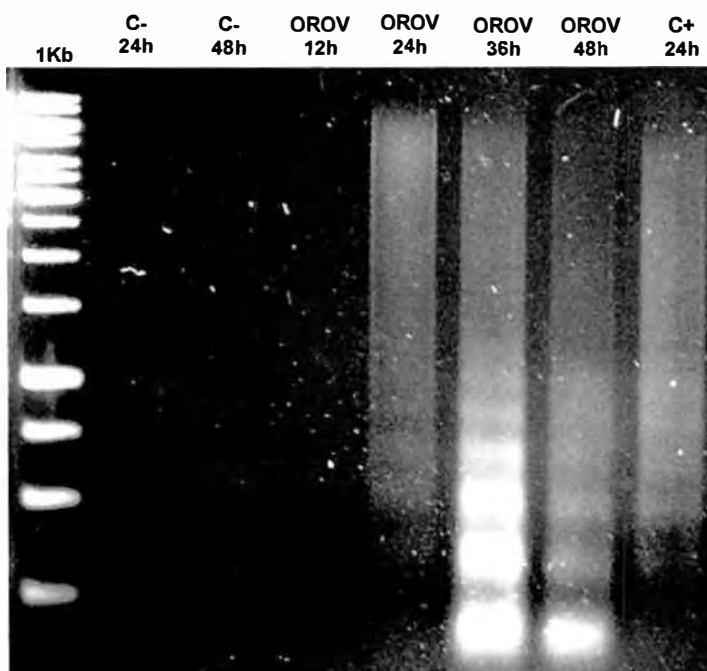


Figura 13: Eletroforese em gel de agarose 1,5% mostrando o padrão de bandas em escada (“ladder”) resultado da fragmentação do DNA de células HeLa infectadas pelo vírus Oropouche. Controle positivo (C+): células tratadas com actinomicina D (0,25 μ g/mL) analisadas após 24 horas de tratamento. Controle negativo (C-): células não infectadas submetidas à mesma análise. Na primeira coluna do gel foi aplicado o marcador de peso molecular GeneRuler 1Kb DNA Ladder (Fermentas Life Sciences-EUA).

Foi detectada fragmentação de DNA a partir de 24 horas após infecção, com intensidade máxima às 36 horas p.i. (Figura 13). Tanto no controle negativo (células HeLa não infectadas) quanto em células analisadas 12 horas após a infecção, não foi possível detectar fragmentação considerável, o que indica que nesse tempo o DNA não está fragmentado e as células ainda não estão em apoptose ou, ainda, que esta ocorreu em quantidade indetectável pelo método.

Como pode ser percebido na figura 13, foram escolhidos quatro tempos distintos para se estudar o processo de apoptose ao longo da replicação do vírus Oropouche: 12, 24, 36 e 48 horas após a infecção. A escolha desses tempos foi feita baseada na curva de replicação do vírus Oropouche em células HeLa usando M.O.I. = 10 (SILVA, 2008) (Figura 2). A análise da curva indica que começa a ocorrer liberação significativa de progênie viral a partir de 10 horas pós-infecção e que o pico de liberação de vírus se dá após 30 horas. Desta maneira, 12 horas pode ser considerado um tempo precoce no ciclo do vírus e 48 horas um tempo tardio, em que muitas células já se encontram rompidas e visivelmente mortas.

Para a detecção da fragmentação do DNA que ocorre durante o processo de apoptose em células infectadas por OROV, foi realizado também o ensaio de TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end-labeling), um método bastante difundido em estudos de análise de morte celular programada (KROEMER et al., 2009). Neste ensaio a enzima terminal transferase catalisa a adição de dUTPs marcados com rodamina em fragmentos de DNA que possuam extremidades 3'-OH livres. Tais extremidades são geradas quando o DNA é clivado por endonucleases durante o processo de apoptose. Nos tempos 12 e 36 horas após a infecção, lamínulas contendo monocamadas de células HeLa foram fixadas com paraformaldeído e em seguida submetidas ao ensaio de TUNEL e à imunofluorescência indireta para OROV. As células foram observadas por microscopia de fluorescência (Figura 14).

Enquanto em uma monocamada de células HeLa não infectadas o ensaio de TUNEL não mostra fragmentação nuclear significativa (Figura 14A), uma cultura tratada com 0,25µg/mL de actinomicina D e analisada após 24 horas, é possível ver muitas células TUNEL-positivas, indicando pronunciada fragmentação do DNA (Figura 14B). Em monocamadas examinadas 12 horas após a infecção por OROV, não foi possível detectar marcação evidente, mostrando padrão de fragmentação de DNA semelhante ao do controle negativo (Figura 14C). Tal observação confirma que às 12 horas pós-infecção ainda não é possível detectar fragmentação nuclear significativa. O ensaio de TUNEL mostrou que 36 horas após a infecção praticamente todas as células infectadas por OROV encontraram-se em avançada apoptose, conforme ficou evidente pela sobreposição das imagens da imunofluorescência anti-OROV (verde) com a do ensaio de TUNEL (vermelho) (Figura 14D-sobreposição). Não foi possível detectar fragmentação de DNA pelo método de TUNEL após 24 horas de infecção e a análise destas células por este método 48 horas após a infecção não foi eficiente, pois as células encontram-se já num estágio bastante tardio de morte celular, com morfologia bastante comprometida e poucas células estão ainda aderidas à monocamada.

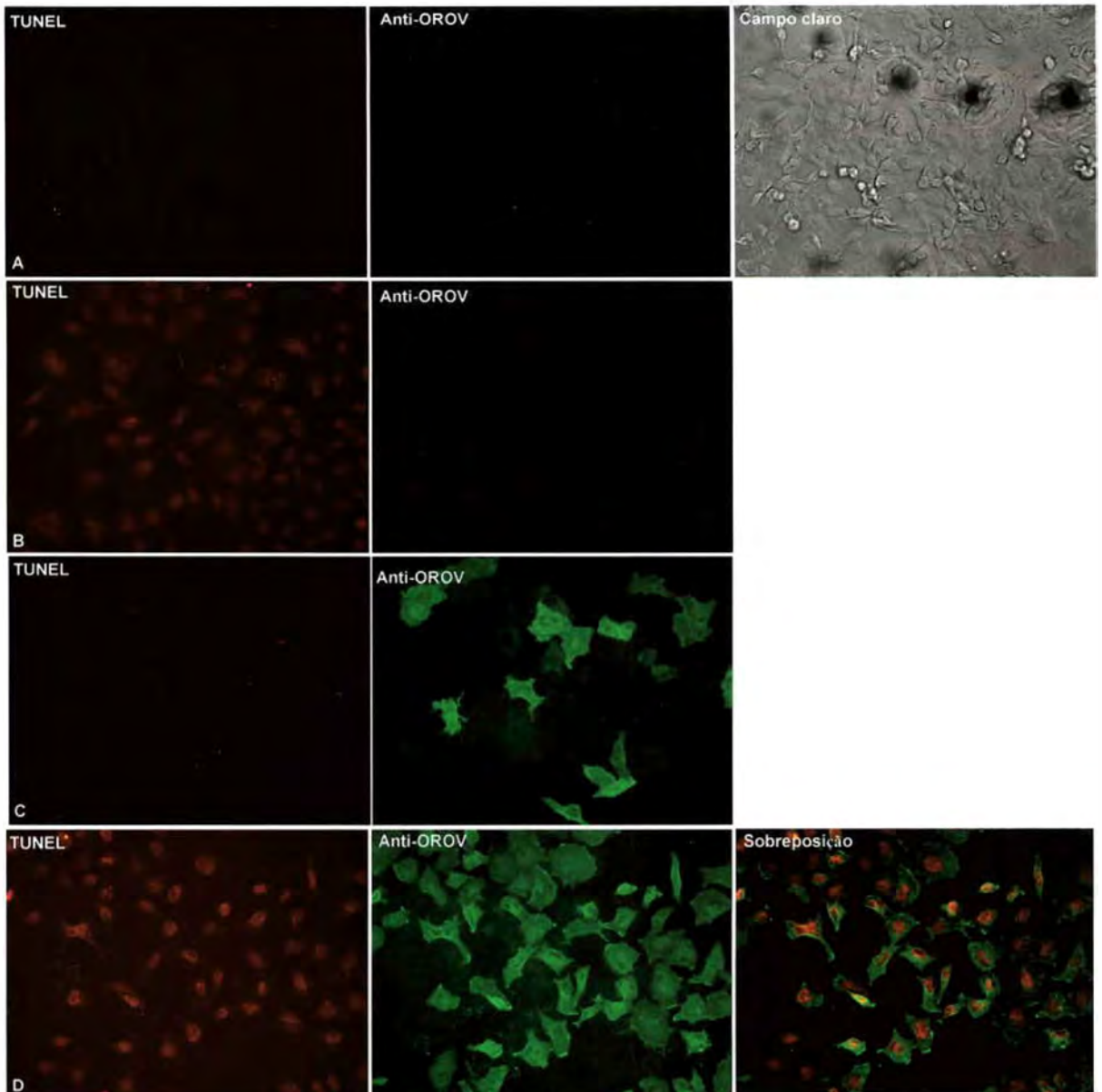


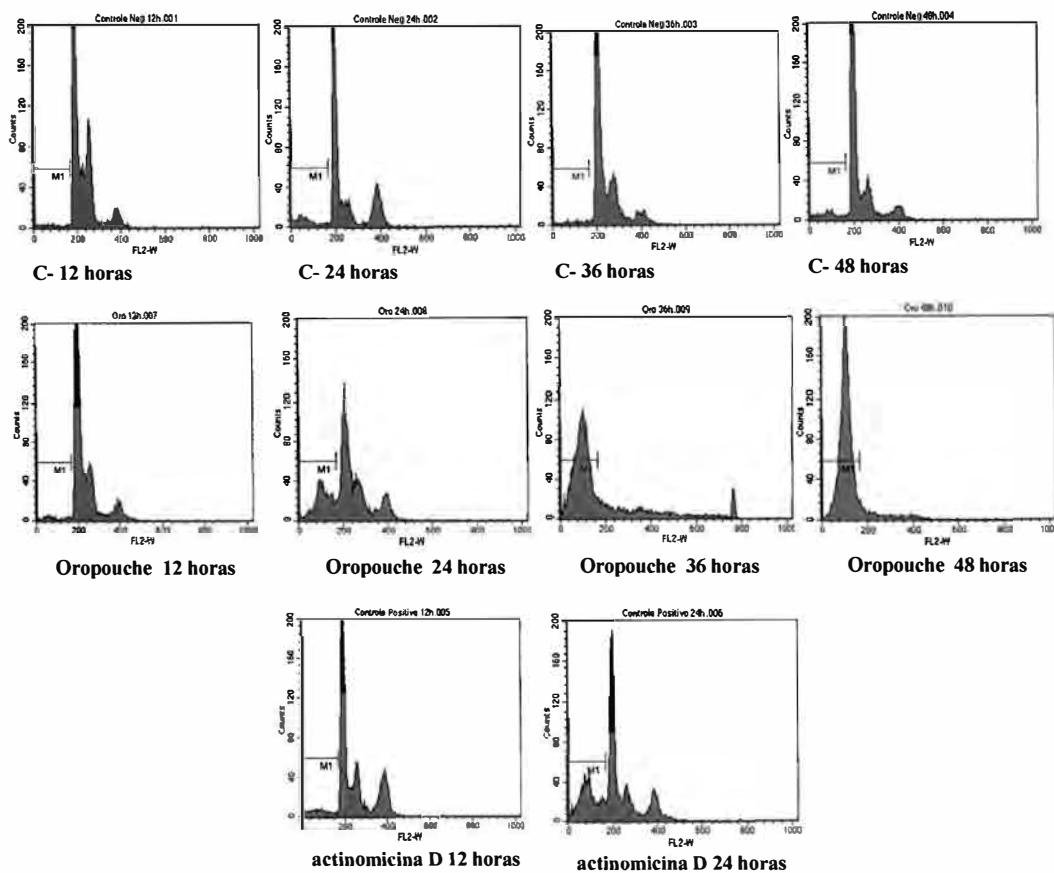
Figura 14: Monocamada de células HeLa infectadas por OROV submetidas ao ensaio de TUNEL (vermelho) e à imunofluorescência indireta contra o OROV (verde). Aumento de 40X. A) controle negativo 36 horas. B) Controle positivo 24 horas (actinomicina D 0,25µg/mL). C) OROV 12 horas. D) OROV 36 horas.

A fragmentação do DNA de células em apoptose pode ainda ser observada através de outro método bastante eficiente e rápido de ser realizado, que consiste na análise do ciclo celular com enfoque na população de células que estão com os núcleos fragmentados, denominada população Sub-G1 (NICOLETTI et al., 1991). Esta análise do ciclo celular é realizada por citometria de fluxo (FACS) através da marcação do DNA com iodeto de propídeo, o que revela três populações distintas de células denominadas de acordo com a fase em que se encontram dentro do ciclo (Figura 4). O eixo X do gráfico representa a intensidade da fluorescência do iodeto de propídeo lida pelo aparelho de FACS, que corresponde à

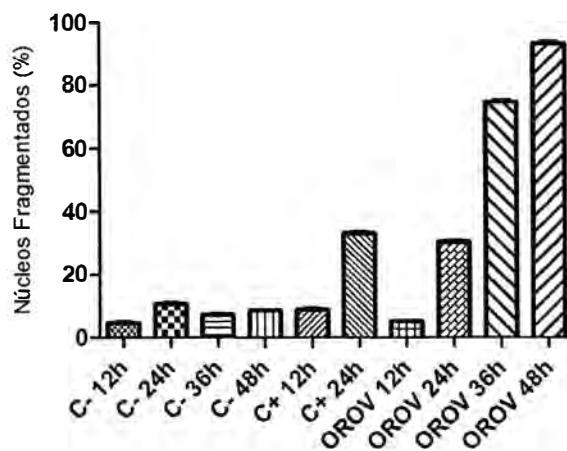
quantidade de material genético presente na célula. Por outro lado, o eixo Y representa o número de células contadas pelo aparelho. Em uma dada cultura de células, a população maior de núcleos é a que possui uma quantidade normal de material genético (n /população G0/G1), e é mostrada como um pico pronunciado. Núcleos com o dobro do material genético ($2n$ /população G2/S) são revelados através do método como um pico mais à direita no gráfico, com o dobro da marcação de iodeto de propídeo. E, por último, núcleos fragmentados, com uma quantidade de material genético menor que o normal (menor que n) são revelados por este método como um pico com menor intensidade de iodeto de propídeo, marcados no gráfico como a porção M1 (Figura 15). Esta população de células recebe o nome de população Sub-G1 (NICOLETTI et al., 1991).

Confirmando resultados dos outros ensaios, na análise da população Sub-G1 ficou evidente que, após 36 horas da infecção de células HeLa pelo vírus Oropouche, ocorre acentuado grau de fragmentação de DNA, indicando que ocorreu apoptose nestas células (~75% das células apresentam fragmentação do DNA) (Figura 15B). Novamente, a análise feita 12 horas após a infecção mostrou que não ocorreu fragmentação expressiva do DNA (~5% do total de células). No entanto, por este método foi possível verificar que 24 horas após a infecção, em torno de 30% das células tinham seus núcleos fragmentados (Figura 15B), o que não foi possível ver com o ensaio de TUNEL (Figura 14). No tempo de 48 horas, mais de 90% das células apresentaram núcleo fragmentado, e esta porcentagem corresponde a células que já se soltaram da monocamada, de acordo com observações feitas por microscopia.

Este resultado indica que a análise da população Sub-G1 através do uso de iodeto de propídeo com leitura por citometria de fluxo, produz resultados semelhantes aos obtidos pelos outros ensaios. Assim, é possível concluir que este é um método eficiente para se analisar a fragmentação do DNA de células em apoptose. Por ter um custo menor para se realizar se comparado ao ensaio de TUNEL e requerer menos tempo de realização do que a análise por eletroforese em gel de agarose (“ladder” de DNA), esta metodologia foi adotada nos experimentos posteriores.



A



B

Figura 15: Cultura de células HeLa infectadas por OROV analisada em diferentes tempos após a infecção. A) Análise da porcentagem de células com fragmentação do DNA por citometria de fluxo. Os controles negativos (C-) são culturas de células não infectadas. M1 representa a população de células sub-G1, com material genético fragmentado. B) Representação gráfica das porcentagens de população sub-G1 do painel A em três diferentes experimentos. C+) células tratadas com $0,25\mu\text{g/mL}$ de actinomicina D.

A análise das células infectadas pelo vírus Oropouche através dos três métodos usados revela que há um evidente aumento da quantidade de células com núcleos fragmentados conforme se aumenta o tempo após a infecção. Esta fragmentação, fruto da digestão do DNA por endonucleases ativadas especificamente durante a via de apoptose, é um marcador para detecção de células apoptóticas. A progênie de OROV começou a ser detectada a partir de 10 horas após a infecção (Figura 2), quando a fragmentação de DNA induzida pelo vírus ainda não estava evidente (Figuras 13, 14 e 15). Na análise feita 24 horas após a infecção, foi vista discreta fragmentação, conforme detectada por fragmentação de DNA (Figura 13) e análise da população sub-G1 (Figura 15). Neste tempo a quantidade de vírus que está sendo liberada da célula é grande (Figura 2), e começam a aparecer os primeiros sinais morfológicos de apoptose, incluindo a invaginação (“blebbing”) da membrana das células (Figura 10B e 10C). A produção de progênie viral atinge o máximo após 30-36 horas de infecção (Figura 2), coincidindo com intensa fragmentação do DNA (Figuras 13, 14 e 15), e importante efeito citopático (Figura 8B).

Esses resultados mostram que a liberação da progênie viral ocorre antes da morte celular por apoptose, o que indica um modo de replicação rápido e eficiente que se completa antes do desfecho final do processo de apoptose. É possível que, ao induzir apoptose nas células infectadas, os vírus possam escapar do sistema imune do hospedeiro, uma vez que não há indução de resposta inflamatória (KOYAMA et al., 2000). Outros vírus de RNA induzem apoptose e mesmo assim produzem progênie de modo eficiente, antes que seja finalizada a morte celular. Resultados semelhantes aos obtidos no presente estudo foram obtidos com o vírus influenza, com pico de produção de progênie ocorrendo em torno de 6 horas, enquanto que o pico de fragmentação de DNA ocorreu 8 horas após a infecção (KUROKAWA et al., 1999).

Durante a apoptose, uma característica marcante ocorre na membrana plasmática da célula: resíduos de fosfatidilserina, o fosfolípido aniônico mais abundante da membrana plasmática, comumente localizados na face interna da membrana, passam a ser expostos na face externa da mesma. A exposição desses resíduos carregados negativamente é um importante sinal para que os macrófagos reconheçam estas células e efetuem sua remoção por fagocitose antes que a integridade da membrana plasmática seja comprometida (HENGARTNER, 2000).

Um método eficiente para detectar estes resíduos de fosfatidilserina expostos na face externa da membrana da célula durante a apoptose é a utilização de Anexina V, uma proteína bastante conservada que tem alta afinidade por resíduos de fosfatidilserina. No presente

estudo foi utilizada Anexina V conjugada com rodamina presente no Kit Dual Apoptosis Assay (Biotium Inc.-EUA), seguida de visualização em microscopia de fluorescência (Figura 16).

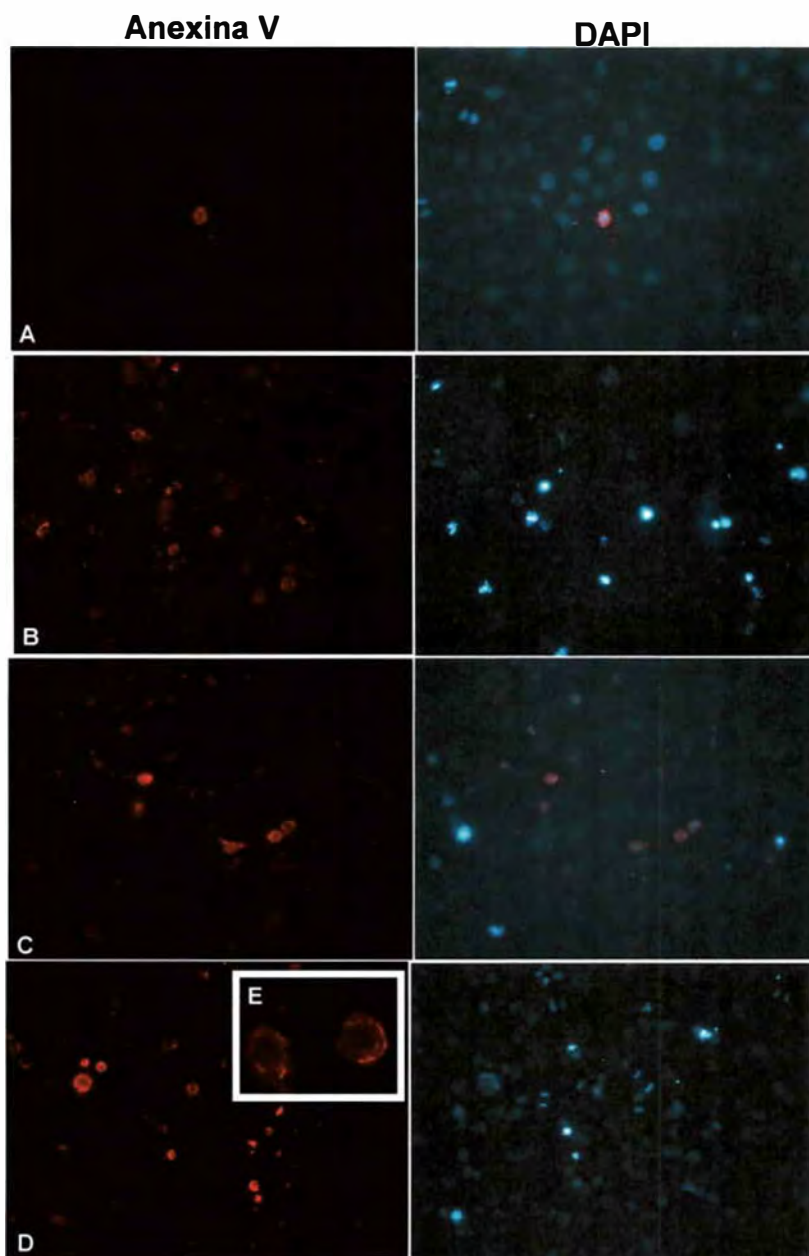


Figura 16: Culturas de células HeLa infectadas com OROV examinadas em diferentes tempos pós-infecção para presença de resíduos de fosfatidilserina, utilizando Anexina V conjugada com rodamina (Kit Dual Apoptosis Assay - Biotium Inc.). (Aumento de 40 ×). A) Cultura de células não infectadas analisadas após 24 horas. B) Cultura de células tratada com 0,25µg/mL de actinomicina D analisadas após 24 horas. C) Cultura de células infectadas por OROV analisadas após 12 horas. D) Cultura de células infectadas por OROV analisadas após 24 horas. E) aumento de 100X para ver detalhe da marcação na membrana da célula.

Observou-se que 12 horas após a infecção de células HeLa por OROV já ocorre migração de resíduos de fosfatidilserina para a face externa da membrana plasmática, conforme revelado pela ligação da Anexina V (vermelho) a esses resíduos (Figura 16). Em detalhe é possível ver um aumento de 100x destas células revelando a marcação na membrana da célula, que é onde os resíduos de fosfatidilserina se concentram (Figura 16E). Este ensaio não é quantitativo, mas a análise visual de células 24 horas após a infecção mostra um padrão de marcação para anexina V bastante semelhante ao tempo 12 horas. Após 36 e 48 horas não foi mais possível detectar esta marcação com eficiência, sendo a marcação semelhante a do controle negativo (dados não mostrados).

A exposição dos resíduos de fosfatidilserina é um fenômeno que ocorre no início do processo de apoptose (FADOK;CHIMINI, 2001), daí esta não ter sido detectada em células infectadas por OROV em tempos tardios como 36 e 48 horas após a infecção. A exposição destes resíduos funciona como um sinal para que as células em apoptose sejam reconhecidas por fagócitos que farão a sua remoção, evitando, assim, a indução de resposta inflamatória que poderia ocorrer após o rompimento da célula e o extravasamento de seu conteúdo citoplasmático (SAVILL;FADOK, 2000). Além disso, os resíduos expostos de fosfatidilserina inibem a ativação e maturação de células dendríticas e reduzem a resposta inflamatória induzida por macrófagos (HOFFMANN et al., 2005). Deste modo, em modelo *in vivo*, o processo de apoptose pode ser considerado importante para a disseminação da progênie viral para células vizinhas, com redução no acionamento da resposta inflamatória.

O posicionamento normal de fosfatidilserina voltada para a face interna da membrana plasmática é mantido ativamente devido à ação de proteínas denominadas translocases de aminofosfolídeos, que catalizam o transporte destes resíduos da face externa para a face interna da membrana (WILLIAMSON;SCHLEGEL, 1994). Durante o processo de apoptose a perda desta localização de fosfatidilserina é resultado tanto da inibição destas translocases como da ativação de proteínas exportadoras de fosfatidilserina (SOARES;KING;THORPE, 2008). Este fenômeno resultante no presente trabalho da infecção pelo vírus Oropouche, foi também relatado como evento precoce na cascata de apoptose induzida por outros vírus, tais como influenza tipo A (WATANABE et al., 2002), HIV-1 (BANKI et al., 1998), herpes simplex virus-1 GAUTIER;COPPEY;DURIEUX, 2003), vaccinia (MERCER;HELENIUS, 2008), e vírus da doença de Newcastle (RAVINDRA et al., 2009). Todavia, já foi demonstrado também que a exposição de resíduos de fosfatidilserina na face externa da membrana plasmática pode ocorrer como consequência indireta da replicação do vírus na célula (SOARES;KING;THORPE, 2008). Durante a replicação viral pode ocorrer aumento na

concentração intracelular de Ca^{2+} , o qual provoca a externalização de fosfatidilserina pela ativação direta de proteínas exportadoras de fosfatidilserina e inibição de translocases, responsáveis por transferir esses resíduos para a face interna da membrana (SOARES;KING;THORPE, 2008). Portanto, tal fato poderia estar ocorrendo na infecção por OROV em células HeLa. No entanto, o presente estudo mostra que este fenômeno está associado a outras características importantes e específicas de células em apoptose, tais como a fragmentação do DNA, a invaginação da membrana celular (“blebbing”) e a formação de corpos apoptóticos, o que diminui a possibilidade dessa exposição dos resíduos de fosfatidilserina ser causada como consequência indireta da replicação do vírus.

Durante a apoptose uma importante classe de moléculas é responsável pela ativação da cascata que levam às modificações bioquímicas e morfológicas características de células apoptóticas. Essas moléculas são proteases específicas ativadas durante a via de apoptose, denominadas caspases. Uma das caspases mais importantes, e que encontra-se ativada na maior parte dos processos de apoptose em mamíferos é a caspase 3, uma caspase efetora final, que por este motivo é um importante marcador de apoptose (HENGARTNER, 2000). Uma maneira de se determinar se uma cultura de células está em apoptose é detectar a ação de caspase 3 pela utilização de substratos específicos que se tornam fluorescentes quando clivados especificamente por esta caspase. Este é o caso do substrato (Z-Asp-Glu-Val-Asp)-2-rodamina 110-bisamida (Calbiochem), que após a clivagem por caspase 3 se torna fluorescente e pode ser detectado por citometria de fluxo.

No presente estudo foi verificado que uma cultura de células HeLa, infectada com vírus Oropouche (M.O.I. = 10), apresenta ativação de caspase 3 em aproximadamente 25% das células após 12 horas de infecção, 98% depois de 24 horas e em torno de 70% após 36 horas (Figura 17). Este experimento demonstra que a ativação de caspase 3 já é observada após 12 horas de infecção, sendo que o pico máximo de ativação desta molécula se dá após 24 horas. É interessante notar que no tempo de 48 horas a ativação de caspase 3 não foi detectada em nenhuma das três repetições do experimento, o que pode ter ocorrido devido a esse ser um tempo já avançado no processo de apoptose, um tanto tardio em relação à ativação de caspase 3. Como controle positivo foi novamente utilizada a droga actinomicina D na concentração de 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

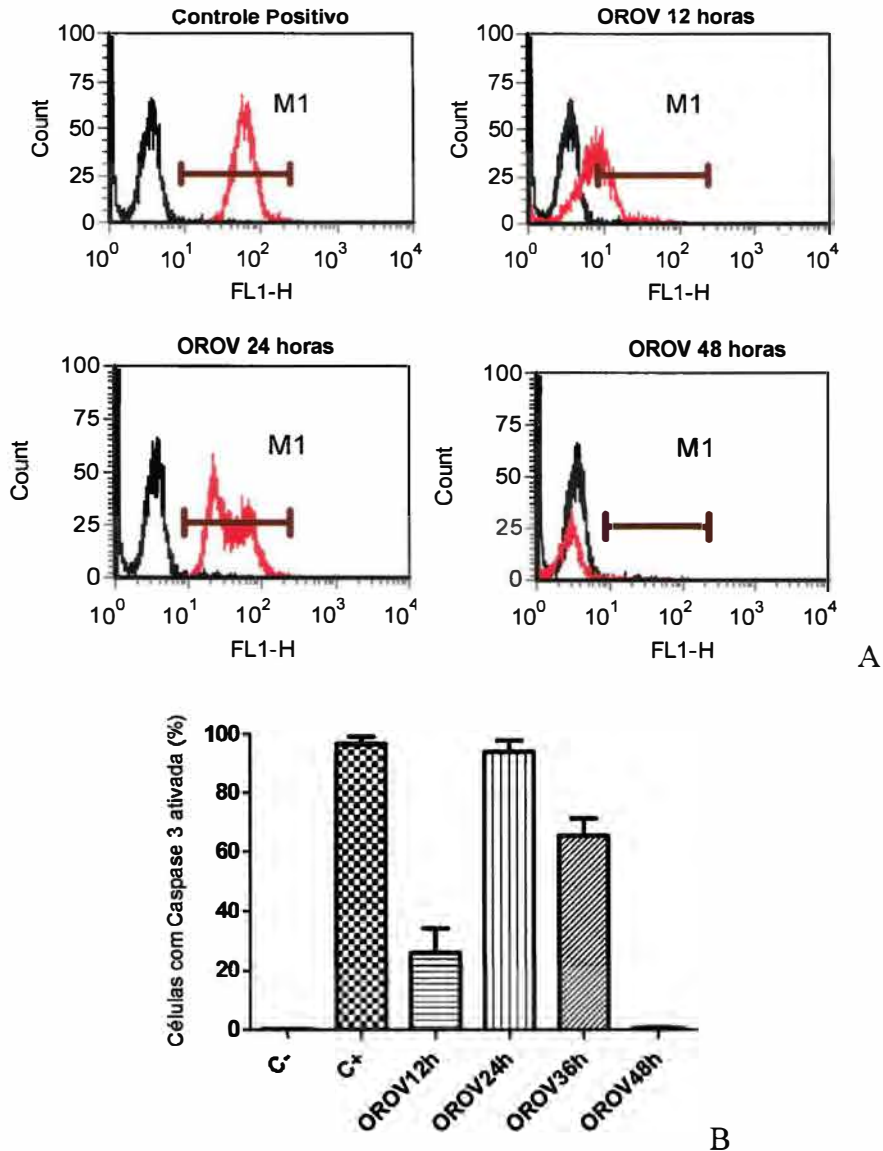


Figura 17: Ativação de caspase 3 detectada por citometria de fluxo utilizando o substrato fluorogênico específico para caspase 3 (Z-Asp-Glu-Val-Asp)₂-rodamina 110-bisamida (Calbiochem). A) A linha preta se refere ao controle negativo (somente células), e a linha vermelha se refere ao controle positivo ou tratamento com o vírus (controle positivo = actinomicina D 0,25µg/mL). O eixo X do gráfico representa a intensidade da fluorescência lida pelo aparelho de FACS, que corresponde à quantidade de substrato clivado pela caspase 3, desta forma indicando indiretamente a atividade desta protease. O eixo Y representa a porcentagem de células contadas pelo aparelho. B) Gráfico com média e desvio padrão de três repetições do mesmo experimento.

Estudos realizados com outros vírus da família *Bunyaviridae* detectaram ativação de caspase 3 em tempos tão precoces quanto 12 horas após a infecção. A análise de apoptose induzida pelo vírus Punta Toro (*Bunyaviridae* – gênero *Phlebovirus*) em hepatócitos em cultura (células HepG2) revelou ainda uma acentuada ativação de caspase 3 em tempos tão tardios quanto 48 horas após a infecção (DING et al., 2005). É válido relatar que este vírus tem pico de produção de progênie em torno de 24 horas após a infecção de uma cultura de

células, o que é semelhante ao observado para o OROV. Foi mostrado também que os vírus Akabane e Aino (*Bunyaviridae*, gênero *Orthobunyavirus*), importantes arbovírus causadores de infecções em bovinos, induzem apoptose em cultura de células Vero com marcante ativação de caspase 3 em tempos como 72 horas após a infecção (LIM et al., 2005).

A demonstração de que caspase 3 encontra-se ativada em células infectadas pelo vírus Oropouche, enquanto que em células não infectadas ela se encontra inativa (Figura 17), mostra que ela está envolvida na apoptose causada por esse vírus. A caspase 3 está envolvida na proteólise de um grande número de proteínas celulares, resultando nas características de uma célula em apoptose. Uma destas proteínas é a ICAD (inhibitor of caspase activated DNase), que é uma proteína inibidora da enzima CAD (caspase activated DNase). Quando a caspase 3 cliva ICAD, a DNase se torna ativa e cliva o DNA nas regiões entre os nucleossomos, dando origem aos fragmentos de DNA que foram observados em células infectadas por OROV (Figuras 13, 14 e 15).

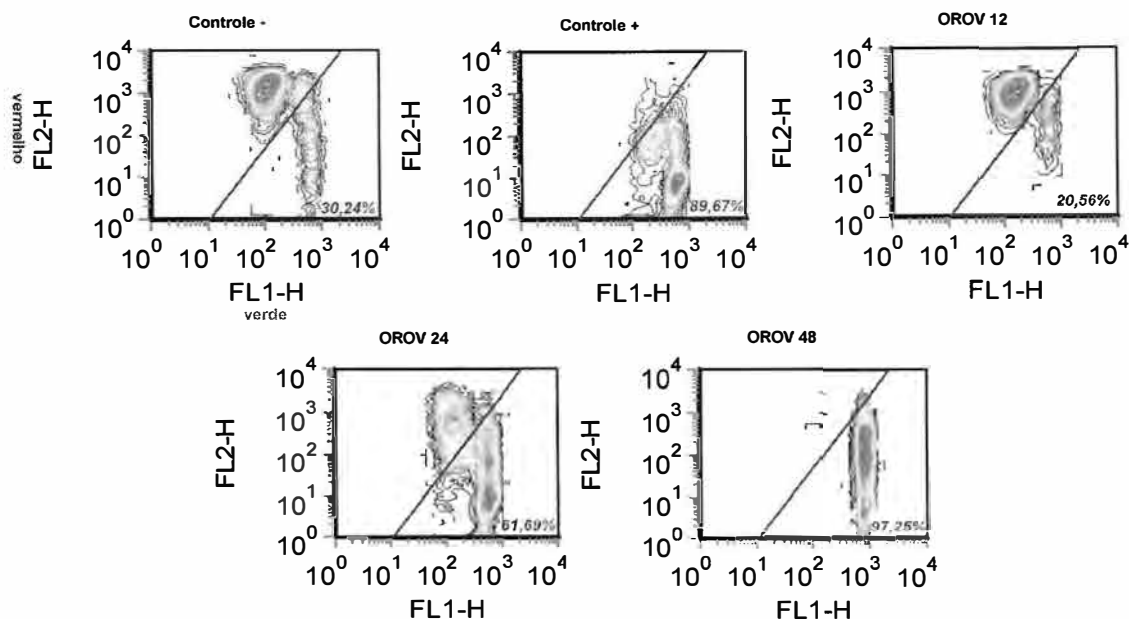
Sabe-se que a clivagem de pro-caspase 3, que dá origem à caspase 3 ativa, é fruto de uma cascata que pode se iniciar de duas maneiras distintas. A primeira envolve a clivagem da pró-caspase 8, resultante da ligação de um ligante de morte (por exemplo CD95L ou alguma proteína viral, como gp120 de HIV-1) a um receptor de morte na superfície celular (por exemplo CD95, ou FAS), uma via que é denominada de via extrínseca (HENGARTNER, 2000). A segunda via de ativação de caspase 3 envolve a mitocôndria e pode ser acionada por moléculas sinalizadoras de danos ao DNA, como p53, ou por proteínas pro-apoptóticas expressas ou ativadas durante a replicação viral, tais como as proteínas Bad e Bax da família Bcl-2, ou ainda diretamente por proteínas virais (EVERETT;MCFADDEN, 2001). Esta via é didaticamente denominada via intrínseca, porém ela pode também ser acionada pela via extrínseca em alguns casos via ligação da proteína Bid truncada na membrana da mitocôndria, devido à ação de caspase 8.

Portanto, para se caracterizar a via de morte celular induzida pelo vírus Oropouche, a via mitocondrial de ativação de apoptose foi investigada. Para tanto, foram analisadas as modificações estruturais que ocorrem nesta organela durante a apoptose. Uma importante modificação na estrutura da mitocôndria é o colapso do gradiente eletroquímico de sua membrana, o que provoca uma alteração no potencial de membrana desta organela. É possível detectar esta despolarização da membrana da mitocôndria em culturas de células em apoptose através do uso de corantes catiônicos que se ligam à membrana da organela e que emitem um padrão de fluorescência dependente de seu potencial. O corante JC-1 Mitoprobe (Molecular Probes/Invitrogen-EUA) foi utilizado no presente trabalho. A carga negativa estabelecida pelo

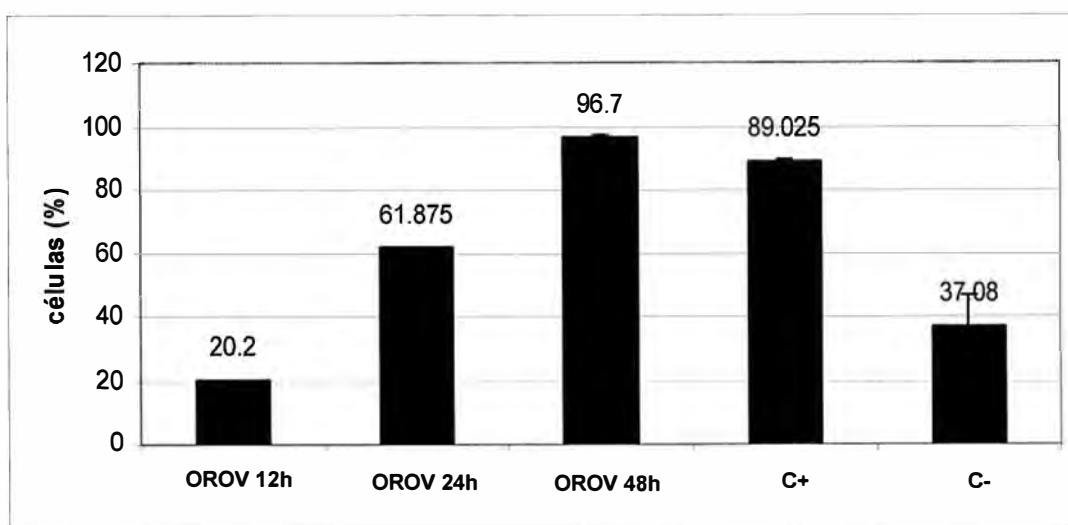
potencial de membrana intacto faz com esta molécula lipofílica carregada positivamente penetre na matriz mitocondrial, se acumulando e formando agregados que emitem uma fluorescência vermelha (590nm) quando excitados. Deste modo, quando células saudáveis não-apoptóticas são tratadas com esta molécula ela faz com que a mitocôndria emita uma fluorescência vermelha. Por outro lado, quando a célula está em apoptose, o potencial de membrana é prejudicado, fazendo com que o corante JC-1 não mais se acumule na matriz mitocondrial. Nestas células esta molécula fica no citoplasma sem formar agregados, o que faz com que emita uma fluorescência verde (525nm) quando excitada.

É possível então detectar essa mudança da emissão de fluorescência vermelha para verde, através da leitura de uma população de células infectadas pelo vírus, tratadas com o corante JC-1, em aparelho de citometria de fluxo utilizando filtros específicos para os dois comprimentos de onda (vermelho e verde) (Figura 18). O eixo Y do gráfico representa a intensidade da fluorescência vermelha lida pelo aparelho de FACS, que corresponde à quantidade de células com a membrana da mitocôndria apresentando polarização normal. Por outro lado, o eixo X representa a intensidade da fluorescência verde lida pelo aparelho, que corresponde à quantidade de células com a membrana da mitocôndria despolarizada.

Após 12 horas da infecção com o vírus Oropouche a despolarização da membrana da mitocôndria foi tão fraca (20,2% das células) quanto a do controle negativo (37%), o que sugere que neste tempo ainda não haviam acontecido modificações relevantes na estrutura desta organela, como resposta à replicação do vírus (Figura 18). No entanto, 24 horas após a infecção, mais da metade das células na cultura (61,87%) apresentaram a membrana da mitocôndria despolarizada, sugerindo que a replicação do vírus nessas células em 24 horas foi suficiente para iniciar uma resposta de morte celular envolvendo a via da mitocôndria. No tempo de 48 horas, praticamente todas as células (96,7%) estavam com a mitocôndria despolarizada, valor este bastante próximo ao controle positivo actinomicina D (89,025%) (Figura 18).



A



B

Figura 18: A) Análise da alteração do potencial de membrana da mitocôndria utilizando o corante JC-1 Mitoprobe (Molecular Probes-EUA) detectada por Citometria de Fluxo. O controle negativo foi uma cultura de células não infectada, e controle positivo foi uma cultura tratada com actinomicina D (0,25 μ g/mL). B) Gráfico com os valores das médias e desvios padrões obtidos em três repetições deste experimento.

Acredita-se que a despolarização da membrana da mitocôndria ocorra devido à ação de proteínas da família Bcl-2 (DANIAL;KORSMEYER, 2004). As proteínas desta família apresentam domínios conservados e são tanto proteínas pró quanto anti-apoptóticas. Não se sabe ainda ao certo como essas proteínas levam à despolarização da membrana da mitocôndria, mas existem indícios de que proteínas pro-apoptóticas, tais como Bax, Bak ou Bad, se agrupem na membrana externa da mitocôndria levando à formação de poros, causando, assim, a permeabilização da membrana e, em consequência, a perda do equilíbrio

do potencial de membrana desta organela. Como consequência deste processo, ocorre a liberação de citocromo c, uma proteína que funciona como co-fator para a ativação de outra importante caspase, a caspase 9 (DANIAL;KORSMEYER, 2004).

Já foi demonstrado que muitas proteínas virais promovem a permeabilização da membrana da mitocôndria causando assim apoptose das células infectadas (GALUZZI et al., 2008). Essas proteínas podem ser classificadas em dois grupos: o primeiro grupo inclui fatores que se inserem diretamente na membrana externa da mitocôndria. Neste grupo encontram-se, por exemplo, as proteínas 2C do vírus da encefalite aviária, (LIU;WEI;KWANG, 2004), proteína HBx do vírus da hepatite B (HENKLER ET AL., 2001) e NS4A de hepatite C (NOMURA-TAKIGAWA et al., 2006), que se ligam à mitocôndria e causam a permeabilização da membrana externa, facilitando a liberação dos fatores da mitocôndria que induzem apoptose, tais como citocromo c e proteína Smac/Diablo. O segundo grupo inclui fatores que promovem a permeabilização indiretamente, através da ativação de fatores do hospedeiro, como, por exemplo, a proteína 7a de SARS-coronavírus (TAN et al., 2007), que se liga à proteína celular anti-apoptótica Bcl-XL, inibindo, assim, sua atividade.

A evidência de despolarização da membrana da mitocôndria em células HeLa infectadas por OROV, a partir de 24 horas de infecção, aponta para o envolvimento da mitocôndria na cascata de apoptose acionada pelo vírus. Portanto, esta via foi investigada de modo a determinar se proteínas relacionadas a ela participam do processo de apoptose induzida pelo vírus Oropouche. A liberação de citocromo c das mitocôndrias para o citoplasma é um evento marcante para a ativação da cascata de apoptose. Para verificar este processo, células HeLa infectadas por OROV foram coletadas em diferentes intervalos de tempos após a infecção e submetidas a fracionamento celular, resultando na separação de duas porções: uma porção rica em mitocôndria (HM) e outra depletada de mitocôndria e rica em proteínas do citoplasma (C). A porção HM foi então submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) seguida de “western blot” com anticorpo específico contra citocromo c (Figura 19A).

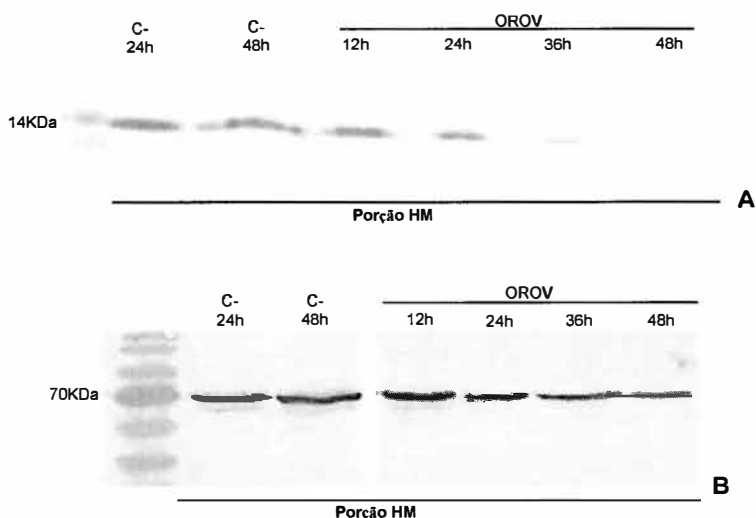


Figura 19: Células HeLa infectadas por OROV submetidas a fracionamento celular seguido de “western blot” com anticorpo específico para: A) Citocromo C. e B) Proteína HSP70 de mitocôndria. HM = porção enriquecida de mitocôndria. O controle negativo (C-) se refere a uma cultura de células não infectada.

A análise das frações ricas em mitocôndria (HM) mostrou que ocorreu uma redução na marcação para citocromo c nos tempos 36 e 48 horas após a infecção (Figura 19A). Tal fato sugere que ocorreu a liberação de citocromo c da mitocôndria em células infectadas por OROV após 36 horas de infecção. Nos tempos 12 e 24 horas a quantidade de citocromo c na mitocôndria ainda é suficiente para que o método utilizado o detecte, portanto não é possível afirmar se ocorreu perda significativa de citocromo c da porção HM nestes tempos. Para comprovar que nos tempos analisados a porção rica em mitocôndria HM continha realmente proteínas mitocondriais e descartar o fato da ausência de marcação nos tempos 36 e 48 horas não seja devido à ausência de mitocôndrias nesta porção foi realizado um “western blot” utilizando estas mesmas porções HM com anticorpo contra a proteína Hsp70 de mitocôndria (Figura 19B). Tal experimento revelou que em todos os tempos analisados a fração HM continha mitocôndrias. Deste modo, o experimento revela claramente que 36 horas após infecção por OROV não é possível mais detectar citocromo c nas mitocôndrias, sugerindo que houve liberação desta molécula para a ativação de apoptose neste modelo.

A análise anterior (Figura 18) mostrou que a partir de 24 horas ocorreu despolarização significativa da membrana da mitocôndria, o que sugere que a ação de alguma proteína viral, ou de proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2, tais como Bax e Bad, possam estar promovendo a formação de poros na membrana, com conseqüente liberação de citocromo c para o citoplasma. O presente experimento revelou que 36 horas após a infecção, ou seja, 12 horas após o início da despolarização da mitocôndria, começa a ser visível a liberação de citocromo c, muito embora a liberação do citocromo c também possa ocorrer antes deste

tempo, ou mesmo sem o colapso do potencial da membrana interna da mitocôndria (BOSSY-WETZEL;NEWMEYER;GREEN, 1998).

O citocromo c, quando liberado no citoplasma, se liga à proteína Apaf-1 e à pró-caspase 9, formando um complexo denominado apoptossomo. A formação deste complexo promove a clivagem de pró-caspase 9, permitindo, assim, sua ativação. Para se determinar se durante a infecção pelo vírus Oropouche ocorre ativação de caspase 9, células HeLa infectadas por OROV e coletadas em diferentes tempos foram lisadas, e seu conteúdo protéico foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Em seguida, este gel foi transferido a uma membrana de nitrocelulose para realização de “western blot” com anticorpo anti-caspase 9.

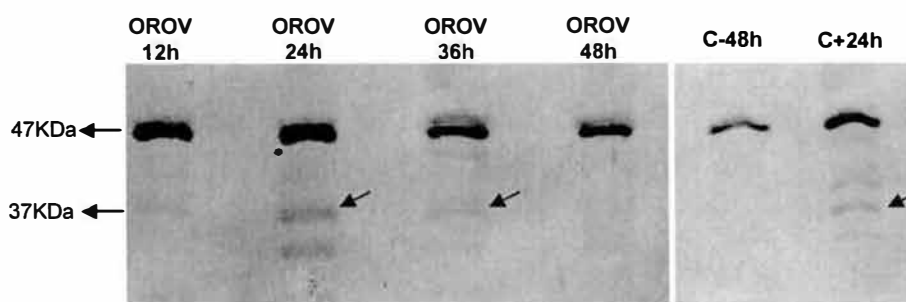


Figura 20: Células HeLa infectadas por OROV submetidas ao protocolo de “western blot” com anticorpo específico para caspase 9. A seta mostra a banda equivalente à proteína caspase 9 clivada e, conseqüentemente, ativa. A banda superior, de 47KDa corresponde à forma inativa pró-caspase 9, que é comum para todos os tratamentos. C-: cultura de células não infectada. C+: cultura de células tratada com 0,25µg/mL de actinomicina D analisada após 24 horas.

Neste ensaio a ativação de caspase 9 é observada pela presença da forma clivada da proteína, revelada pelo “western blot” como uma banda de 37KDa (Figura 20). Em todos os tempos analisados durante o experimento foi verificada a presença da forma inativa desta proteína, a pró-caspase 9, com peso molecular de 47KDa (Figura 20). Esta observação é comum a todos os tempos analisados e reflete a presença da forma inativa de caspase 9 no citoplasma da célula de maneira constitutiva e independente do estado de ativação do processo de apoptose na célula. No entanto, foi observada ativação de caspase 9 após 24 horas de infecção com OROV, conforme evidenciado pela presença da banda de 37KDa na membrana (ver seta na figura 20). A forma ativa pode ser ainda detectada após 36 horas, porém em menor intensidade, se comparada com o tempo anterior. Mais uma vez no tempo referente a 12 horas após a infecção, esta forma ativa não foi detectável, mostrando que este é, de fato, um tempo bastante precoce no processo de indução de apoptose pelo vírus. A forma ativa da molécula de caspase 9 em 48 horas após a infecção também não foi detectada, sugerindo que o processo de morte neste tempo esteja já em estágio muito avançado.

A análise do conjunto de resultados obtidos revela que a partir de 12 horas após a infecção de OROV em cultura de células HeLa ocorre despolarização da membrana da mitocôndria, que se acentua ao longo da infecção, sendo observada também em 24 horas, e atingindo o ápice após 48 horas. A liberação de citocromo c, conseqüente à despolarização da membrana da mitocôndria, só tornou-se óbvia às 36 horas após a infecção. Provavelmente alguma quantidade de citocromo c, não revelada pelo método, é liberada também precocemente (provavelmente após 24 horas), visto que este é um evento necessário para a ativação de caspase 9, esta última detectada nas células infectadas já em 24 horas de infecção (Figura 20) (HENGARTNER, 2000).

Esses experimentos, em conjunto, demonstram que após a infecção pelo vírus Oropouche, células HeLa em cultura apresentam ativação de moléculas envolvidas na via apoptótica, tais como citocromo c, caspase 9 e caspase 3. Os resultados obtidos apontam para uma via intracelular de ativação de apoptose, dependente da mitocôndria. Deste modo, é possível concluir que o efeito citopático observado nestas células em cultura, quando infectadas pelo vírus, tais como arredondamento, “blebbing” da membrana plasmática, destacamento do substrato e fragmentação do DNA, são resultados de modificações provocadas na célula devido à apoptose induzida pelo vírus, uma vez que estas características não foram observadas em células não infectadas. Ademais, a porcentagem relativa de células em apoptose é correlacionada com a quantidade de vírus produzido, uma vez que o pico de replicação viral (Figura 2) e o ápice da fragmentação do DNA celular (Figura 15) se dão no mesmo momento às 36 horas após a infecção. Além disso, a translocação de resíduos de fosfatidilserina e a ativação das moléculas da cascata apoptótica, tais como caspases 3 e 9 e citocromo c, indicam claramente que o efeito citopático causado pela replicação do vírus nessas células é fruto de apoptose. Resultados semelhantes foram obtidos em estudos *in vitro* realizados com o vírus da rubéola (HOFMANN;PLETZ;LIEBERT, 1999), com o vírus de ovelhas visna-maedi (DUVAL et al., 2002), e com o vírus da encefalite de St. Louis (PARQUET et al., 2002), o que mostra que a indução de apoptose como fruto da replicação viral é um fenômeno observado em diferentes famílias de vírus.

Para averiguar a relação existente entre a apoptose induzida por OROV e a progressão do seu ciclo replicativo, foram realizados ensaios que bloqueiam a entrada do vírus na célula, ou que impedem sua replicação ou inibem a síntese protéica. Além disso, para se determinar a importância da apoptose para a replicação viral, foram realizados ensaios com inibidores de caspases.

Quando uma partícula viral é submetida à exposição à radiação ultravioleta seu material genético sofre danos irreparáveis, devido à formação de ligações irreversíveis entre bases pirimídicas adjacentes, que impedem que ele seja replicado ou transcrito. Desta maneira o vírus se torna inativado, e não consegue se replicar na célula, apesar de manter sua integridade estrutural, o que permite que ele se ligue ao receptor celular e passe pelo processo de entrada e desnudamento.

A inativação do vírus Oropouche foi realizada por exposição à luz ultravioleta germicida (comprimento de onda de 254nm) em diferentes tempos (3 horas e 5 horas) a uma distância de aproximadamente cinco centímetros da lâmpada, dentro de uma capela de fluxo laminar apropriada, incubando em gelo. Desta maneira, foi possível reduzir o título viral de $10^{6.25}$ TCID₅₀/mL para $10^{3.25}$ TCID₅₀/mL após 3 horas e para $10^{1.5}$ TCID₅₀/mL após 5 horas de exposição à radiação (Figura 21). Como controle negativo (OROV C- 5h) foi utilizado um estoque de vírus submetido às mesmas condições, pelo mesmo tempo, dentro do fluxo laminar sobre gelo, porém sem ligar a fonte de luz ultravioleta.

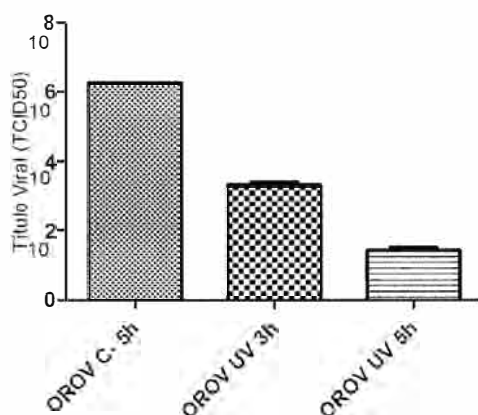


Figura 21: Título viral determinado através do método de Reed & Muench (TCID₅₀) de estoques de vírus Oropouche submetidos à inativação por radiação ultravioleta. Os tempos de exposição à radiação utilizados foram três horas (OROV UV 3h) e cinco horas (OROV UV 5h). O controle negativo (OROV C- 5h) foi submetido às mesmas condições, porém sem ligar a fonte de luz ultravioleta.

Este estoque de vírus inativado por 5 horas (denominado OROV U.V.5h) foi então utilizado para infectar uma cultura de células HeLa, e depois de 36 horas a replicação do vírus foi analisada por titulação e a indução de apoptose foi determinada pela porcentagem de fragmentação do DNA celular pela análise da população sub-G1 por citometria de fluxo (Figura 22).

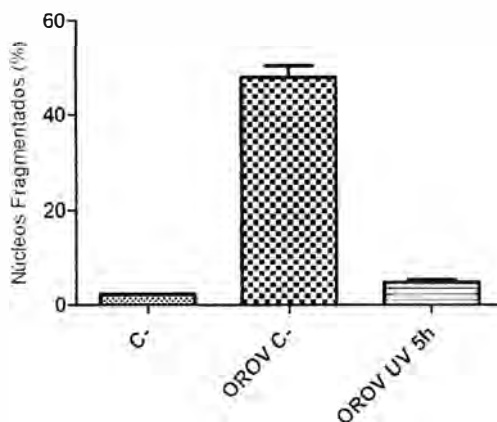


Figura 22: Porcentagens de células com fragmentação do DNA determinadas pela análise da população sub-G1 por FACS. C-: Cultura de células não infectadas. OROV C-: Cultura de células infectadas com vírus controle, deixado 5 horas na capela sem ligar a fonte de ultravioleta (OROV C-5h). OROV UV 5h: Cultura de células infectadas com vírus inativado por 5 horas de exposição à luz ultravioleta.

Células HeLa inoculadas com estoque de vírus inativado (OROV U.V. 5h), apresentaram pouca fragmentação do DNA (em torno de 4,76% das células) quando analisadas após 36 horas de incubação com o vírus. Este resultado foi virtualmente igual ao obtido quando nenhum vírus foi adicionado à cultura (controle negativo), de apenas 2,25% (Figura 22). Quando a cultura de células foi inoculada com o estoque de vírus não inativado foi observada fragmentação do DNA em aproximadamente 50% das células após 36 horas de infecção (Figura 22). Ademais, a análise dos títulos virais obtidos destas culturas após 36 horas revela que o vírus inativado não produziu nenhuma progênie viável (Figura 23).

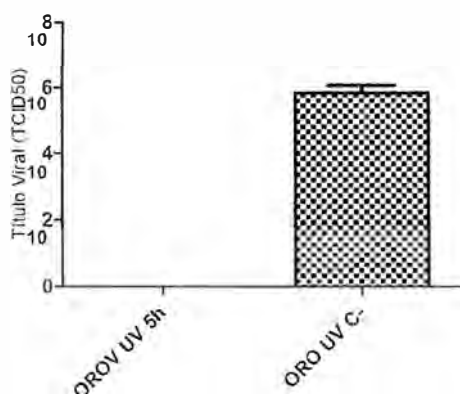


Figura 23: Títulos de OROV obtidos em culturas de células HeLa infectadas pelos estoques de vírus Oropouche inativados por 5 horas (ORO UV 5h) e controle (ORO UV C-). Título viral determinado através do método de Reed & Muench (TCID₅₀) analisado depois de 36 horas de infecção.

Desta maneira, é possível concluir que a radiação ultravioleta inativou o estoque de vírus Oropouche e impediu que este se replicasse em células HeLa. Ao mesmo tempo, a análise do conteúdo nuclear revelou que não ocorreu fragmentação do DNA de células inoculadas com o vírus inativado. Como o vírus inativado ainda mantém a capacidade de se ligar às células através de seu receptor específico, pois as proteínas do envelope viral não são danificadas pela ação da luz U.V., conclui-se que a simples ligação do vírus ao receptor celular não é suficiente para desencadear o processo de apoptose, mas sim que este precisa entrar na célula e se replicar para induzir a morte celular.

A seguir investigamos o efeito da inibição da acidificação endossomal no processo de apoptose. Para tanto, foi realizado um experimento com a droga Cloroquina. A cloroquina é uma droga lisossomotrópica que, quando presente nas vesículas do endossomo, se torna protonada, ficando menos permeável à membrana do endossomo, fazendo com que ela fique retida nesta organela. Como consequência, o pH da vesícula vai se tornando mais básico, o que faz com que esta droga seja considerada uma importante inibidora da acidificação do endossomo. Durante o ciclo de replicação do vírus Oropouche, após sua ligação com o receptor celular, ocorre a internalização da partícula viral através de vesículas cobertas por clatrina, seguida pela endocitose destas partículas em endossomos primários (SANTOS et al., 2008). Os passos seguintes do ciclo são dependentes da acidificação do meio interno do endossomo primário, o que provoca alterações conformacionais nas proteínas do envelope do vírus, permitindo a fusão entre o envelope viral e a membrana do endossomo. Desta maneira, ocorre a liberação do genoma do vírus (nucleocapsídeo) para o citoplasma celular. A Cloroquina inibe a acidificação do endossomo, interrompendo o ciclo de replicação viral (SANTOS et al., 2008).

Culturas de células HeLa foram tratadas com a droga Cloroquina na concentração de 32µg/mL uma hora antes de serem infectadas com o estoque de vírus Oropouche (M.O.I. = 10). Estas células foram então incubadas em estufa a 37°C por 36 horas, após o que o título viral foi determinado por TCID₅₀ e a indução de apoptose foi determinada através da análise da fragmentação do DNA das células (população Sub-G1 por citometria de fluxo). Como controle negativo foi utilizada uma cultura de células HeLa infectada pelo mesmo estoque de vírus na mesma M.O.I., porém sem adição da droga.

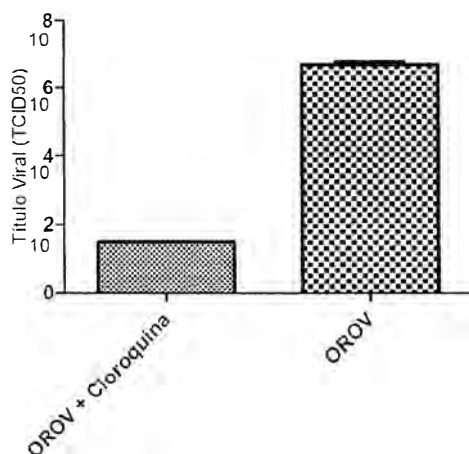


Figura 24: Títulos de OROV obtidos em culturas de células HeLa infectadas com vírus Oropouche na presença ou não de 32µg/mL de cloroquina. Título viral determinado através do método de Reed & Muench (TCID₅₀) analisado depois de 36 horas de infecção.

Nas células tratadas com a droga a produção de progênie viral ficou comprometida, revelando um título de aproximadamente 10^{1.5} TCID₅₀/mL, significativamente menor que o obtido nas células não tratadas com cloroquina (10^{6.75} TCID₅₀/mL) (Figura 24). Em seguida as células infectadas com o vírus na presença ou não da droga foram analisadas quanto à indução de apoptose através da contagem de células com núcleo fragmentado por citometria de fluxo (análise da população SubG1). Na presença da droga ocorreu uma redução significativa da fragmentação do DNA nas células infectadas pelo vírus (Figura 25). Sem a adição da droga, na presença do inóculo de vírus, em torno de 65% das células têm núcleos fragmentados no tempo de 36 horas após a infecção. Por outro lado, na presença da droga, este número cai para próximo de 15%, que é um valor bem próximo ao número de células com núcleo fragmentado se comparado ao tratamento com a droga sozinha (aproximadamente 20%). Este resultado revela que a adição de 32µg/mL da droga Cloroquina em células HeLa inibiu a replicação do vírus Oropouche e, por consequência, a fragmentação do DNA.

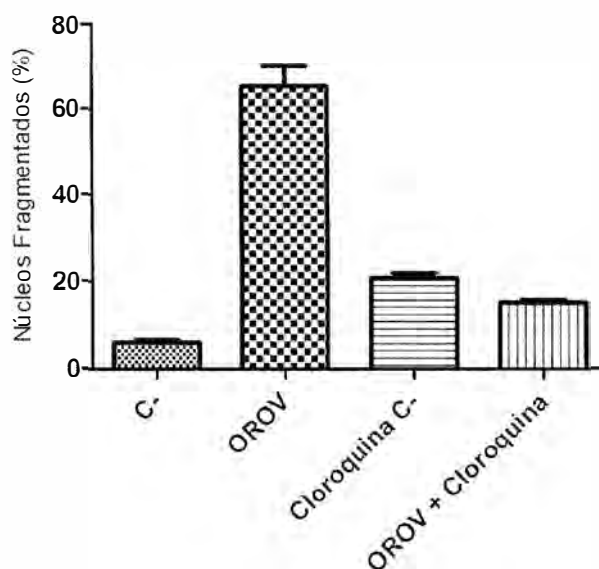


Figura 25: Fragmentação de DNA em culturas de células HeLa infectadas por vírus Oropouche na presença ou não de 32µg/mL de cloroquina analisadas 36 horas após a infecção. Porcentagem de células com fragmentação do DNA determinada através da análise da população sub-G1 por citometria de fluxo. C-: cultura de células não infectadas e sem adição da droga. OROV: cultura de células infectada com OROV, sem adição da droga. Cloroquina C-: cultura de células não infectadas tratadas com a droga na mesma concentração. OROV + Cloroquina: cultura de células infectada por OROV na presença da droga.

Na presença de Cloroquina, as partículas virais são endocitadas, mas o genoma viral não é liberado no citoplasma. Desta maneira, a análise dos resultados acima sugere que para acontecer apoptose como resultado da infecção pelo vírus Oropouche, este precisa ter seu genoma liberado no citoplasma. Um estudo publicado em 2002 sobre a interação do reovírus aviário com fibroblastos de embrião de galinha (CEF) *in vitro*, mostrou resultados diferentes dos obtidos por nós (LABRADA et al., 2002). Utilizando a inativação das partículas virais por radiação ultravioleta foi demonstrado que, ao contrário do que foi observado no presente estudo, a indução de apoptose continua ocorrendo, mesmo quando as células são infectadas com vírus inativados. Tal fato sugere que a indução de apoptose por reovírus é independente da expressão de proteínas virais. Esta hipótese foi comprovada utilizando Ribavirina, um potente inibidor da síntese de RNA na cultura de células infectadas por reovírus. Mesmo na presença da droga o vírus continua induzindo apoptose, provavelmente induzida por alguma proteína estrutural do vírus parental. Esta proteína poderia estar ativando a cascata de apoptose ao interagir com alguma proteína da membrana celular, ou ainda durante a entrada da partícula viral na célula, ou durante a saída do vírus do endossomo. Através do uso de Cloroquina os pesquisadores mostraram que a saída do ribonucleocapsídeo do endossomo é necessária para a indução de apoptose neste modelo, uma vez que células infectadas pelo

vírus tratadas com esta droga não apresentaram sinais de apoptose. Outros exemplos de vírus que induzem apoptose diretamente por meio de algum componente estrutural, independente de replicação viral incluem adenovírus (DEBBAS;WHITE, 1993), vírus da febre suína (BRUSCHKE et al., 1997), e parvovírus humano B19 (MOFFATT et al., 1998). Estes modelos sugerem que a indução de apoptose é fruto de uma mudança conformacional de proteínas estruturais pré-existentes no vírion, ocorrida dentro do endossomo acidificado, ou seja, independente da síntese de novas proteínas.

No presente estudo foi demonstrado que para ocorrer apoptose causada pelo vírus Oropouche, este precisa sair do endossomo. Há evidências de que em alguns casos a saída de vírus do endossomo induza alterações conformacionais na própria organela, levando à perda de integridade e levando a liberação de conteúdo endossomal para o citoplasma, como por exemplo catepsina B e D, o que promove a ativação de caspases e liberação de citocromo c, ativando, assim, a cascata de apoptose sem a participação direta de proteínas virais (BRUNK et al., 1997). Embora plausível, este não deve ser o mecanismo mais importante no caso do vírus Oropouche, visto que OROV inativado por ultravioleta não desencadeou apoptose na célula, indicando que a expressão de proteínas virais fruto da replicação deste agente é importante para a ativação deste processo. Se o processo de apoptose fosse fruto indireto de alterações da membrana do endossomo, conforme foi proposto acima, observaríamos a ativação de apoptose, mesmo que em pequeno grau, em células inoculadas com o vírus inativado.

Assim, é necessário que haja replicação de OROV para haver apoptose. Por isso foram realizados experimentos utilizando cicloheximida (CHX), um bloqueador da síntese protéica. Esta droga se liga ao sítio catalítico dos ribossomos impedindo que novos tRNAs sejam incorporados, bloqueando, por conseguinte, o alongamento da cadeia de aminoácidos. A concentração da droga utilizada nos experimentos realizados no presente trabalho foi de 20µg/mL, uma concentração que não é citotóxica para a cultura de células (SHIH et al., 2008). A droga nesta concentração não interferiu de maneira drástica com a síntese de proteínas celulares, conforme observado em uma cultura de células não infectada tratada com a droga, que se manteve viável por até 48 horas.

Culturas de células HeLa foram tratadas com a droga cicloheximida (CHX) na concentração de 20µg/mL uma hora antes de serem infectadas com vírus Oropouche (M.O.I. = 10). As culturas de células foram então incubadas em estufa a 37°C e depois de 36 horas, sempre na presença da droga, o título viral foi determinado por TCID₅₀ e a indução de apoptose foi determinada através da análise da fragmentação do DNA das células (população

Sub-G1 por citometria de fluxo). Como controle positivo foi utilizada uma cultura de células HeLa infectada pelo mesmo estoque de vírus na mesma M.O.I., porém sem adição da droga.

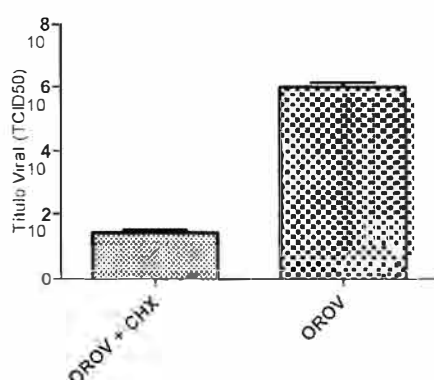


Figura 26: Títulos de vírus Oropouche em culturas de células HeLa infectadas na presença ou não de 20µg/mL de cicloheximida. Título viral determinado através do método de Reed & Muench (TCID₅₀) analisado depois de 36 horas de infecção.

Células tratadas com cicloheximida tiveram a produção de progênie viral comprometida, produzindo um título de aproximadamente $10^{1.5}$ TCID₅₀/mL, significativamente menor que o obtido nas células não tratadas com a droga ($10^{6.0}$ TCID₅₀/mL) (Figura 26). Em seguida, as células infectadas com o vírus na presença ou não da droga foram analisadas quanto à indução de apoptose através da determinação da porcentagem de células com núcleo fragmentado por citometria de fluxo (população SubG1). Na presença da droga ocorreu uma redução significativa da fragmentação do DNA das células infectadas pelo vírus (Figura 27). Na ausência da droga, o vírus induz fragmentação em cerca de 87% das células, enquanto que, na sua presença, esta taxa cai para próximo de 32%, semelhante à frequência de células com núcleo fragmentado por exposição somente a cicloheximida (aproximadamente 23%) (Figura 27). Assim, em presença de cicloheximida houve redução da replicação viral (Figura 26) e correspondente redução da fragmentação nuclear (Figura 27). Tal fato sugere que para OROV induzir apoptose é necessário que haja síntese protéica intacta. Portanto, é provável que a indução de apoptose por OROV dependa da síntese de alguma proteína viral.

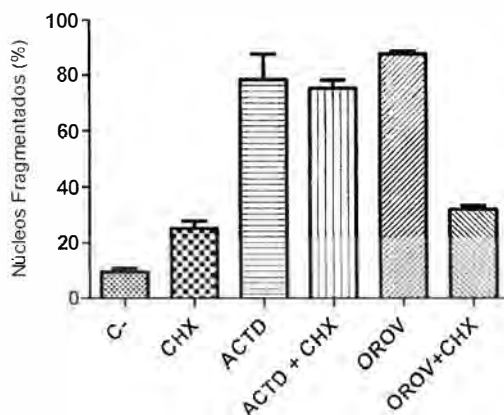


Figura 27: Porcentagens de fragmentação de núcleos em culturas de células HeLa infectadas por Oropouche na presença ou não de 20 μ g/mL da droga cicloheximida, analisadas depois de 36 horas de infecção. C-: culturas de células não infectadas. CHX: culturas de células com a droga sem adição de vírus. ACTD: culturas de células tratadas com 0,25 μ g/mL de actinomicina D. ACTD + CHX: culturas de células tratadas com 0,25 μ g/mL de actinomicina D na presença de 20 μ g/mL de cicloheximida. OROV: culturas de células infectadas sem adição da droga. OROV + CHX: culturas de células infectadas pelo vírus na presença de CHX.

A especificidade desse efeito pode ser corroborada pelo fato de que células tratadas com a droga indutora de apoptose actinomicina D, tanto na presença de cicloheximida, quanto na sua ausência, continuam entrando em apoptose, conforme evidenciado pela porcentagem de células com núcleos fragmentados (em torno de 80% nos dois casos) (Figura 27). Tal fato sugere que a ação da droga CHX, na concentração utilizada, não interfere diretamente na via de apoptose induzida pela actinomicina D. Deste modo, quando uma cultura de células é tratada com CHX e infectada pelo vírus, o fato destas células não entrarem em apoptose decorre da inibição da replicação do vírus porque suas proteínas não foram sintetizadas devido à ação da droga, e não porque a inibição da síntese protéica celular interferiu nos mecanismos de apoptose da célula.

Para melhor caracterizar este efeito foi realizado um experimento para tentar localizar a fase do ciclo de replicação do vírus em que é acionada a maquinaria de indução de apoptose. Para tanto, foi realizado o experimento de tempo de adição da droga cicloheximida. Uma cultura de células HeLa foi infectada por OROV e a droga foi adicionada à cultura em tempos diferentes, desde uma hora antes de se colocar o vírus, até 36 horas após a inoculação (Figura 28). Em seguida, a cultura de células foi incubada a 37°C em estufa de CO₂ e 36 horas depois as células foram coletadas, os títulos virais foram determinados por TCID₅₀ e a indução de apoptose foi determinada através da análise da fragmentação do DNA das células (população Sub-G1 por citometria de fluxo).

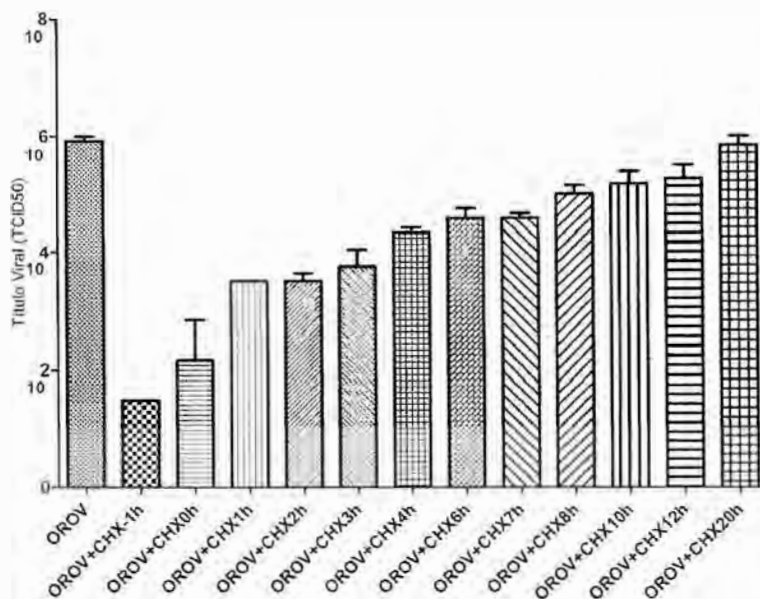


Figura 28: Experimento de tempo de adição. Culturas de células HeLa infectadas por vírus Oropouche na presença ou não de 20 μ g/mL da droga cicloheximida (CHX). Títulos virais determinados através do método de Reed & Muench (TCID₅₀) analisado depois de 36 horas de infecção. OROV: culturas de células infectadas apenas com o estoque de vírus, sem adição da droga. OROV + CHX: culturas de células infectadas pelo vírus na presença da droga adicionada em diferentes tempos, de acordo com a legenda do gráfico.

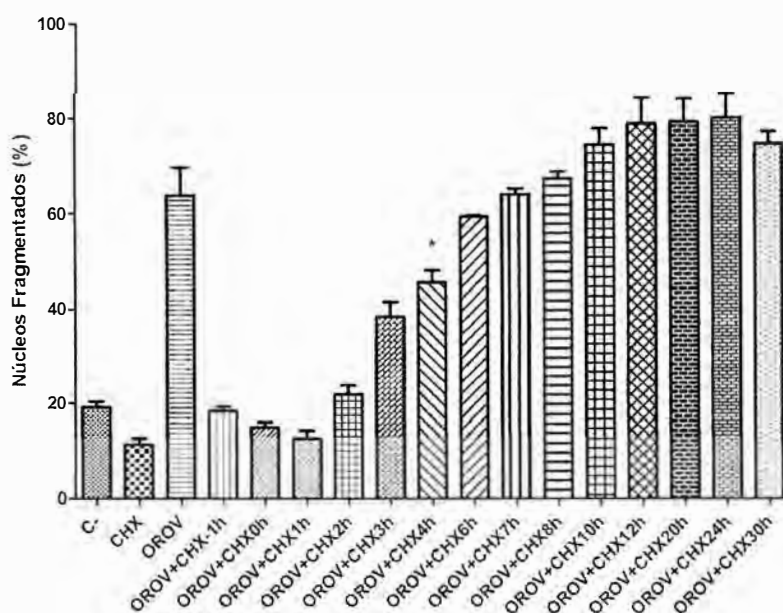


Figura 29: Experimento de tempo de adição. Culturas de células HeLa infectadas por vírus Oropouche na presença ou não de 20 μ g/mL de cicloheximida (CHX). Porcentagem de células com fragmentação do DNA obtida através da análise da população sub-G1 pela leitura por citometria de fluxo 36 horas após a infecção. C-: culturas de células sem vírus. CHX: culturas de células com CHX sem a adição do vírus. OROV: culturas de células infectadas apenas com o estoque de vírus, sem adição da droga. OROV + CHX: culturas de células infectadas pelo vírus na presença da droga adicionada em diferentes tempos, de acordo com a legenda do gráfico.

Quando adicionada previamente ao inóculo ou conjuntamente com este, cicloheximida induziu redução de produção de OROV em cerca de quatro ordens decimais de amplitude (dez mil vezes) (Figura 28). O efeito inibitório de cicloheximida sobre a produção de OROV tornou-se progressivamente menor quando a droga foi adicionada entre 1 hora e 8 horas pós-infecção, ainda assim causando redução de mais de 10 vezes na produção de progênie viral (Figura 28). O efeito inibitório de cicloheximida é progressivamente reduzido a partir de então, sendo que após 12 horas a produção de progênie equivale ao nível do controle (Figura 28). O efeito de cicloheximida é mais acentuado nas primeiras 8 horas do ciclo replicativo viral, sugerindo que durante este período ocorra a parte mais significativa da tradução das proteínas importantes para seu ciclo.

A análise da fragmentação do DNA das células infectadas submetidas ao experimento de tempo de adição com a droga cicloheximida (Figura 29) revelou que ocorreu diminuição significativa da porcentagem de células com núcleo fragmentado se comparada ao controle positivo (OROV sem a droga, 64% de núcleos fragmentados) quando a droga foi introduzida uma hora antes do vírus (tempo -1h, 18% de núcleos fragmentados), no momento da infecção (tempo 0h, 15% de núcleos fragmentados) e até duas horas depois (tempo 1h, 12% e tempo 2h, 21% de fragmentação). Além disso, quando a droga foi adicionada de três (38% de fragmentação) a quatro horas (45% de fragmentação) depois da inoculação, a quantidade de células em apoptose praticamente duplicou em relação ao controle negativo (19%), mas ainda foi 63% a menos que o controle positivo (OROV sem a droga, 64%). Nos tempos de seis, sete e oito horas após a adição da droga a porcentagem de células com DNA fragmentado foi praticamente igual ao controle positivo (59%, 64% e 67% respectivamente), e conforme foi se prolongando esse tempo, a quantidade de núcleos fragmentados aumentou gradativamente, chegando a um valor máximo de 80% após 24 horas.

Tal resultado mostrou que a ativação da apoptose se dá precocemente, já nas quatro primeiras horas após a infecção com o vírus Oropouche. Tal evidência é sustentada pelo fato de que um inibidor de síntese protéica perde sua capacidade de bloquear a replicação viral e a indução de apoptose quando adicionado depois de quatro horas após a infecção. Possivelmente uma proteína viral, cuja síntese precoce no ciclo foi inibida pela CHX, deve estar implicada na indução de apoptose.

A necessidade de replicação do vírus para que ocorra apoptose em células infectadas foi recentemente comprovada para um outro importante vírus humano, da família *Picornaviridae*, o Enterovírus 71 (SHIH et al., 2008). Neste trabalho publicado em 2008 os pesquisadores mostraram através da inativação do vírus por radiação ultravioleta, e ainda,

pelo uso de cloroquina e cicloheximida, que a apoptose induzida pelo Enterovírus 71 é dependente da síntese de novas proteínas virais.

Foi demonstrado no presente trabalho que a infecção de células HeLa por OROV induz a ativação de caspase 9 e conseqüentemente de caspase 3, ativando a maquinaria de morte celular e promovendo apoptose nas células, que é bastante pronunciada após 36 horas de infecção. De acordo com os resultados apresentados pode-se concluir que o sinal apoptótico surge na presença da replicação viral, já no início do ciclo replicativo do vírus, depois que a partícula viral é internalizada, liberada do endossomo, e seu material genético é replicado, provavelmente durante a síntese das proteínas virais.

O vírus Oropouche, assim como outros vírus do gênero Orthobunyavirus, tem suas proteínas codificadas por três fitas de RNA de polaridade negativa. Este genoma codifica as glicoproteínas de envelope Gc e Gn, assim como a proteína formadora do ribonucleocapsídeo (N), a RNA polimerase RNA dependente (RNAP) e ainda duas proteínas que não fazem parte da estrutura do vírus (NICHOL, 2001). Estas proteínas não estruturais receberam então os nomes de NSs e NSm, de acordo com o fragmento de RNA genômico a partir do qual são codificadas (S, small e M, medium).

A proteína NSs destes vírus, apesar de não ser essencial para a replicação dos mesmos, apresenta funções e características tão importantes para o ciclo de vida destes patógenos que ela pode ser considerada um importante fator de contribuição para a patogênese causada por estes agentes. Em 2001 foi demonstrado que a proteína NSs do vírus Bunyanwera (gênero Orthobunyavirus) apresenta um papel importante para a biologia deste arbovírus (BRIDGEN et al., 2001). Nesse estudo foi desenvolvido um vírus mutante por genética reversa, que não possuía o gene para a proteína NSs. Quando comparado com o vírus selvagem, esse vírus mutante apresentou um menor tamanho de placa, quando estudado em ensaio de formação de placa de lise em cultura, e apresentou ainda um menor título (em torno de um log menor do que o selvagem). Quando inoculado em modelo animal o vírus mutado demorou tempo maior que o selvagem para causar a morte dos animais e o cérebro dos animais infectados com o vírus mutante apresentou um menor título de vírus (BRIDGEN et al., 2001). Outro dado importante mostrado por esse trabalho foi que a proteína NSs parece ser importante para inibir a síntese de Interferon-Beta e Alfa nas células infectadas. Essa ação se dá através do bloqueio da RNA Polimerase II, diminuindo a transcrição na célula e a expressão de proteínas importantes para a resposta celular, como os Interferons do tipo 1. Deste modo, esta proteína evita a resposta imune inata do hospedeiro. Todos esses fatos em conjunto demonstram que,

na ausência da proteína NSs, o vírus consegue se replicar, porém com uma eficiência prejudicada.

Em 2003 esse mesmo grupo de pesquisadores demonstrou que o mesmo vírus mutante para NSs interfere com a maquinaria de apoptose da célula infectada (KOHL et al., 2003). Os vírus Bunyanwera que não possuíam o gene para a proteína NSs induziam apoptose nestas células em um tempo mais precoce do que os vírus selvagens, indicando que a proteína NSs poderia ser um importante fator para atrasar a apoptose nas células infectadas. Este atraso estaria ocorrendo devido à redução da atividade do fator de transcrição IRF-3 na presença da proteína NSs. IRF-3 é um importante fator de transcrição que promove a expressão de Interferons em células infectadas por vírus.

Por outro lado, estudos realizados com o vírus La Crosse, também um importante arbovírus do gênero *Orthobunyavirus*, causador de encefalites infantis na América do Norte, apontam para um papel oposto ao mencionado acima para Bunyanwera para a proteína NSs durante a interação deste vírus com suas células hospedeiras. Em 2003 foi publicado um trabalho que revelou que a porção C-terminal da proteína NSs deste vírus apresenta uma similaridade de seqüência com a proteína Reaper de *Drosophila*, que, além de inibir a tradução na célula, é conhecida como tendo atividade pró-apoptótica por se ligar a proteínas inibidoras de caspase 3 (IAPs) (COLON-RAMOS et al., 2003). Foi demonstrado neste trabalho que quando a proteína recombinante NSs do vírus La Crosse e a proteína Reaper foram estudadas em modelo de extrato livre de células de ovos de *Xenopus*, observou-se que ambas promoviam a clivagem de caspase 3 e liberação de citocromo c, ambos processos relacionados à indução de apoptose.

Em 2007 foi demonstrado também utilizando um vírus La Crosse mutante, gerado por genética reversa, que não possuía a proteína NSs (BLAKQORI et al., 2007), que esta proteína parece desempenhar um papel importante, mas não essencial na replicação viral, por interferir com a produção de Interferons em células infectadas, assim como havia sido demonstrado para o vírus Bunyanwera. Além disso, esse mesmo grupo já havia demonstrado também que vírus nulos para NSs induziam apoptose em menor grau se comparado ao vírus selvagem em modelo *in vitro* (BLAKQORI;WEBER, 2005).

Deste modo é possível concluir que a proteína não estrutural NSs de alguns vírus do gênero *Orthobunyavirus*, apesar de não serem essenciais, desempenham um papel importante durante o ciclo replicativo. A relação mais marcante desta proteína com a maquinaria celular parece envolver a inibição da síntese de Interferons e a inibição da tradução, processos estes que podem levar a uma resposta da célula por apoptose. Além disso, a proteína parece estar

envolvida diretamente com a indução de apoptose, conforme foi observado através da análise de similaridade entre a proteína NSs e a proteína pró-apoptótica Reaper de *Drosophila*.

O possível papel que a proteína não estrutural NSs de OROV desempenha em relação à indução de apoptose foi investigado no presente trabalho, através da expressão desta proteína recombinante em células HeLa em cultura. Para tanto, a porção do genoma de OROV que codifica para a proteína NSs foi amplificada por RT-PCR com primers específicos. Os produtos de PCR foram então clonados no vetor de entrada pDONR201 do sistema Gateway (Invitrogen-EUA) e, em seguida, sub-clonados no vetor de expressão pcDNA3.2, também do sistema Gateway (Invitrogen-EUA). Esse vetor é apropriado para a expressão de proteínas heterólogas em células de mamíferos, e apresenta como marcador (“tag”) uma cauda de 14 aminoácidos, derivada do vírus símio 5 (SV5), chamada cauda V5, importante para a posterior detecção e purificação da proteína recombinante.

Após a análise dos clones obtidos por sequenciamento automático, foram selecionados aqueles que continham o inserto inserido de maneira adequada, os quais foram utilizados para transfectar culturas de células HeLa por eletroporação (Figura 30) e, posteriormente, realizar a análise da expressão desta proteína heteróloga e a relação da mesma com a indução de apoptose.

No tempo de 24 horas após a eletroporação de células HeLa com este vetor contendo o gene NSs foi possível verificar um acentuado efeito citopático, bastante semelhante ao observado em uma cultura de células infectada com o vírus (Figura 30C). Tal efeito não foi observado em células que foram eletroporadas na ausência do vetor (Figura 30A) nem em células eletroporadas com o vetor controle pcDNA3.2-GWCAT (Figura 30B), que não contém o gene NSs de Oropouche, mas sim o de uma proteína não-relacionada conjugada com V5.

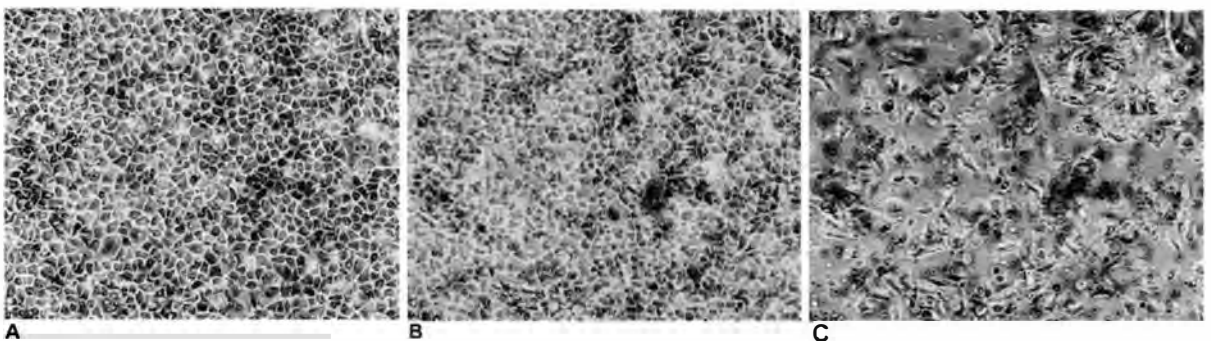


Figura 30: Monocamada de células HeLa observada em microscopia óptica (aumento de 10X) 24 horas após eletroporação. A) Células HeLa eletroporadas na ausência de vetor. B) Células HeLa eletroporadas com vetor pcDNA3.2-GWCAT (vetor controle sem o gene NSs). C) Células HeLa eletroporadas com o vetor pcDNA3.2 contendo o inserto de NSs.

A análise do efeito citopático observado após a eletroporação de células HeLa com o vetor de expressão contendo NSs (Figura 30) indicou que a proteína NSs de OROV expressa nestas células poderia estar promovendo efeito citopático semelhante àquele causado pela replicação do vírus, o que leva a crer que esta proteína possa estar envolvida com a maquinaria de indução de apoptose neste modelo. Portanto, para determinar se essas células apresentavam características de células em apoptose, elas foram avaliadas quanto à fragmentação de DNA por TUNEL e análise da população Sug-G1 por citometria de fluxo (Figura 31). Para tanto, foram analisadas células HeLa transfetadas com o vetor contendo NSs, assim como com o vetor controle negativo (pcDNA3.2-GWCAT) e células que foram eletroporadas na ausência de qualquer vetor.

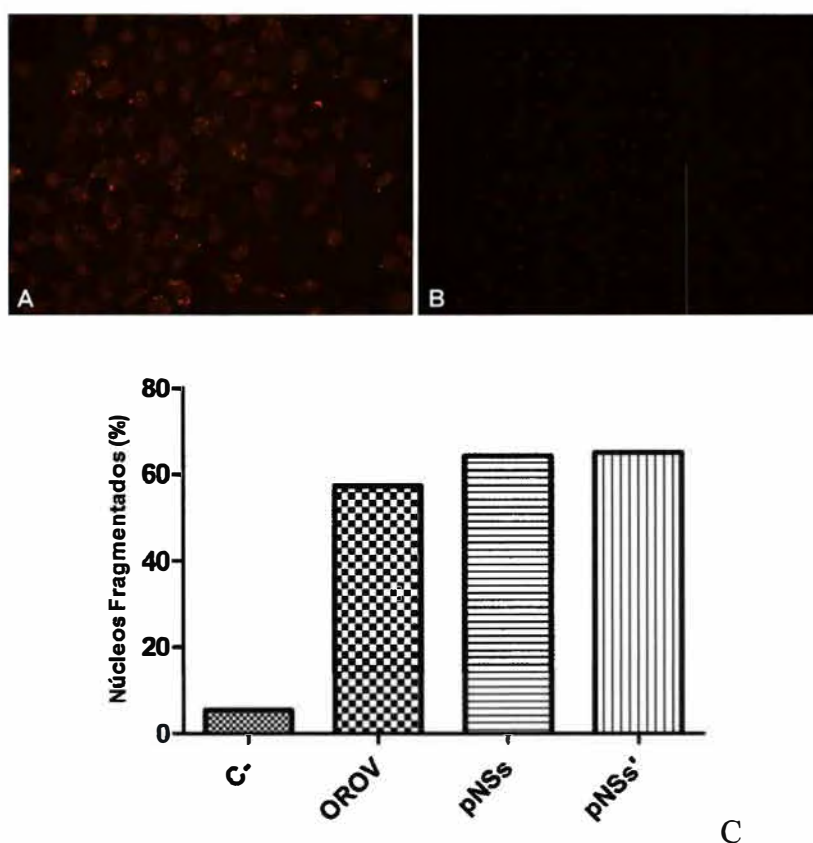


Figura 31: Fragmentação de DNA em células HeLa analisadas 24 horas após eletroporação. A) Células HeLa eletroporadas com vetor pcDNA3.2 contendo inserto de NSs submetidas ao ensaio de TUNEL. Aumento de 20X. B) Células HeLa eletroporadas com vetor GWCAT analisadas em ensaio de TUNEL. Aumento de 20X. C) Células HeLa eletroporadas ou infectadas por OROV analisadas por citometria de fluxo, quanto à porcentagem de células com DNA fragmentado (população SubG1). C-: células HeLa eletroporadas na ausência de vetor. OROV: células HeLa infectadas por OROV (M.O.I. = 10) analisadas após 36 horas de infecção. pNSs: células HeLa eletroporadas com vetor pcDNA3.2 contendo o inserto NSs. pNSs': repetição do experimento pNSs.

A análise da fragmentação do DNA das células tranfectadas com o vetor pcDNA3.2-NSs comprova que o efeito citopático observado após a eletroporação (Figura 30) é, de fato,

causado por apoptose, que pode ter sido induzida pela ação da proteína NSs expressa nessas células, uma vez que células que receberam o vetor controle, que não possui o gene NSs, não apresentaram fragmentação de DNA (Figura 31B). Além disso, o fato de células HeLa eletroporadas sem nenhum vetor não apresentarem efeito citopático, e nem fragmentação de DNA após a eletroporação, indica que este fenômeno não é resultado do processo de eletroporação.

O passo seguinte foi demonstrar que a proteína NSs estava sendo produzida nas células transfectadas. Para isso foi realizado um ensaio de imunofluorescência utilizando anticorpo específico anti-V5 (Invitrogen-EUA) (Figura 32).

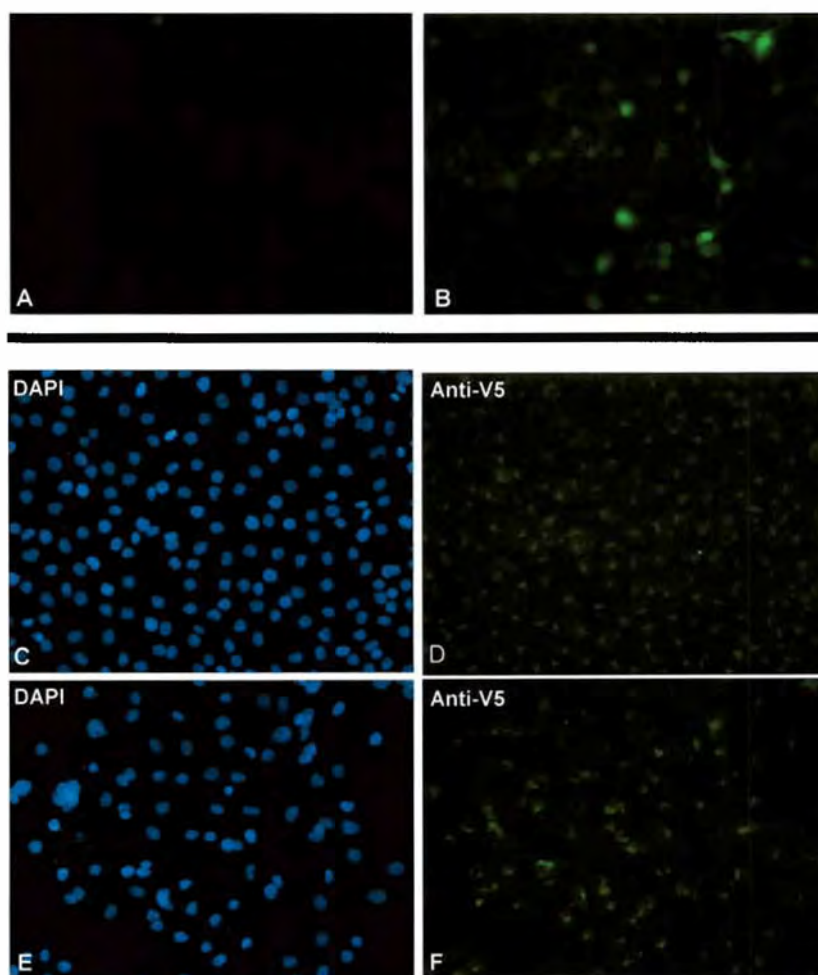


Figura 32: Culturas de células HeLa analisadas 24 horas após a eletroporação. A) Cultura de células HeLa eletroporadas na ausência de qualquer vetor. B) Cultura de células HeLa eletroporadas com vetor peGFP. C) Cultura de células HeLa eletroporadas na ausência de qualquer vetor coradas com DAPI. D) Cultura de células HeLa eletroporadas na ausência de qualquer vetor visualizadas por imunofluorescência com anticorpo anti-V5. E) Cultura de células HeLa eletroporadas com vetor pcDNA3.2-NSs coradas com DAPI. F) Cultura de células HeLa eletroporadas com vetor pcDNA3.2-NSs visualizadas por imunofluorescência com anticorpo anti-V5.

A detecção de NSs através do ensaio de imunofluorescência utilizando o anticorpo anti-V5 não se mostrou eficiente (Figura 32C e D). Neste ensaio foi utilizado anticorpo de camundongo anti-V5 e um anticorpo secundário anti-camundongo conjugado com Alexa-Fluor 488 (verde). A intensidade da marcação foi muito semelhante entre o controle negativo e as células eletroporadas com o vetor (Figuras 32D e 32F). Desta maneira, não foi possível verificar se NSs estava sendo expressa nessas células.

Foi realizada também uma análise da expressão dessa proteína em células eletroporadas com o vetor pcDNA3.2-NSs por “western blot” utilizando o mesmo anticorpo anti-V5 e também o anticorpo contra o vírus Oropouche (MIAF), o que também apresentou um resultado inconclusivo (dados não mostrados). A figura 32B revela que o protocolo de eletroporação utilizado, apesar de ter resultado na transfecção de algumas células, não teve boa eficácia, uma vez que apenas poucas células apresentam a fluorescência verde que seria esperada após a eletroporação de um vetor controle contendo a proteína verde fluorescente (eGFP). Esta provavelmente deve ser uma indicação de que a falta de detecção da proteína NSs pelo anticorpo V5 pode ser devida à ineficiência da eletroporação. Outro método de transfecção deverá ser utilizado, como, por exemplo, a precipitação do vetor em culturas de células HeLa através da adição de CaCl_2 .

Mesmo assim, diante das evidências de que células que receberam o vetor contendo o inserto NSs entraram em apoptose, mas não aquelas que não receberam o vetor ou receberam um vetor controle, é natural hipotetizar que a proteína NSs de OROV é uma proteína com potencial papel na indução de apoptose *in vitro*. Estudos estão em andamento visando averiguar o papel desta proteína no ciclo de replicação do vírus e sua relação com apoptose. Outra maneira de se avaliar esta relação será através de genética reversa, que permitirá criar um vírus com a proteína NSs deletada, e avaliar a indução de apoptose, tanto *in vitro*, quanto *in vivo*, assim como foi realizado para os bunyavírus La Crosse (BLAKQORI et al., 2007) e Bunyanwera (KOHL et al., 2003).

No intuito de verificar a importância do processo de apoptose para a replicação do vírus OROV em células HeLa, e gerar maior entendimento a respeito da interação da atividade viral com a resposta da célula hospedeira em relação ao suicídio, foram conduzidos experimentos para analisar a influência da ativação de caspases na replicação viral. Para tanto, foi utilizado um peptídeo derivado de fluorometilcetona (Z-VAD-FMK), que é um potente inibidor de pan-caspases, o qual se liga de maneira irreversível ao sítio catalítico das caspases de modo geral, inibindo sua ação e, conseqüentemente impedindo a ocorrência de apoptose

nas células tratadas com a droga. Foi então testada a capacidade do vírus Oropouche de se replicar em culturas de células tratadas com esta droga.

Foram utilizadas culturas de células HeLa tratadas com 40 μ M da droga Z-VAD-FMK adicionada no momento em que foi inoculado o estoque de vírus Oropouche a uma M.O.I. = 10. Como controle negativo foram utilizadas células tratadas com DMSO, que é o diluente da droga. As células foram então incubadas a 37°C por 36 horas e depois o título viral foi determinado por TCID₅₀ e a indução de apoptose foi determinada através da análise da fragmentação do DNA das células (população Sub-G1 por citometria de fluxo).

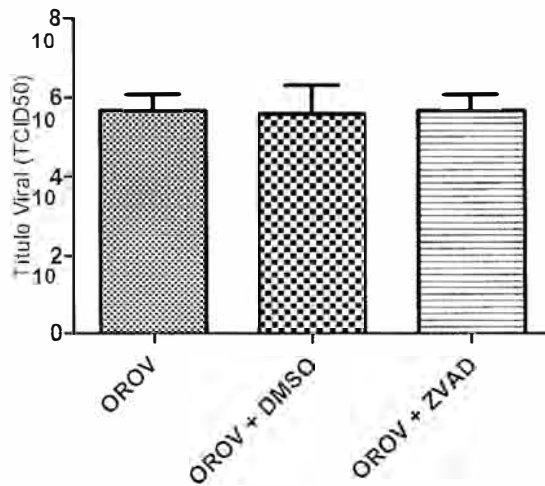


Figura 33: Títulos virais produzidos em culturas de células HeLa infectadas com vírus Oropouche na presença ou não de 40uM do inibidor de pan-caspases Z-VAD-FMK (Promega). Títulos virais determinados através do método de Reed & Muench (TCID₅₀) 36 horas após a infecção. Como controles negativos foram utilizadas culturas de células infectadas com OROV sem nenhuma droga (OROV) e culturas de células infectadas com o vírus na presença de DMSO, que é o diluente do inibidor (OROV + DMSO).

A análise do título viral após 36 horas de replicação nestas células tratadas com o inibidor de caspases Z-VAD-FMK revelou que, na presença da droga, a produção de progênie viral não foi alterada, ou seja, o título de vírus se manteve sempre ao redor de 10^{5.5} TCID₅₀/mL nos três tratamentos observados (Figura 33). Esse resultado sugere que a apoptose desencadeada por OROV em células HeLa não é essencial para a produção de progênie viral neste sistema.

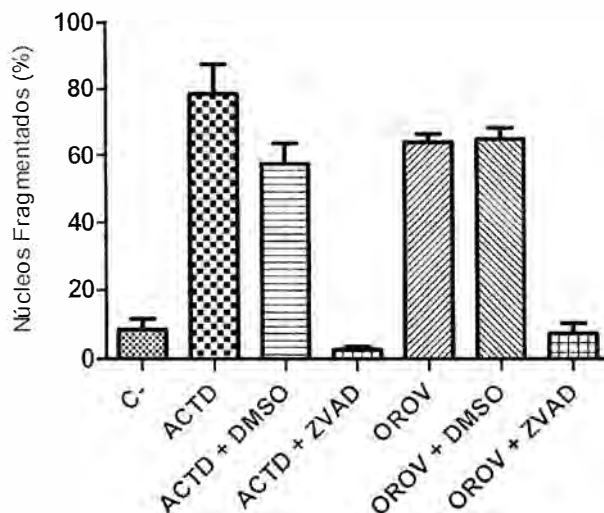


Figura 34: Porcentagem de células com fragmentação nuclear em culturas de células HeLa infectadas por vírus Oropouche na presença ou não de 40 μ M do inibidor de pan-caspases Z-VAD-FMK (Promega) analisado depois de 36 horas de infecção. Análise da porcentagem de células com fragmentação do DNA realizada através da determinação da população sub-G1 pela leitura por citometria de fluxo. C-: culturas de células sem vírus. ACTD: culturas de células tratadas com 0,25 μ g/mL de actinomicina D. ACTD + DMSO: culturas de células tratadas com 0,25 μ g/mL de actinomicina D na presença de DMSO. ACTD + ZVAD: culturas de células tratadas com 0,25 μ g/mL de actinomicina D na presença de Z-VAD-FMK. OROV: culturas de células infectadas com vírus sem droga. OROV + DMSO: culturas de células infectadas com o vírus na presença de DMSO. OROV + ZVAD: culturas de células infectadas com o vírus na presença do inibidor de pan-caspases Z-VAD-FMK.

A análise da fragmentação nuclear (Figura 34) mostrou que ocorreu inibição da fragmentação do núcleo das células tratadas com Z-VAD-FMK na presença de OROV: 7,41% das células com núcleo fragmentado, contra 64% nas células que não receberam a droga ou que foram tratadas com DMSO. Esta inibição é um indício forte de que nestas células não está acontecendo apoptose induzida por caspases. Foi possível verificar ainda que células HeLa tratadas com o inibidor de caspases e submetidas à ação da droga actinomicina D também tiveram uma redução significativa na porcentagem de núcleos fragmentados (Figura 34), o que comprova que a droga Z-VAD-FMK está atuando no bloqueio da maquinaria de apoptose independente do estímulo que a provoca.

De modo a detectar partículas virais neste ensaio e mostrar visualmente que o vírus estava replicando nas células HeLa tratadas com o inibidor de caspases Z-VAD-FMK, foi realizada uma imunofluorescência indireta utilizando anticorpo anti-Oropouche seguido de um anticorpo secundário conjugado com Alexa-fluor 488. A reação de imunofluorescência revelou a presença de Oropouche nestas células (Figura 35), mesmo na presença do inibidor

de caspases Z-VAD-FMK, indicando que esta droga não impediu que o vírus se replicasse neste modelo.

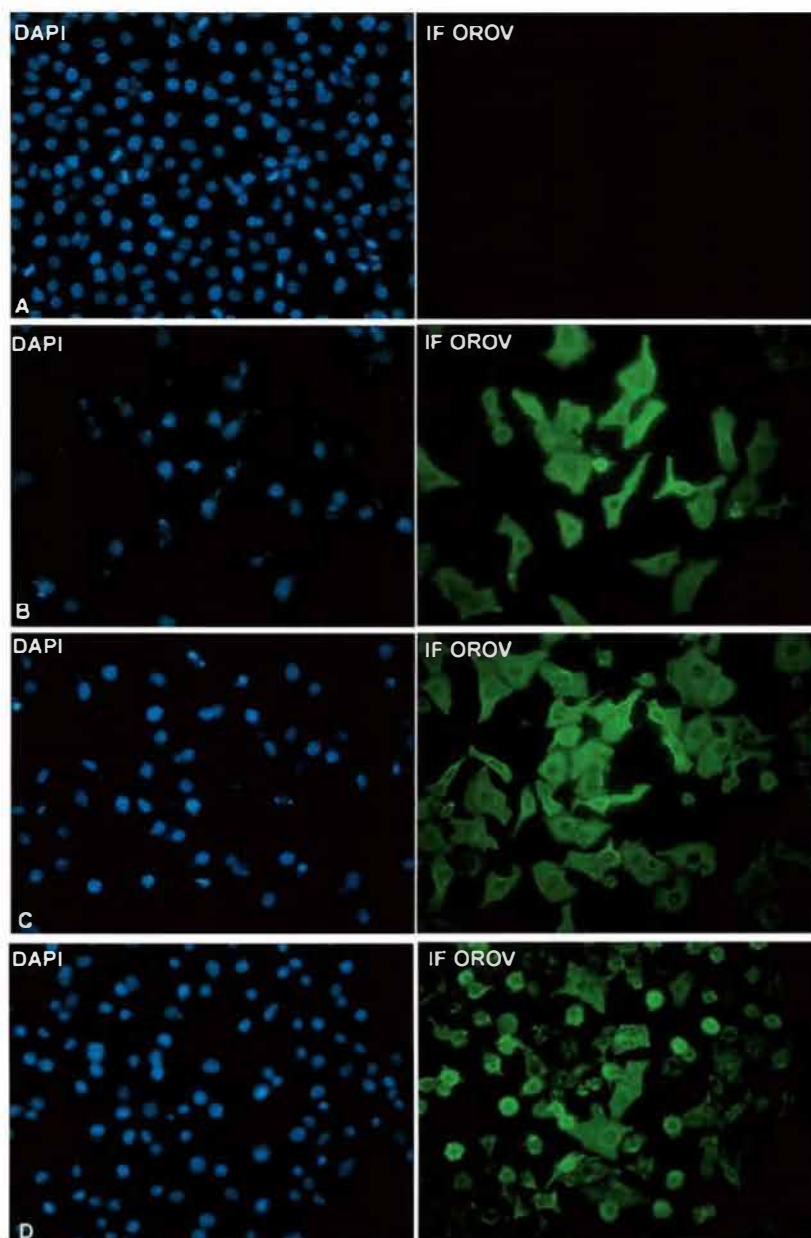


Figura 35: Culturas de células HeLa infectadas com OROV na presença ou não de 40 μ M de Z-VAD-FMK analisadas depois de 36 horas de infecção. Imunofluorescência indireta para OROV utilizando MIAF como primário e secundário jumento anti-camundongo conjugado com o fluoróforo verde Alexa 488. Material nuclear visualizado com DAPI diluído 1:8000 em PBS. A) Cultura de células não infectadas. B) Cultura de células infectadas com OROV sem nenhuma droga. C) Cultura de células infectadas com o vírus na presença de DMSO 1:500. D) Cultura de células infectadas com OROV na presença da droga Z-VAD-FMK.

Tanto na análise das culturas de células por imunofluorescência (Figura 35), como por microscopia óptica (Figura 36), foi possível perceber que as células tratadas com a droga Z-VAD-FMK não se soltam da monocamada quando infectadas por OROV, ou seja, o típico efeito citopático causado pelo vírus não foi observado. No entanto, nas culturas de células

infectadas com OROV sem a droga, ou com OROV adicionado de DMSO, após 36 horas foram vistas muitas células destacadas do substrato, um efeito citopático esperado (Figura 36).

Deste modo, concluímos que na presença da droga inibidora de caspases o vírus não induz apoptose, mas mesmo assim consegue se replicar. Ou seja, neste modelo *in vitro*, a replicação de OROV não depende de apoptose. Todavia, é importante mencionar que as células tratadas com a droga e infectadas com o vírus, apesar de produzirem uma progênie viral com mesmo título do que células não tratadas, não apresentaram o efeito citopático esperado em uma cultura infectada pelo vírus (Figura 36), o que indica que o efeito citopático provocado pelo vírus nestas células é provavelmente fruto da morte celular por apoptose.



Figura 36: Microscopia óptica mostrando culturas de células HeLa (aumento de 20X) cultivadas em placas de 24 cavidades. A) Cultura de células não infectadas cultivadas na presença de DMSO diluído 1:500. B) Cultura de células infectadas com OROV (M.O.I. = 10) na presença de 40 μ M de Z-VAD-FMK. C) Cultura de células infectadas com OROV (M.O.I. = 10) na presença de DMSO diluído 1:500.

O fato de um vírus conseguir se replicar efetivamente mesmo na presença de inibidores de caspases já havia sido demonstrado para os Vírus do Oeste do Nilo (KLEINSCHMIDT et al., 2007), Coxsackie B3 (MARTIN et al., 2007), Vírus da Encefalite Japonesa (CHANG et al., 2005) e para o Vírus da Estomatite Vesicular (HOBBS et al., 2001). Em todos estes casos foram observadas reduções do efeito citopático causado pelo vírus em culturas de células tratadas com inibidores de caspases, mesmo com produção de progênie viral não sendo afetada.

Uma observação importante foi constatada em estudos com o Reovírus 8B, mostrando que a inibição de apoptose utilizando inibidores de pan-caspases reduziu a patogênese causada por este vírus em modelo animal, sem reduzir a replicação do vírus (DEBIASI et al., 2004). A inibição da atividade de caspases neste estudo pelo uso de agentes farmacológicos ou por manipulação genética (utilização de camundongos “nocaute” para caspase 3), reduziu a miocardite induzida pelo vírus em camundongos em até 60%, e dramaticamente aumentou a taxa de sobrevivência em animais deficientes de caspase 3 infectados. Este estudo indica que

a apoptose pode ter um papel crítico em mediar o dano no tecido cardíaco durante a miocardite causada pelo vírus, e a inibição de caspase pode servir como uma estratégia terapêutica para esta doença (DEBIASI et al., 2004).

Acredita-se que em modelo *in vivo* a morte celular por apoptose seja um mecanismo importante utilizado pelo vírus como escape do sistema imunológico, aumentando assim sua progênie. Tal fato é apoiado por inúmeras descobertas de proteínas virais envolvidas na indução direta da apoptose (HAY;KANNOURAKIS, 2002). Portanto, analisando o ciclo de replicação dos vírus e sua relação com as células hospedeiras através deste escopo, poderia ser esperado que a produção de partículas virais fosse comprometida quando a apoptose fosse inibida nas células infectadas. No entanto, tal fato não foi observado no presente estudo *in vitro* de infecção de células HeLa pelo vírus Oropouche.

No modelo testado, a inibição de apoptose utilizando inibidores de pan-caspases não alterou o título de OROV, que se manteve próximo ao título obtido em células infectadas sem tratamento com droga alguma. Tal fato indica que a morte celular nestas células não é condição restritiva para a replicação do vírus, mas sim provavelmente uma resposta que possa facilitar sua dispersão e conseqüente escape do sistema imunológico em um hospedeiro natural, o que leva a considerar a apoptose como um possível método que poderia auxiliar na patogênese do vírus nos tecidos infectados. No entanto, é necessário ressaltar que o experimento foi conduzido em uma cultura de células, onde as condições fisiológicas são controladas e a resposta imunológica do hospedeiro é inexistente. Provavelmente em um modelo *in vivo* poderíamos obter um resultado diferente. Entretanto, é importante concluir que mesmo em células impedidas de entrar em apoptose o vírus OROV consegue replicar da mesma maneira e com a mesma eficiência que em células que apresentam uma resposta apoptótica normal.

Deste modo, para comprovar se a morte celular por apoptose ocorre em infecção por OROV também em modelo animal, foram realizados ensaios de TUNEL em cortes de tecidos congelados de hamsters sírios infectados. Os animais foram inoculados pela via subcutânea e seus fígados e cérebros retirados após o sacrifício, 12 dias após inoculação. Esses órgãos foram congelados e então levados ao criostato de modo a obter cortes apropriados para análise de fluorescência nestes tecidos. Em seguida eles foram analisados pelo ensaio de TUNEL seguido de marcação para Oropouche por imunofluorescência utilizando anticorpos específicos, assim como coloração com hematoxilina e eosina para visualização da integridade do tecido. A análise do tecido hepático dos hamsters infectados não revelou fragmentação do DNA significativa (Figura 37D). No entanto, observou-se marcante

fragmentação do DNA (vermelho) em células do tecido cerebral (Figura 37B). A marcação com anticorpo específico revela a presença do vírus neste tecido, sugerindo que na presença deste vírus as células do tecido cerebral são induzidas a entrar em apoptose. Infecções experimentais utilizando este modelo *in vivo* já foram caracterizadas anteriormente por nosso grupo (RODRIGUES, 2004) e revelaram a presença do vírus por imunohistoquímica tanto no cérebro quanto no fígado, além de altos títulos de vírus no tecido cerebral, com um pico de $10^{7.0}$ TCID₅₀/g de tecido já a partir de oito dias após a infecção e importante viremia observada a partir do terceiro dia ($10^{6.0}$ TCID₅₀/mL de sangue) (RODRIGUES, 2004). Em 1978, Araújo e colaboradores mostraram que hamsters inoculados com OROV pela via intracerebral apresentavam uma marcante hiperplasia do fígado e hepatite (ARAÚJO et al., 1978), dados estes também demonstrados por Rodrigues em 2004. No entanto, no presente trabalho, apesar de ter sido observada a presença do vírus por imunofluorescência em tecidos hepáticos (Figura 37D), este tecido não apresentou sinais de fragmentação de DNA revelada por TUNEL tão intensas quanto no cérebro.

Resultado semelhante foi obtido por nosso grupo em modelo de infecção subcutânea de camundongos BALB/c com OROV analisados 3 e 6 dias após o inóculo do vírus (SANTOS, 2008). Neste estudo foi também observada uma acentuada marcação pelo ensaio de TUNEL tanto no terceiro, quanto no sexto dia após a infecção, revelando que a apoptose também é uma consequência importante da infecção por OROV neste outro modelo animal. O estudo da patogênese do vírus Oropouche em camundongo revela que o vírus invade o cérebro, causando lesão, mas sem presença de infiltrado inflamatório importante. A análise deste tecido por ensaio de TUNEL revelou também uma marcante apoptose, sugerindo que este fenômeno possa ser importante na patogênese do vírus (SANTOS, 2008).

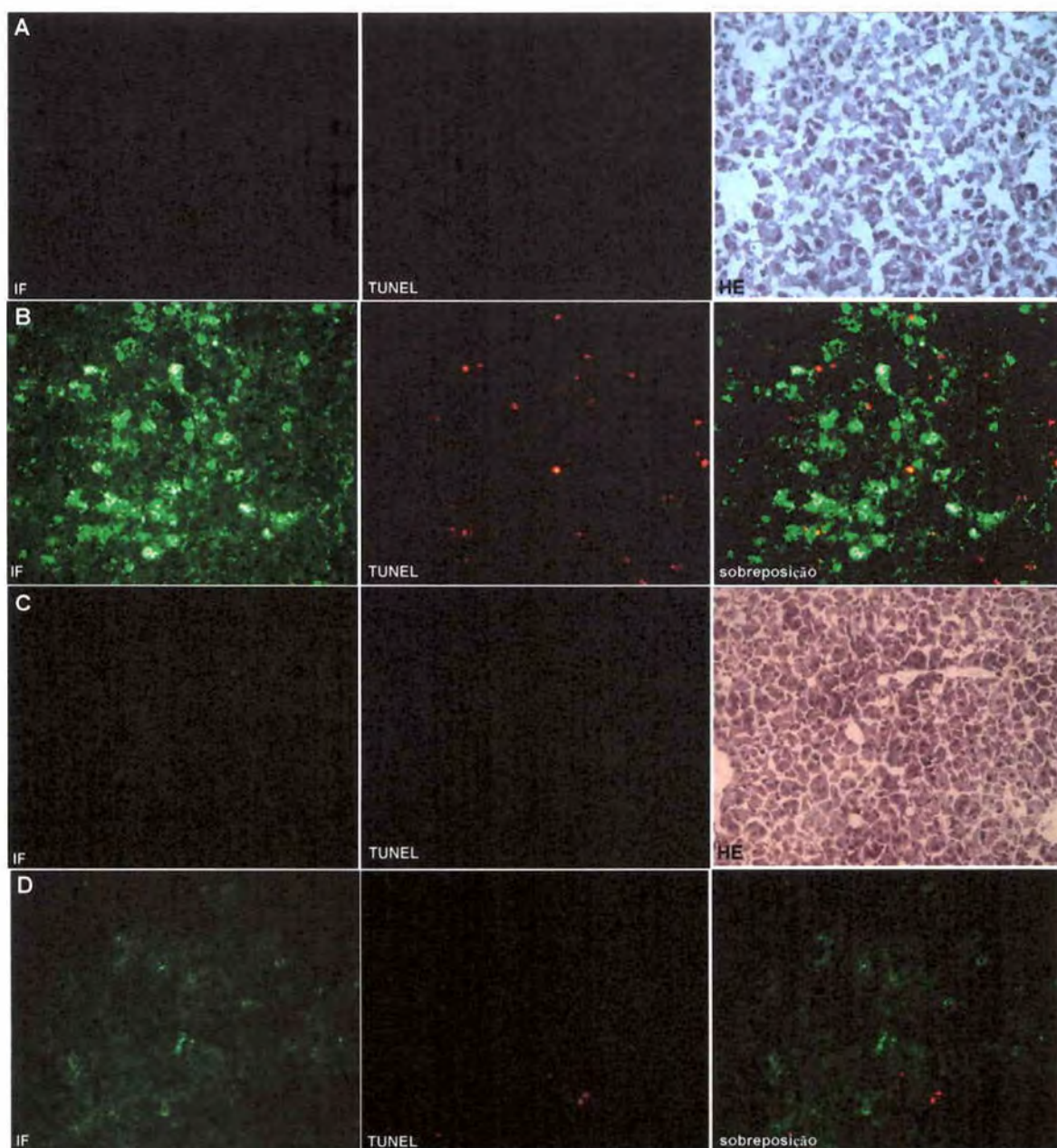


Figura 37: Detecção de apoptose em cortes congelados de cérebros e fígados de hamsters infectados pelo vírus Oropouche. Ensaio de TUNEL (vermelho) e imunofluorescência indireta (IF) para OROV (verde). HE – coloração por hematoxilina/eosina. A) cérebro de animal controle. B) cérebro de animal infectado por OROV 12 dias após o inoculo. C) fígado de animal controle. D) fígado de animal infectado por OROV 12 dias após o inoculo.

Já foi demonstrado para vários vírus em modelo animal que o pico de título viral no sistema nervoso central coincide com ativação de caspase 3 e fragmentação de DNA evidenciada tanto por TUNEL quanto por fragmentação de DNA. Tais evidências foram verificadas em vírus West Nile (SAMUEL;MORREY;DIAMOND, 2007), reovírus (OBERHAUS et al., 1997) e vírus sindbis (LABRADA et al., 2002b), por exemplo. As mesmas evidências foram observadas em tecido cardíaco de camundongos infectados por vírus coxsackie B3, reovírus e vírus da encefalomiocardite, e no fígado de camundongos infectados por herpes simplex tipo 1 (CLARKE;TYLER, 2009). Estes estudos sugerem uma correlação entre apoptose e a severidade da doença, mostrando que a apoptose, seja ela induzida pelo vírus ou uma resposta de proteção inata do organismo, é um mecanismo de patogenicidade que contribuiria com o dano causado pelo vírus aos tecidos infectados (KOYAMA et al., 2000). Esta relação já foi demonstrada claramente em camundongos infectados pelo vírus West Nile, em que o cérebro e medula dorsal de animais que não apresentavam paralisia não apresentavam sinais de apoptose, enquanto que em animais com doença mais severa, que apresentavam paralisia pronunciada, seus cérebros e medulas apresentavam sinais claros de apoptose (SHRESTHA;GOTTLIEB;DIAMOND, 2003).

A indução de apoptose como resposta à infecção viral pode ser provocada pelo sistema imune do hospedeiro, como uma resposta protetora, de modo a promover a redução (“clearance”) das partículas virais mediada pela fagocitose dos corpos apoptóticos contendo os vírus. Por exemplo, em infecções do sistema nervoso central por reovírus e vírus da hepatite C não se detecta nenhum infiltrado inflamatório, o que indica que a apoptose observada em tais tecidos seja decorrente de alguma via autócrina (CLARKE;TYLER, 2009). No entanto, existem evidências cada vez mais fortes de indução direta de apoptose por proteínas virais (MORI et al., 2004). Foi demonstrado que em miocardites induzida pelo vírus coxsackie B3 a proteína do capsídeo, VP2, parece interagir com a proteína pró-apoptótica celular Siva, o que aumenta a indução de apoptose em tecidos infectados, contribuindo assim para a patogenicidade do vírus neste tecido (HENKE et al., 2000). Ademais, reovírus que não expressam a proteína não estrutural $\sigma 1s$ induzem menos apoptose no sistema nervoso central e cardíaco do que as linhagens parentais selvagens (CLARKE;TYLER, 2009).

A relação entre apoptose e infecções virais no sistema nervoso central em humanos também parece ser importante. Já foi relatado que pacientes com demência associada ao HIV-1 apresentam morte celular por apoptose significativa em neurônios, astrócitos e células endoteliais (LI et al., 2005). Neste caso, apesar do HIV não infectar diretamente os neurônios, algumas proteínas virais, quando secretadas, tais como gp120 e *Tat*, parecem estar envolvidas

nesse processo. A apoptose no sistema nervoso central em humanos também foi relatada em encefalites relacionadas ao vírus herpes simplex e citomegalovírus (DEBIASI et al., 2002), sendo que a ativação da via de apoptose nestes casos parece estar sendo influenciada pela replicação do vírus, e não pela resposta do hospedeiro, uma vez que esta resposta não foi dependente de via de sinalização por células T. Além disso, pode-se citar o envolvimento de apoptose como um relevante dano causado no fígado durante infecções por vírus da hepatite B e C (CLARKE; TYLER, 2009).

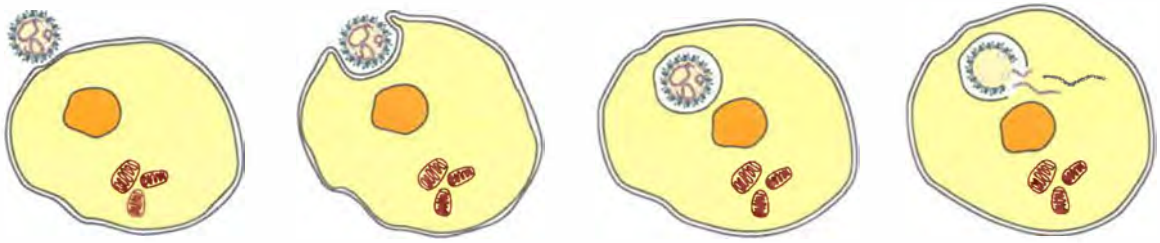
Muitos trabalhos que estudam a patogênese de vírus neurotrópicos em modelos animais descrevem apoptose como um dos mecanismos envolvidos no processo (LEVINE, 2002). Nosso grupo demonstrou que o vírus Oropouche, tanto em hamsters como em camundongos, é nitidamente neurotrópico (RODRIGUES, 2004; SANTOS, 2008), com indícios de neurodegeneração e elevados títulos virais neste tecido. Este tropismo, que não é observado em hospedeiros humanos, pode ser parcialmente explicado devido ao fato de que a cepa de vírus utilizada no trabalho ter sido propagada inicialmente em cérebros de camundongos recém-nascidos. O presente trabalho demonstrou que, como resultado da replicação do vírus no cérebro, ocorre a indução de apoptose, conforme observada pelo ensaio de TUNEL. No entanto, pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos na indução de apoptose em células do sistema nervoso central pelo vírus Oropouche. A partir dos indícios apresentados em nosso trabalho é possível concluir que o estudo dos mecanismos envolvendo a indução de apoptose neste modelo parece ser uma área promissora para se compreender a patogênese de OROV. Perspectivas futuras de nosso grupo incluem, portanto, dar seguimento a estes experimentos de modo a determinar quais células do sistema nervoso central entram em apoptose, além de identificar se apoptose ocorre somente nas células infectadas ou se ocorre também nas células vizinhas de maneira parácrina, com envolvimento de alguma proteína viral ou celular, e ainda estabelecer a relação entre a apoptose do sistema nervoso central com a severidade da infecção neste modelo. A infecção do sistema nervoso central pelo vírus Oropouche em humanos é bastante rara (PINHEIRO; VASCONCELOS, 1997) não sendo possível, desta forma, extrapolar se este fenômeno acontece em indivíduos infectados por OROV. No entanto, o modelo animal é uma ferramenta importante para o estudo das proteínas virais envolvidas na replicação, assim como estudo envolvendo drogas e vacinas anti-virais. Portanto, conhecer os mecanismos que levam o vírus a causar a infecção neste modelo é fundamental para se estabelecer o estudo do vírus em modelo *in vivo*.

No presente trabalho ficou evidente a indução de apoptose como consequência da replicação do vírus Oropouche em cultura de células de mamíferos. Os ensaios realizados

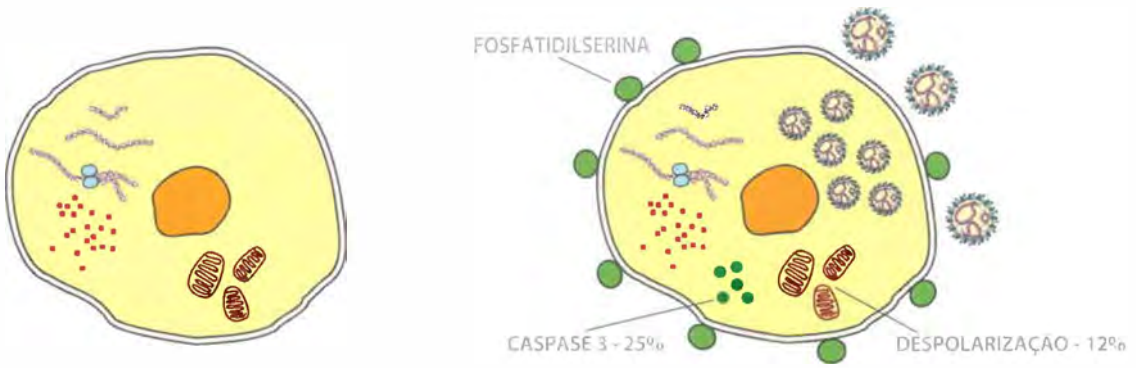
permitiram observar as características morfológicas clássicas de células em apoptose, tais como encolhimento do citoplasma, invaginação da membrana celular, fragmentação do DNA e exposição dos resíduos de fosfatidilserina. Nossos dados ainda demonstraram o envolvimento das moléculas características da via de apoptose, como citocromo c e caspases 9 e 3. Foi também observado que para que o vírus induza apoptose neste modelo não basta que ele se ligue ao receptor celular, mas sim que ele tenha seu material genético liberado do endossomo e que suas proteínas sejam sintetizadas. A análise da expressão da proteína NSs de OROV em células de mamíferos, ainda que preliminar, aponta para um possível papel desta proteína não estrutural na indução de apoptose. Nossos dados ainda revelam que, apesar da apoptose ser uma consequência da replicação de OROV nas células estudadas, este fenômeno não é condição restritiva e nem essencial para o ciclo do vírus, uma vez que a inativação das caspases e, por consequência, o bloqueio da apoptose nas células, não impede que o vírus se replique. A análise da infecção de OROV em modelo animal revela que a apoptose também acontece no tecido cerebral, o que sugere que esta seja uma importante consequência da replicação do vírus também *in vivo*.

Este trabalho tem importância por ser o primeiro a propor um estudo da via de indução de apoptose pelo vírus Oropouche em modelo *in vitro*, o que contribui para o entendimento da biologia do vírus e sua relação com as células do hospedeiro. Este estudo serve como base para estudos futuros que podem vir a elucidar os mecanismos que envolvem a patogênese do vírus em modelos animais, processo esse de grande importância para se estudar novas abordagens para o tratamento da infecção e desenvolvimento de novas drogas e medidas terapêuticas. O estudo ainda auxilia na compreensão da relação vírus-célula e no estudo da importância da morte celular programada na replicação viral. O fato de Oropouche, assim como muitos outros vírus estudados (O'BRIEN, 1998) apresentarem proteínas conservadas ao longo da evolução com papel na indução de apoptose apontam para este mecanismo como sendo importante para a biologia desses agentes.

Em síntese, na figura 38 propomos um esquema geral que sugere uma integração dos dados que obtivemos de modo a resumir passo a passo em um período de tempo de 36 horas as modificações provocadas pela replicação de OROV em cultura de células.

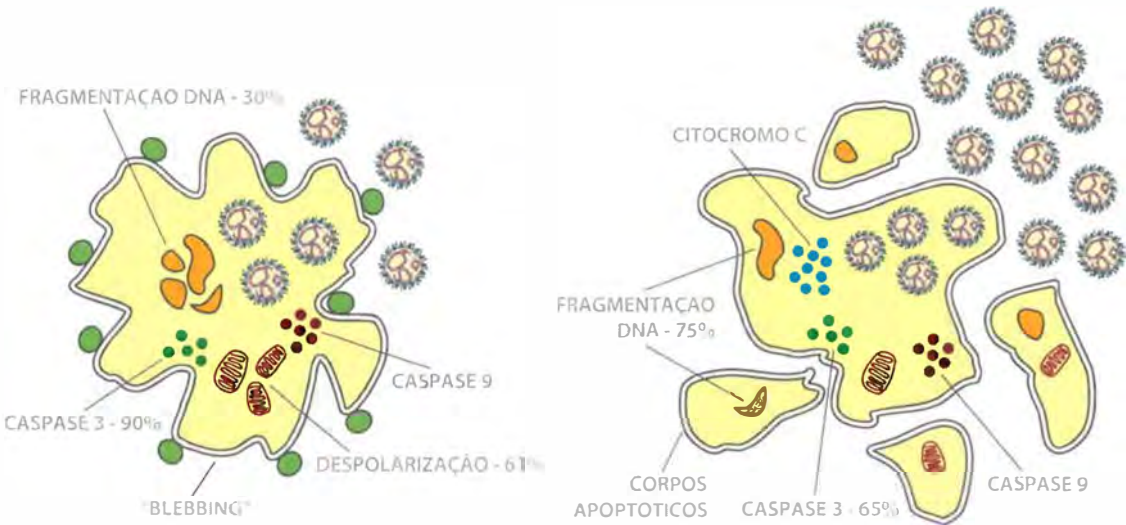


0h a 3h p.i.



4h a 8h p.i.

8h a 12h p.i.



12h a 24h p.i.

24h a 36h p.i.

Figura 38: Esquema geral ilustrando as alterações observadas no presente estudo provocadas pela replicação de OROV em cultura de células. **0h a 3h p.i.:** O vírus se liga ao receptor da célula hospedeira, é endocitado, e tem seu material genético liberado no citoplasma. **4h a 8h p.i.:** Síntese das proteínas virais e ativação da maquinaria que irá culminar na apoptose da célula infectada. **8h a 12h p.i.:** Os primeiros sinais de apoptose são observados – início da despolarização da membrana da mitocôndria, exposição dos resíduos de fosfatidilserina para a face externa da membrana plasmática, ativação de caspase 3 (em torno de 25% das células em uma cultura). Nesse período começa a ocorrer liberação de progênie viral para o meio externo. **12h a 24h p.i.:** A despolarização da membrana da mitocôndria atinge o ápice (em torno de 61% das células analisadas), ainda é observada a exposição dos resíduos de fosfatidilserina para a face externa da membrana plasmática, a ativação de caspase 9 é observada e a ativação de caspase 3 atinge o pico (em torno de 90% das células observadas). Apesar de não ser possível provar, deve estar acontecendo liberação de citocromo c da mitocôndria, uma vez que já é detectada ativação de caspase 9. A morfologia da célula começa a se alterar, sendo possível perceber a formação de “blebbings”, assim como a fragmentação do seu DNA (detectada em torno de 30% das células). **24h a 36h p.i.:** Ativação de caspase 9 ainda é observada, e a ativação de caspase 3 diminui um pouco (em torno de 65% das células observadas). A liberação de citocromo c da mitocôndria é evidente. A morfologia da célula começa se alterar mais ainda, sendo possível ver a formação dos corpos apoptóticos, típicos de células em estágios avançados de apoptose. A fragmentação do DNA celular atinge o pico máximo (75% das células). A produção de progênie viral também atinge seu pico máximo neste momento.

Esquema elaborado por Gustavo O. Acrani. Desenho e layout criado por Adilson P. Terrivel. 2009.

5. CONCLUSÕES

5. Conclusões

O presente estudo demonstrou que a infecção pelo vírus Oropouche em modelo *in vitro*, utilizando culturas de células HeLa, tem como consequência para a célula a morte por apoptose. Foi demonstrado que o efeito citopático apresentado pelas células após serem inoculadas pelo estoque de vírus é característico de células em apoptose.

As características morfológicas e bioquímicas de apoptose que foram observadas nas células infectadas por OROV no presente trabalho podem ser resumidas abaixo:

- presença de evaginações na membrana da célula (“blebbing”),
- fragmentação do DNA celular,
- exposição dos resíduos de fosfatidilserina para a face externa da membrana celular,
- despolarização da membrana da mitocôndria,
- liberação de citocromo c da membrana da mitocôndria,
- ativação de caspase 9,
- ativação de caspase 3.

Ficou evidente que a apoptose induzida por OROV se dá após a entrada do mesmo na célula, sendo a liberação do ribonucleocapsídeo do endossomo uma condição essencial. Foi determinado que o momento em que ocorre a ativação da cascata de apoptose provavelmente se dá no início do processo de replicação do vírus, processo este que requer a síntese de suas proteínas. Foi possível mostrar também que a proteína não estrutural NSs de OROV pode estar envolvida com a indução de apoptose neste modelo.

No entanto, foi observada que a apoptose não é uma condição essencial para a replicação do vírus em células HeLa, uma vez que ao se bloquear a ação das caspases celulares o vírus mantém sua capacidade de se replicar e produzir progênie viável.

Nossos resultados mostram então que apoptose é uma importante consequência da infecção pelo vírus Oropouche *in vitro*, a qual ocorre através de uma via intracelular que envolve a mitocôndria, e que é provavelmente acionada durante o processo de replicação e síntese das proteínas virais.

Foi demonstrada também fragmentação do DNA em cérebros de hamsters infectados, o que sugere que a indução de apoptose pelo vírus pode ser também observada em infecção *in vivo*.

6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6.Referências Bibliográficas

AHUJA, D.;SAENZ-ROBLES, M. T. e PIPAS, J. M. SV40 large T antigen targets multiple cellular pathways to elicit cellular transformation. **Oncogene**, v.24, n.52, p.7729-45. 2005.

ANDERSON, C. R.;SPENCE, L.;DOWNS, W. G. e AITKEN, T. H. Oropouche virus: a new human disease agent from Trinidad, West Indies. **Am J Trop Med Hyg**, v.10, p.574-8. 1961.

AQUINO, V. H. e FIGUEIREDO, L. T. Linear amplification followed by single primer polymerase chain reaction to amplify unknown DNA fragments: complete nucleotide sequence of Oropouche virus M RNA segment. **J Virol Methods**, v.115, n.1, p.51-7. 2004.

AQUINO, V. H.;MORELI, M. L. e MORAES FIGUEIREDO, L. T. Analysis of oropouche virus L protein amino acid sequence showed the presence of an additional conserved region that could harbour an important role for the polymerase activity. **Arch Virol**, v.148, n.1, p.19-28. 2003.

ARAUJO, R.;DIAS, L. B.;ARAUJO, M. T.;PINHEIRO, F. e OLIVA, O. F. [Ultrastructural changes in the hamster liver after experimental inoculation with Oropouche arbovirus (type BeAn 1991)]. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v.20, n.1, p.45-54. 1978.

AUBERT, M.;O'TOOLE, J. e BLAHO, J. A. Induction and prevention of apoptosis in human Hep-2 cells by herpes simplex virus type 1. **J Virol**, v.73, n.12, p.10359-70. 1999.

AZEVEDO, R. S.;NUNES, M. R.;CHIANG, J. O.;BENSABATH, G.;VASCONCELOS, H. B.;PINTO, A. Y.;MARTINS, L. C.;MONTEIRO, H. A.;RODRIGUES, S. G. e VASCONCELOS, P. F. Reemergence of Oropouche fever, northern Brazil. **Emerg Infect Dis**, v.13, n.6, p.912-5. 2007.

BAISLEY, K. J.;WATTS, D. M.;MUNSTERMANN, L. E. e WILSON, M. L. Epidemiology of endemic Oropouche virus transmission in upper Amazonian Peru. **Am J Trop Med Hyg**, v.59, n.5, p.710-6. 1998.

BALACHANDRAN, S.;ROBERTS, P. C.;KIPPERMAN, T.;BHALLA, K. N.;COMPANS, R. W.;ARCHER, D. R. e BARBER, G. N. Alpha/beta interferons potentiate virus-induced apoptosis through activation of the FADD/Caspase-8 death signaling pathway. **J Virol**, v.74, n.3, p.1513-23. 2000.

BANKI, K.;HUTTER, E.;GONCHOROFF, N. J. e PERL, A. Molecular ordering in HIV-induced apoptosis. Oxidative stress, activation of caspases, and cell survival are regulated by transaldolase. **J Biol Chem**, v.273, n.19, p.11944-53. 1998.

BITKO, V. e BARIK, S. An endoplasmic reticulum-specific stress-activated caspase (caspase-12) is implicated in the apoptosis of A549 epithelial cells by respiratory syncytial virus. **J Cell Biochem**, v.80, n.3, p.441-54. 2001.

BLAKQORI, G.;DELHAYE, S.;HABJAN, M.;BLAIR, C. D.;SANCHEZ-VARGAS, I.;OLSON, K. E.;ATTARZADEH-YAZDI, G.;FRAGKLOUDIS, R.;KOHL, A.;KALINKE, U.;WEISS, S.;MICHIELS, T.;STAEHELI, P. e WEBER, F. La Crosse bunyavirus nonstructural protein NSs serves to suppress the type I interferon system of mammalian hosts. **J Virol**, v.81, n.10, p.4991-9. 2007.

BLAKQORI, G. e WEBER, F. Efficient cDNA-based rescue of La Crosse bunyaviruses expressing or lacking the nonstructural protein NSs. **J Virol**, v.79, n.16, p.10420-8. 2005.

BORBOREMA, C. A.;PINHEIRO, F. P.;ALBUQUERQUE, B. C.;DA ROSA, A. P.;DA ROSA, J. F. e DOURADO, H. V. [1st occurrence of outbreaks caused by Oropouche virus in the State of Amazonas]. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v.24, n.3, p.132-9. 1982.

BOSSY-WETZEL, E.;NEWMAYER, D. D. e GREEN, D. R. Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. **EMBO J**, v.17, n.1, p.37-49. 1998.

BRIDGEN, A.;WEBER, F.;FAZAKERLEY, J. K. e ELLIOTT, R. M. Bunyamwera bunyavirus nonstructural protein NSs is a nonessential gene product that contributes to viral pathogenesis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.98, n.2, p.664-9. 2001.

BRUNK, U. T.;DALEN, H.;ROBERG, K. e HELLQUIST, H. B. Photo-oxidative disruption of lysosomal membranes causes apoptosis of cultured human fibroblasts. **Free Radic Biol Med**, v.23, n.4, p.616-26. 1997.

BRUSCHKE, C. J.;HULST, M. M.;MOORMANN, R. J.;VAN RIJN, P. A. e VAN OIRSCHOT, J. T. Glycoprotein Erns of pestiviruses induces apoptosis in lymphocytes of several species. **J Virol**, v.71, n.9, p.6692-6. 1997.

CACEDA, E. R. e KOCHEL, T. J. Application of modified shell vial culture procedure for arbovirus detection. **PLoS ONE**, v.2, n.10, p.e1034. 2007.

CARRASCOSA, A. L.;BUSTOS, M. J.;NOGAL, M. L.;GONZALEZ DE BUITRAGO, G. e REVILLA, Y. Apoptosis induced in an early step of African swine fever virus entry into vero cells does not require virus replication. **Virology**, v.294, n.2, p.372-82. 2002.

CHANG, C. C.;OU, Y. C.;RAUNG, S. L. e CHEN, C. J. Antiviral effect of dehydroepiandrosterone on Japanese encephalitis virus infection. **J Gen Virol**, v.86, n.Pt 9, p.2513-23. 2005.

CLARKE, P. e TYLER, K. L. Apoptosis in animal models of virus-induced disease. **Nat Rev Microbiol**, v.7, n.2, p.144-55. 2009.

- COLON-RAMOS, D. A.;IRUSTA, P. M.;GAN, E. C.;OLSON, M. R.;SONG, J.;MORIMOTO, R. I.;ELLIOTT, R. M.;LOMBARD, M.;HOLLINGSWORTH, R.;HARDWICK, J. M.;SMITH, G. K. e KORNBLUTH, S. Inhibition of translation and induction of apoptosis by Bunyaviral nonstructural proteins bearing sequence similarity to reaper. **Mol Biol Cell**, v.14, n.10, p.4162-72. 2003.
- CULLITON, B. J. Emerging viruses, emerging threat. **Science**, v.247, n.4940, p.279-80. 1990.
- DANIAL, N. N. e KORSMEYER, S. J. Cell death: critical control points. **Cell**, v.116, n.2, p.205-19. 2004.
- DEBBAS, M. e WHITE, E. Wild-type p53 mediates apoptosis by E1A, which is inhibited by E1B. **Genes Dev**, v.7, n.4, p.546-54. 1993.
- DEBIASI, R. L.;KLEINSCHMIDT-DEMASTERS, B. K.;RICHARDSON-BURNS, S. e TYLER, K. L. Central nervous system apoptosis in human herpes simplex virus and cytomegalovirus encephalitis. **J Infect Dis**, v.186, n.11, p.1547-57. 2002.
- DEBIASI, R. L.;ROBINSON, B. A.;SHERRY, B.;BOUCHARD, R.;BROWN, R. D.;RIZEQ, M.;LONG, C. e TYLER, K. L. Caspase inhibition protects against reovirus-induced myocardial injury in vitro and in vivo. **J Virol**, v.78, n.20, p.11040-50. 2004.
- DING, X.;XU, F.;CHEN, H.;TESH, R. B. e XIAO, S. Y. Apoptosis of hepatocytes caused by Punta Toro virus (Bunyaviridae: Phlebovirus) and its implication for Phlebovirus pathogenesis. **Am J Pathol**, v.167, n.4, p.1043-9. 2005.
- DUVAL, R.;DELEBASSEE, S.;CARDOT, P. J. e BOSGIRAUD, C. Visna virus-induced cytopathic effect in vitro is caused by apoptosis. **Arch Virol**, v.147, n.5, p.943-59. 2002.
- ENARI, M.;SAKAHIRA, H.;YOKOYAMA, H.;OKAWA, K.;IWAMATSU, A. e NAGATA, S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. **Nature**, v.391, n.6662, p.43-50. 1998.
- EVERETT, H. e MCFADDEN, G. Apoptosis: an innate immune response to virus infection. **Trends Microbiol**, v.7, n.4, p.160-5. 1999.
- EVERETT, H. e MCFADDEN, G. Viruses and apoptosis: meddling with mitochondria. **Virology**, v.288, n.1, p.1-7. 2001.
- FADOK, V. A. e CHIMINI, G. The phagocytosis of apoptotic cells. **Semin Immunol**, v.13, n.6, p.365-72. 2001.
- FIGUEIREDO, L. T. Emergent arboviruses in Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v.40, n.2, p.224-9. 2007.

- FIGUEIREDO, L. T.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A. e FIORRILO, M. A. Níveis de anticorpos para arbovírus em indivíduos da região de Ribeirão Preto, SP (Brasil). **Rev. Saúde Pública**, v.20, n.3, p.204-211. 1986.
- GALLUZZI, L.; BRENNER, C.; MORSELLI, E.; TOUAT, Z. e KROEMER, G. Viral control of mitochondrial apoptosis. **PLoS Pathog**, v.4, n.5, p.e1000018. 2008.
- GAUTIER, I.; COPPEY, J. e DURIEUX, C. Early apoptosis-related changes triggered by HSV-1 in individual neuronlike cells. **Exp Cell Res**, v.289, n.1, p.174-83. 2003.
- GAVRILOVSKAYA, I. N.; BROWN, E. J.; GINSBERG, M. H. e MACKOW, E. R. Cellular entry of hantaviruses which cause hemorrhagic fever with renal syndrome is mediated by beta3 integrins. **J Virol**, v.73, n.5, p.3951-9. 1999.
- GIBBONS, A. Where are 'new' diseases born? **Science**, v.261, n.5122, p.680-1. 1993.
- GOMES, R. **Apoptose e alterações na atividade do proteossoma induzidas por v'rus Coxsackie B5 em células HeLa**. Departamento de Biologia Celular, Molecular e Bioagentes Patogênicos. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.
- GOWEN, B. B.; HOOPES, J. D.; WONG, M. H.; JUNG, K. H.; ISAKSON, K. C.; ALEXOPOULOU, L.; FLAVELL, R. A. e SIDWELL, R. W. TLR3 deletion limits mortality and disease severity due to Phlebovirus infection. **J Immunol**, v.177, n.9, p.6301-7. 2006.
- HANON, E.; MEYER, G.; VANDERPLASSCHEN, A.; DESSY-DOIZE, C.; THIRY, E. e PASTORET, P. P. Attachment but not penetration of bovine herpesvirus 1 is necessary to induce apoptosis in target cells. **J Virol**, v.72, n.9, p.7638-41. 1998.
- HAY, S. e KANNOURAKIS, G. A time to kill: viral manipulation of the cell death program. **J Gen Virol**, v.83, n.Pt 7, p.1547-64. 2002.
- HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v.407, n.6805, p.770-6. 2000.
- HENKE, A.; LAUNHARDT, H.; KLEMENT, K.; STELZNER, A.; ZELL, R. e MUNDER, T. Apoptosis in coxsackievirus B3-caused diseases: interaction between the capsid protein VP2 and the proapoptotic protein siva. **J Virol**, v.74, n.9, p.4284-90. 2000.
- HENKLER, F.; HOARE, J.; WASEEM, N.; GOLDIN, R. D.; MCGARVEY, M. J.; KOSHY, R. e KING, I. A. Intracellular localization of the hepatitis B virus HBx protein. **J Gen Virol**, v.82, n.Pt 4, p.871-82. 2001.
- HOBBS, J. A.; SCHLOEMER, R. H.; HOMMEL-BERREY, G. e BRAHMI, Z. Caspase-3-like proteases are activated by infection but are not required for replication of vesicular stomatitis virus. **Virus Res**, v.80, n.1-2, p.53-65. 2001.
- HOCH, A. L.; ROBERTS, D. R. e PINHEIRO, F. D. Breeding sites of *Culicoides paraensis* and options for control by environmental management. **Bull Pan Am Health Organ**, v.20, n.3, p.284-93. 1986.

- HOFMANN, J.;PLETZ, M. W. e LIEBERT, U. G. Rubella virus-induced cytopathic effect in vitro is caused by apoptosis. **J Gen Virol**, v.80 (Pt 7), p.1657-64. 1999.
- HOFFMANN, P. R.;KENCH, J. A.;VONDRACEK, A.;KRUK, E.;DALEKE, D. L.;JORDAN, M.;MARRACK, P.;HENSON, P. M. e FADOK, V. A. Interaction between phosphatidylserine and the phosphatidylserine receptor inhibits immune responses in vivo. **J Immunol**, v.174, n.3, p.1393-404. 2005.
- HORNUNG, V.;ELLEGAST, J.;KIM, S.;BRZOZKA, K.;JUNG, A.;KATO, H.;POECK, H.;AKIRA, S.;CONZELMANN, K. K.;SCHLEE, M.;ENDRES, S. e HARTMANN, G. 5'-Triphosphate RNA is the ligand for RIG-I. **Science**, v.314, n.5801, p.994-7. 2006.
- IRUSTA, P. M.;CHEN, Y. B. e HARDWICK, J. M. Viral modulators of cell death provide new links to old pathways. **Curr Opin Cell Biol**, v.15, n.6, p.700-5. 2003.
- JAN, J. T. e GRIFFIN, D. E. Induction of apoptosis by Sindbis virus occurs at cell entry and does not require virus replication. **J Virol**, v.73, n.12, p.10296-302. 1999.
- KANG, J. I.;PARK, S. H.;LEE, P. W. e AHN, B. Y. Apoptosis is induced by hantaviruses in cultured cells. **Virology**, v.264, n.1, p.99-105. 1999.
- KERR, J. F.;WYLLIE, A. H. e CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer**, v.26, n.4, p.239-57. 1972.
- KEYAERTS, E.;VIJGEN, L.;MAES, P.;NEYTS, J. e VAN RANST, M. In vitro inhibition of severe acute respiratory syndrome coronavirus by chloroquine. **Biochem Biophys Res Commun**, v.323, n.1, p.264-8. 2004.
- KLEINSCHMIDT, M. C.;MICHAELIS, M.;OGBOMO, H.;DOERR, H. W. e CINATL, J., JR. Inhibition of apoptosis prevents West Nile virus induced cell death. **BMC Microbiol**, v.7, p.49. 2007.
- KNUDSON, C. M. e BROWN, N. M. Mitochondria potential, bax "activation," and programmed cell death. **Methods Mol Biol**, v.414, p.95-108. 2008.
- KOHL, A.;CLAYTON, R. F.;WEBER, F.;BRIDGEN, A.;RANDALL, R. E. e ELLIOTT, R. M. Bunyamwera virus nonstructural protein NSs counteracts interferon regulatory factor 3-mediated induction of early cell death. **J Virol**, v.77, n.14, p.7999-8008. 2003.
- KOYAMA, A. H.;FUKUMORI, T.;FUJITA, M.;IRIE, H. e ADACHI, A. Physiological significance of apoptosis in animal virus infection. **Microbes Infect**, v.2, n.9, p.1111-7. 2000.

KROEMER, G.;GALLUZZI, L.;VANDENABEELE, P.;ABRAMS, J.;ALNEMRI, E. S.;BAEHRECKE, E. H.;BLAGOSKLONNY, M. V.;EL-DEIRY, W. S.;GOLSTEIN, P.;GREEN, D. R.;HENGARTNER, M.;KNIGHT, R. A.;KUMAR, S.;LIPTON, S. A.;MALORNI, W.;NUNEZ, G.;PETER, M. E.;TSCHOOP, J.;YUAN, J.;PIACENTINI, M.;ZHIVOTOVSKY, B. e MELINO, G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell Death Differ**, v.16, n.1, p.3-11. 2009.

KUROKAWA, M.;KOYAMA, A. H.;YASUOKA, S. e ADACHI, A. Influenza virus overcomes apoptosis by rapid multiplication. **Int J Mol Med**, v.3, n.5, p.527-30. 1999.

LABRADA, L.;BODELON, G.;VINUELA, J. e BENAVENTE, J. Avian reoviruses cause apoptosis in cultured cells: viral uncoating, but not viral gene expression, is required for apoptosis induction. **J Virol**, v.76, n.16, p.7932-41. 2002.

LABRADA, L.;LIANG, X. H.;ZHENG, W.;JOHNSTON, C. e LEVINE, B. Age-dependent resistance to lethal alphavirus encephalitis in mice: analysis of gene expression in the central nervous system and identification of a novel interferon-inducible protective gene, mouse ISG12. **J Virol**, v.76, n.22, p.11688-703. 2002.b

LEVINE, B. Apoptosis in viral infections of neurons: a protective or pathologic host response? **Curr Top Microbiol Immunol**, v.265, p.95-118. 2002.

LI, W.;GALEY, D.;MATTSON, M. P. e NATH, A. Molecular and cellular mechanisms of neuronal cell death in HIV dementia. **Neurotox Res**, v.8, n.1-2, p.119-34. 2005.

LIM, S. I.;KWEON, C. H.;YANG, D. K.;TARK, D. S. e KWEON, J. H. Apoptosis in Vero cells infected with Akabane, Aino and Chuzan virus. **J Vet Sci**, v.6, n.3, p.251-4. 2005.

LINLEY, J. R.;HOCH, A. L. e PINHEIRO, F. P. Biting midges (Diptera: Ceratopogonidae) and human health. **J Med Entomol**, v.20, n.4, p.347-64. 1983.

LIU, J.;WEI, T. e KWANG, J. Avian encephalomyelitis virus nonstructural protein 2C induces apoptosis by activating cytochrome c/caspase-9 pathway. **Virology**, v.318, n.1, p.169-82. 2004.

LIVONESI, M. C.;DE SOUSA, R. L.;BADRA, S. J. e FIGUEIREDO, L. T. In vitro and in vivo studies of ribavirin action on Brazilian Orthobunyavirus. **Am J Trop Med Hyg**, v.75, n.5, p.1011-6. 2006.

LIVONESI, M. C.;DE SOUSA, R. L.;BADRA, S. J. e FIGUEIREDO, L. T. In vitro and in vivo studies of the Interferon-alpha action on distinct Orthobunyavirus. **Antiviral Res**, v.75, n.2, p.121-8. 2007.

LIVONESI, M. C.;MORO DE SOUSA, R. L. e MORAES FIGUEIREDO, L. T. In vitro study of antiviral activity of mycophenolic acid on Brazilian orthobunyaviruses. **Intervirol**, v.50, n.3, p.204-8. 2007.

- LUDWIG, G. V.;ISRAEL, B. A.;CHRISTENSEN, B. M.;YUILL, T. M. e SCHULTZ, K. T. Role of La Crosse virus glycoproteins in attachment of virus to host cells. **Virology**, v.181, n.2, p.564-71. 1991.
- MARTIN, U.;JARASCH, N.;NESTLER, M.;RASSMANN, A.;MUNDER, T.;SEITZ, S.;ZELL, R.;WUTZLER, P. e HENKE, A. Antiviral effects of pan-caspase inhibitors on the replication of coxsackievirus B3. **Apoptosis**, v.12, n.3, p.525-33. 2007.
- MATSUYAMA, S.;LLOPIS, J.;DEVERAUX, Q. L.;TSIEN, R. Y. e REED, J. C. Changes in intramitochondrial and cytosolic pH: early events that modulate caspase activation during apoptosis. **Nat Cell Biol**, v.2, n.6, p.318-25. 2000.
- MERCER, J. e HELENIUS, A. Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells. **Science**, v.320, n.5875, p.531-5. 2008.
- MIR, M. A. e PANGANIBAN, A. T. The bunyavirus nucleocapsid protein is an RNA chaperone: possible roles in viral RNA panhandle formation and genome replication. **RNA**, v.12, n.2, p.272-82. 2006.
- MIURA, M.;FRIEDLANDER, R. M. e YUAN, J. Tumor necrosis factor-induced apoptosis is mediated by a CrmA-sensitive cell death pathway. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.92, n.18, p.8318-22. 1995.
- MOFFATT, S.;YAEGASHI, N.;TADA, K.;TANAKA, N. e SUGAMURA, K. Human parvovirus B19 nonstructural (NS1) protein induces apoptosis in erythroid lineage cells. **J Virol**, v.72, n.4, p.3018-28. 1998.
- MORELI, M. L.;AQUINO, V. H.;CRUZ, A. C. e FIGUEIREDO, L. T. Diagnosis of Oropouche virus infection by RT-nested-PCR. **J Med Virol**, v.66, n.1, p.139-42. 2002.
- MORI, I.;NISHIYAMA, Y.;YOKOCHI, T. e KIMURA, Y. Virus-induced neuronal apoptosis as pathological and protective responses of the host. **Rev Med Virol**, v.14, n.4, p.209-16. 2004.
- NAKAGAWA, T.;ZHU, H.;MORISHIMA, N.;LI, E.;XU, J.;YANKNER, B. A. e YUAN, J. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. **Nature**, v.403, n.6765, p.98-103. 2000.
- NEIL, J. C.;CAMERON, E. R. e BAXTER, E. W. p53 and tumour viruses: catching the guardian off-guard. **Trends Microbiol**, v.5, n.3, p.115-20. 1997.
- NGUYEN, M. L.;KRAFT, R. M.;AUBERT, M.;GOODWIN, E.;DIMAIO, D. e BLAHO, J. A. p53 and hTERT determine sensitivity to viral apoptosis. **J Virol**, v.81, n.23, p.12985-95. 2007.
- NICHOL, S. T. Bunyaviridae. In: KNIPE, D. M. **FIELDS Virology**. Philadelphia: Lippincott-Williams, v.2, 2001. p.1603-1633.

NICOLETTI, I.;MIGLIORATI, G.;PAGLIACCI, M. C.;GRIGNANI, F. e RICCARDI, C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **J Immunol Methods**, v.139, n.2, p.271-9. 1991.

NOMURA-TAKIGAWA, Y.;NAGANO-FUJII, M.;DENG, L.;KITAZAWA, S.;ISHIDO, S.;SADA, K. e HOTTA, H. Non-structural protein 4A of Hepatitis C virus accumulates on mitochondria and renders the cells prone to undergoing mitochondria-mediated apoptosis. **J Gen Virol**, v.87, n.Pt 7, p.1935-45. 2006.

NUNES, M. R.;MARTINS, L. C.;RODRIGUES, S. G.;CHIANG, J. O.;AZEVEDO RDO, S.;DA ROSA, A. P. e VASCONCELOS, P. F. Oropouche virus isolation, southeast Brazil. **Emerg Infect Dis**, v.11, n.10, p.1610-3. 2005.

O'BRIEN, V. Viruses and apoptosis. **J Gen Virol**, v.79 (Pt 8), p.1833-45. 1998.

OBERHAUS, S. M.;SMITH, R. L.;CLAYTON, G. H.;DERMODY, T. S. e TYLER, K. L. Reovirus infection and tissue injury in the mouse centralnervous system are associated with apoptosis. **J Virol**, v.71, n.3, p.2100-6. 1997.

PATTERSON, J. L.;HOLLOWAY, B. e KOLAKOFSKY, D. La Crosse virions contain a primer-stimulated RNA polymerase and a methylated cap-dependent endonuclease. **J Virol**, v.52, n.1, p.215-22. 1984.

PARQUET, M. C.;KUMATORI, A.;HASEBE, F.;MATHENGE, E. G. e MORITA, K. St. Louis encephalitis virus induced pathology in cultured cells. **Arch Virol**, v.147, n.6, p.1105-19. 2002.

PEKOSZ, A.;PHILLIPS, J.;PLEASURE, D.;MERRY, D. e GONZALEZ-SCARANO, F. Induction of apoptosis by La Crosse virus infection and role of neuronal differentiation and human bcl-2 expression in its prevention. **J Virol**, v.70, n.8, p.5329-35. 1996.

PESONEN, M.;KUISMANEN, E. e PETTERSSON, R. F. Monosaccharide sequence of protein-bound glycans of Uukuniemi virus. **J Virol**, v.41, n.2, p.390-400. 1982.

PICHLMAIR, A.;SCHULZ, O.;TAN, C. P.;NASLUND, T. I.;LILJESTROM, P.;WEBER, F. e REIS E SOUSA, C. RIG-I-mediated antiviral responses to single-stranded RNA bearing 5'-phosphates. **Science**, v.314, n.5801, p.997-1001. 2006.

PINHEIRO, F. P.;HOCH, A. L.;GOMES, M. L. e ROBERTS, D. R. Oropouche virus. IV. Laboratory transmission by *Culicoides paraensis*. **Am J Trop Med Hyg**, v.30, n.1, p.172-6. 1981.

PINHEIRO, F. P.;ROCHA, A. G.;FREITAS, R. B.;OHANA, B. A.;TRAVASSOS DA ROSA, A. P.;ROGERIO, J. S. e LINHARES, A. C. [Meningitis associated with Oropouche virus infections]. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v.24, n.4, p.246-51. 1982.

- PINHEIRO, F. P.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P.; TRAVASSOS DA ROSA, J. F.; ISHAK, R.; FREITAS, R. B.; GOMES, M. L.; LEDUC, J. W. e OLIVA, O. F. Oropouche virus. I. A review of clinical, epidemiological, and ecological findings. **Am J Trop Med Hyg**, v.30, n.1, p.149-60. 1981.
- PINHEIRO, F. P. T. D. R., A. P. A.; VASCONCELOS, P. F. C. Febre por Oropouche. In: LEÃO, R. N. Q. **Doenças infecciosas e parasitárias. Enfoque amazônico**. Belém: CEJUP, 1997. p.285-298.
- RAMSEY-EWING, A. e MOSS, B. Apoptosis induced by a postbinding step of vaccinia virus entry into Chinese hamster ovary cells. **Virology**, v.242, n.1, p.138-49. 1998.
- RAVINDRA, P. V.; TIWARI, A. K.; RATTA, B.; CHATURVEDI, U.; PALIA, S. K. e CHAUHAN, R. S. Newcastle disease virus-induced cytopathic effect in infected cells is caused by apoptosis. **Virus Res**, v.141, n.1, p.13-20. 2009.
- REED, L. J. e MUENCH, H. A simple method of estimating 50 per cent end point. **American Journal of Hygiene**, v.27, n.39, p.493-497. 1938.
- RODRIGUES, A. H. **Desenvolvimento de um Modelo Experimental de Infecção Subcutânea por Vírus Oropouche em Hamster**. Depto. Biologia Celular, Molecular e Bioagentes Patogênicos. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2004. 67 p.
- ROULSTON, A.; MARCELLUS, R. C. e BRANTON, P. E. Viruses and apoptosis. **Annu Rev Microbiol**, v.53, p.577-628. 1999.
- SAEED, M. F.; NUNES, M.; VASCONCELOS, P. F.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P.; WATTS, D. M.; RUSSELL, K.; SHOPE, R. E.; TESH, R. B. e BARRETT, A. D. Diagnosis of Oropouche virus infection using a recombinant nucleocapsid protein-based enzyme immunoassay. **J Clin Microbiol**, v.39, n.7, p.2445-52. 2001.
- SAEED, M. F.; WANG, H.; NUNES, M.; VASCONCELOS, P. F.; WEAVER, S. C.; SHOPE, R. E.; WATTS, D. M.; TESH, R. B. e BARRETT, A. D. Nucleotide sequences and phylogeny of the nucleocapsid gene of Oropouche virus. **J Gen Virol**, v.81, n.Pt 3, p.743-8. 2000.
- SAMBROOK, J. e RUSSELL, D. W. Isolation of high-molecular-weight DNA from mammalian cells using proteinase K and phenol In: SAMBROOK, J. e RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning - A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Press, v.1, 2001. p.6.4.
- SAMUEL, M. A.; MORREY, J. D. e DIAMOND, M. S. Caspase 3-dependent cell death of neurons contributes to the pathogenesis of West Nile virus encephalitis. **J Virol**, v.81, n.6, p.2614-23. 2007.
- SANTOS, R. I.; RODRIGUES, A. H.; SILVA, M. L.; MORTARA, R. A.; ROSSI, M. A.; JAMUR, M. C.; OLIVER, C. e ARRUDA, E. Oropouche virus entry into HeLa cells involves clathrin and requires endosomal acidification. **Virus Res**, v.138, n.1-2, p.139-43. 2008.

SANTOS, R. I. M. **Infecção Experimental de Camundongos BALB/c Neonatos Inoculados Pela Via Subcutânea com Vírus Oropouche**. Departamento de Biologia Celular, Molecular e Bioagentes Patogênicos., Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2008.

SAVILL, J. e FADOK, V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. **Nature**, v.407, n.6805, p.784-8. 2000.

SCHEFFNER, M.;MUNGER, K.;BYRNE, J. C. e HOWLEY, P. M. The state of the p53 and retinoblastoma genes in human cervical carcinoma cell lines. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.88, n.13, p.5523-7. 1991.

SCHMALJOHN, C. S. e HOOPER, J. W. Bunyaviridae: the viruses and their replication. In: KNIPE, D. M. **FIELDS Virology**. Philadelphia: Lipincott-Williams & Wilkins, v.1, 2006.

SHIH, S. R.;WENG, K. F.;STOLLAR, V. e LI, M. L. Viral protein synthesis is required for Enterovirus 71 to induce apoptosis in human glioblastoma cells. **J Neurovirol**, v.14, n.1, p.53-61. 2008.

SHRESTHA, B.;GOTTLIEB, D. e DIAMOND, M. S. Infection and injury of neurons by West Nile encephalitis virus. **J Virol**, v.77, n.24, p.13203-13. 2003.

SILVA, A. F. **PCR em Tempo Real para Detecção Específica de RNAs (+) e (-) de Vírus Oropouche**. Depto. Biologia Celular, Molecular e Bioagentes Patogênicos, Universidade de São Paulo, Ribeirao Preto, 2008. 51 p.

SLEE, E. A.;HARTE, M. T.;KLUCK, R. M.;WOLF, B. B.;CASIANO, C. A.;NEWMAYER, D. D.;WANG, H. G.;REED, J. C.;NICHOLSON, D. W.;ALNEMRI, E. S.;GREEN, D. R. e MARTIN, S. J. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. **J Cell Biol**, v.144, n.2, p.281-92. 1999.

SOARES, M. M.;KING, S. W. e THORPE, P. E. Targeting inside-out phosphatidylserine as a therapeutic strategy for viral diseases. **Nat Med**, v.14, n.12, p.1357-62. 2008.

STREITENFELD, H.;BOYD, A.;FAZAKERLEY, J. K.;BRIDGEN, A.;ELLIOTT, R. M. e WEBER, F. Activation of PKR by Bunyamwera virus is independent of the viral interferon antagonist NSs. **J Virol**, v.77, n.9, p.5507-11. 2003.

TAN, Y. X.;TAN, T. H.;LEE, M. J.;THAM, P. Y.;GUNALAN, V.;DRUCE, J.;BIRCH, C.;CATTON, M.;FU, N. Y.;YU, V. C. e TAN, Y. J. Induction of apoptosis by the severe acute respiratory syndrome coronavirus 7a protein is dependent on its interaction with the Bcl-XL protein. **J Virol**, v.81, n.12, p.6346-55. 2007.

TESH, R. B. The emerging epidemiology of Venezuelan hemorrhagic fever and Oropouche fever in tropical South America. **Ann N Y Acad Sci**, v.740, p.129-37. 1994.

- THORNBERRY, N. A. e LAZEBNIK, Y. Caspases: enemies within. **Science**, v.281, n.5381, p.1312-6. 1998.
- TYLER, K. L.;SQUIER, M. K.;RODGERS, S. E.;SCHNEIDER, B. E.;OBERHAUS, S. M.;GRDINA, T. A.;COHEN, J. J. e DERMODY, T. S. Differences in the capacity of reovirus strains to induce apoptosis are determined by the viral attachment protein sigma 1. **J Virol**, v.69, n.11, p.6972-9. 1995.
- VASCONCELOS, P. F.;TRAVASSOS DA ROSA, A. P.;RODRIGUES, S. G.;TRAVASSOS DA ROSA, E. S.;DEGALLIER, N. e TRAVASSOS DA ROSA, J. F. Inadequate management of natural ecosystem in the Brazilian Amazon region results in the emergence and reemergence of arboviruses. **Cad Saude Publica**, v.17 Suppl, p.155-64. 2001.
- WANG, H.;BEASLEY, D. W.;LI, L.;HOLBROOK, M. R. e BARRETT, A. D. Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of the medium RNA segment of Oropouche, a Simbu serogroup virus: comparison with the middle RNA of Bunyamwera and California serogroup viruses. **Virus Res**, v.73, n.2, p.153-62. 2001.
- WANG, X. W.;HUSSAIN, S. P.;HUO, T. I.;WU, C. G.;FORGUES, M.;HOFSETH, L. J.;BRECHOT, C. e HARRIS, C. C. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. **Toxicology**, v.181-182, p.43-7. 2002.
- WATANABE, Y.;SHIRATSUCHI, A.;SHIMIZU, K.;TAKIZAWA, T. e NAKANISHI, Y. Role of phosphatidylserine exposure and sugar chain desialylation at the surface of influenza virus-infected cells in efficient phagocytosis by macrophages. **J Biol Chem**, v.277, n.20, p.18222-8. 2002.
- WEBER, F.;WAGNER, V.;RASMUSSEN, S. B.;HARTMANN, R. e PALUDAN, S. R. Double-stranded RNA is produced by positive-strand RNA viruses and DNA viruses but not in detectable amounts by negative-strand RNA viruses. **J Virol**, v.80, n.10, p.5059-64. 2006.
- WEIDMANN, M.;RUDAZ, V.;NUNES, M. R.;VASCONCELOS, P. F. e HUFERT, F. T. Rapid detection of human pathogenic orthobunyaviruses. **J Clin Microbiol**, v.41, n.7, p.3299-305. 2003.
- WILLIAMSON, P. e SCHLEGEL, R. A. Back and forth: the regulation and function of transbilayer phospholipid movement in eukaryotic cells. **Mol Membr Biol**, v.11, n.4, p.199-216. 1994.
- YANASE, N.;OHSHIMA, K.;IKEGAMI, H. e MIZUGUCHI, J. Cytochrome c release, mitochondrial membrane depolarization, caspase-3 activation, and Bax-alpha cleavage during IFN-alpha-induced apoptosis in Daudi B lymphoma cells. **J Interferon Cytokine Res**, v.20, n.12, p.1121-9. 2000.
- YEE, C.;KRISHNAN-HEWLETT, I.;BAKER, C. C.;SCHLEGEL, R. e HOWLEY, P. M. Presence and expression of human papillomavirus sequences in human cervical carcinoma cell lines. **Am J Pathol**, v.119, n.3, p.361-6. 1985.

MANUSCRITO DO TRABALHO A SER ENVIADO
PARA PUBLICAÇÃO EM PERIÓDICO

Gustavo Olszanski Acrani

**Apoptosis Induced by Oropouche Virus Infection in HeLa Cells is Dependent
on Virus Protein Expression.**

Ribeirão Preto - 2009

Apoptosis Induced by Oropouche virus Infection in HeLa Cells is Dependent on Virus Protein Expression.

Gustavo Olszanski Acrani¹; Rogério Gomes¹; José Luiz Proença-Módena¹; Patricia de Oliveira Carminati²; Eurico de Arruda Neto¹.

1.Department of Cell Biology, Ribeirão Preto School of Medicine, University of São Paulo. Ribeirão Preto-SP, Brazil, 14049-900.

2.Department of Genetics, Ribeirão Preto School of Medicine, University of São Paulo. Ribeirão Preto-SP, Brazil, 14049-900.

e-mail: goacrani@usp.br

ABSTRACT

Oropouche (OROV) is a single-stranded RNA virus of the family *Bunyaviridae*, genus *Orthobunyavirus*, which causes the second most frequent acute arboviral febrile illness in Brazil, where over half a million cases have been recorded in the past 30 years. OROV fever has been registered almost exclusively in the Amazon region, but global warming, deforestation and redistribution of vectors and reservoir animals, increase the risk of Oropouche virus dissemination to other areas of Brazil and South America. Virus isolation was also described in patients in Peru, Venezuela, Panama and Trinidad. OROV causes a highly cytolytical infection in cultured cells with characteristic cytopathic effect appearing 48 hours post infection. OROV experimental infection in hamsters induces serious involvement of the central nervous system, with virtually no inflammation and necrosis. We assessed whether apoptosis plays a role in OROV induced death of HeLa cells. Infection of HeLa cells by OROV resulted in DNA fragmentation, detected by gel electrophoresis and by analysis of the Sub-G1 population on cell cycle analysis by flow cytometry at 36 hours post infection. Activation of caspase 9, caspase 3 and release of cytochrome C from the mitochondrial membrane was also detected during viral infection, as shown by western blot analysis. UV inactivated OROV did not induce apoptosis in this model, revealing that virus-cell binding was not sufficient to induce it. The treatment of

cells with chloroquine and cycloheximide indicated that viral uncoating and replication are needed for apoptosis induction. Furthermore, treatment of the cells with pan-caspase inhibitor prevented OROV-induced apoptosis without affecting virus replication. Our results show that apoptosis is an important consequence of OROV virus infection *in vitro*, which occurred by an intracellular pathway involving the mitochondria, triggered during the process of viral protein synthesis and replication.

Financial support: CNPq/FAEPA/FAPESP.

Key Words: Emerging viruses, Oropouche Virus, Bunyaviridae, Apoptosis, Caspases.

INTRODUCTION

Oropouche virus (OROV) is an emerging zoonotic arbovirus of the family *Bunyaviridae*, genus *Orthobunyavirus*, serogroup *Simbu* (SCHMALJOHN, HOOPER, 2006), which causes human epidemics in urban areas of Tropical South America. The infection in humans is clinically characterized by fever, myalgia, headache, arthralgia, skin rash and malaise, that can last several days (PINHEIRO, 1981). While OROV fever has been registered almost exclusively in the Amazon region, global warming, deforestation and redistribution of the vectors and reservoir animals increase the risk of OROV spreading to other areas of the Americas.

Apoptosis is an evolutionary conserved mechanism of cell suicide, critical for embryonic development and tissue homeostasis of multicellular organisms. The apoptosis process is activated by a variety of extracellular and intracellular stimuli and involves different signals (HENGARTNER, 2000). Apoptotic cells display specific morphological and biochemical features that distinguish them from living cells and from necrotic cells (HENGARTNER, 2000). Apoptotic cells are characterized by detachment, shrinkage and rounding, plasma membrane blebbing, nuclear collapse and chromatin condensation. There is also an important loss of membrane phospholipid asymmetry, nuclear fragmentation and caspase activation (KROEMER, 2009). Ultimately cells are fragmented into apoptotic bodies that are rapidly phagocytosed by neighboring cells or phagocytes, without concomitant inflammation or tissue damage.

This programmed cell death mechanism plays an important role on host protection eliminating cells damaged by irradiation, chemical injuries or virus infections (O'BRIEN, 1998). Virus-infected cells can be eliminated by apoptosis by cytotoxic T lymphocytes recognition and by the activation of the innate immune system, which includes cytokine production (interferons and tumor necrosis factor), and the involvement of specialized phagocytic cells, such as natural killers and macrophages (EVERETT, MCFADDEN, 1999; ROULSTON, 1999). On the other hand, viruses have evolved strategies to regulate apoptosis, either by blocking a specific step of the cascade, preventing premature death of the host cell and maximizing virus production, or by actively inducing apoptosis, which consequently facilitates the spreading of virus progeny to neighboring cells while limiting host inflammatory and other immune responses (O'BRIEN, 1998).

Virus replication in the host cell is necessary for induction of apoptosis by many types of viruses (ROULSTON, 1999). However, the induction of cell death in the absence of viral replication has been reported in cells infected by type 3 reovirus (TYLER, 1995), avian leukosis virus (BROJATSCH, 1996), human herpes simplex 1 (AUBERT, 1999), bovine herpesvirus (HANON, 1997), vaccinia virus (RAMSEY-EWING, 1998) and Sindbis virus (JAN, 1999).

OROV causes a highly cytolytical infection in cultured cells with characteristic cytopathic effect appearing 48 hours post infection. We assessed whether apoptosis plays a role in OROV induced death of HeLa cells. We have examined DNA fragmentation, caspase 3 and 9 activation and cytochrome c release. Moreover, to determine the step in OROV life cycle that triggers the signal for cell death, we have examined DNA fragmentation on infected HeLa cells using UV-inactivated virus, inhibitors of protein synthesis, and lysosomotropic drugs to block the virus uncoating. It is proposed that apoptosis is an important consequence of OROV virus infection *in vitro*, which is initiated in a postbinding step, after virus uncoating, and that OROV gene expression is required to induce the apoptotic process. Moreover, the use of the pan-caspase inhibitor Z-VAD-FMK showed that virus replication is not affected by apoptosis inhibition.

RESULTS

Characterization of the OROV-induced apoptosis in HeLa cells

HeLa cell cultures were incubated with OROV strain BeAn19991, resulting in a lytic cycle during productive infection, with maximum cytopathic effect observed after 48 hours post infection (data not shown). To evaluate whether apoptosis is the cause of cell death, we employed different methods to access the state of the DNA in the infected cells. As shown in Figures 1A and 1B, flow cytometric measure of cellular DNA content stained with Propidium Iodide indicates an increase of fragmented DNA in the hypoploid sub-G1 peak (gate M1 in the figure) of the cell cycle from 12 hours post infection (5% of apoptotic cells), 24hpi (30% of apoptotic cells) with a maximum peak at 36hpi (75% of apoptotic cells). The final point observed on this experiment corresponds to the maximal cytopathic effect observed, which is after 48 hours post infection, with more than 90% of the cells presenting fragmented DNA.

To evaluate the DNA fragmentation observed during OROV infection, DNA extracted from OROV infected HeLa cells were analyzed at the indicated times (Fig. 1C). Samples from mock-infected or infected cells were electrophoresed in 1.5% agarose gels, revealing an intense internucleosomal fragmentation, which is indicative of apoptosis. This feature was observed in OROV-infected cells at 24, 36 and 48 hpi, which indicates that *in vitro* infection of HeLa cells with OROV causes DNA fragmentation from 24 hours post infection. No DNA laddering was observed in mock-infected cells or in cells analyzed at 12 hpi.

In order to understand the mechanism of OROV induced apoptosis, we investigated the role of different molecules that are involved with the apoptosis process. Therefore, we have studied the release of cytochrome *c* (cyt *c*) from the mitochondria membrane to the cytosol of HeLa cells at different times after OROV infection. As shown in Fig. 2A, cyt *c* was less detected in the mitochondrial cell fraction (HM) of infected cells at 36 and 48 hpi, suggesting an intense release of this protein at these respective moments post infection. In order to prove that these fractions contained

mitochondrial proteins, a specific blotting was conducted using an antibody against mitochondrial Hsp70 protein (Fig. 2B).

Conserved cellular proteases named caspases have been shown to play a central role in apoptosis. Therefore, we have analyzed whether OROV infection induces caspase activity in HeLa cells. The caspases exist as inactive procaspases that are activated during the apoptotic process. Once this protein is activated it can be detected by fluorogenic substrates or specific antibodies. We assessed whether the final effector caspase 3 was active on OROV infected HeLa cells using the fluorogenic peptide (Z-Asp-Glu-Val-Asp)₂-rhodamine-110 (Calbiochem) analyzed by flow cytometry (fig. 2C). We observed that after 12, 24 and 36 hours post infection the activation of caspase 3 was very substantial (24%, 99% and 69% of analyzed cells, respectively), which decreased after 48 hours (0.46% of cells with caspase 3 activity).

Furthermore, cellular extracts were obtained at different times after infection and 30µg of this extract were analyzed by western blot using a specific anti-caspase 9 antibody. Figure 2D shows that infection with OROV induces the processing of caspase-9 from its 47kDa precursor into an active form (37kDa) at 24 and 36 hours post infection. The active form of caspase 9 could not be detected in mock-infected cells and at 12 and 48 hours post infection.

Apoptosis is induced after OROV internalization and uncoating

We next investigated when the apoptosis process is triggered on HeLa cells during the virus infective cycle. Therefore, we have used HeLa cells inoculated with UV-inactivated OROV and the percentage of fragmented DNA was analyzed at 36 hours post infection by the flow cytometric measurement of cellular DNA content in the hypoploid sub-G1 peak. As a result, low amounts of infective viruses were produced in cells infected by UV-inactivated OROV (Fig. 3A), indicating that no significant viral replication has occurred. Furthermore, the DNA content analysis showed that only 4.76% of the cells showed nuclear fragmentation (Fig. 3B), which is significantly lower than what is expected on virus infected cells (44.27%), suggesting that virus attachment is not

sufficient for apoptosis induction on OROV infected HeLa cells, and that the eventually entry of viral particles on the host cell is an important event.

In order to determine the step after OROV internalization that triggers the apoptotic cascade, we have studied the effects of an inhibitor of virus uncoating in the induction of apoptosis by OROV in HeLa cells. We have reported previously (SANTOS, 2008) that OROV enters into HeLa cells by an endocytosis mechanism involving clathrin coated vesicles, and that endosomal acidification is necessary for viral uncoating. Therefore, we used chloroquine, a drug that inhibits endosomal acidification, to assess whether viral uncoating is necessary to apoptosis induction on OROV infected HeLa cells. HeLa cells were treated with chloroquine one hour prior to the virus inoculation and the infected cells were harvested at 36 hours post infection in order to analyze viral titer and the state of DNA fragmentation. As shown in Figure 3C, virus production was compromised after treatment with the drug, as revealed by the virus titration of these infected cells. Moreover, infected cells treated with chloroquine showed a significant reduction on DNA fragmentation (15.19% of analyzed cells), when compared to infected cells without the drug treatment (65.37% of analyzed cells) (Fig. 3D). These data suggest that viral uncoating is necessary for the induction of apoptosis on OROV infected HeLa cells.

Induction of apoptosis by OROV requires virus replication and protein synthesis

Cicloheximide (CHX), which is an effective inhibitor of protein synthesis, was then used to determine if viral protein synthesis is necessary for apoptosis induction on OROV infected cells. HeLa cell cultures were treated with the drug one hour prior to virus inoculation and the infected cells were harvested at 36 hours post infection in order to analyze viral titer and the state of DNA fragmentation. As shown in Figure 4A, virus production was compromised after treatment with the drug. Furthermore, infected cells treated with CHX showed a significant reduction of DNA fragmentation (32.19% of analyzed cells), when compared to infected cells without the drug treatment (87.48% of analyzed cells) (Fig. 4B). In addition, the treatment of the cells with actinomycin D in the presence of CHX still induced apoptosis on these cells (Fig. 4B), which indicates that the

protein synthesis inhibition promoted by CHX at the used concentration did not interfere with the mechanisms involved with apoptosis induction. Therefore, these data suggest that viral protein synthesis is necessary for the induction of apoptosis on OROV infected HeLa cells. HeLa cell cultures treated with CHX without viral inoculation presented a low percentage of fragmented nuclear material (23.04%), which is significantly close to the percentage of fragmented DNA of cell cultures with no treatment at all (9.55%), suggesting that the effect of apoptosis inhibition due to the action of CHX itself on the cells is a result of viral replication inhibition.

To define more accurately the time at which the drug CHX performed its inhibitory action, DNA fragmentation was analyzed in extracts of OROV-infected HeLa cells after CHX was added at different times and collected at 36 hours post infection. As shown in Fig. 4C, a significant reduction of 10000 times of viral titer was observed when the drug was introduced to the cell culture at one hour prior to virus infection (-1h) and at the same moment the virus was introduced (0h). Furthermore, when CHX is added until seven hours after virus inoculation the virus production is still lower than the control experiment (approximately $1 \times 10^{4.5}$ TCID₅₀/mL), which is 100 times lower than the positive control ($1 \times 10^{6.0}$ TCID₅₀/mL). On the other hand, if CHX is added from eight to 12 hours after virus inoculation the effect of the drug on virus titer is not substantial ($1 \times 10^{5.25}$ TCID₅₀/mL, which is only 10 times lower than positive control). This result suggests that at the seven first hours after OROV inoculation the inhibition of protein synthesis interferes with viral production.

As shown in Figure 4D, there was a significant reduction of DNA fragmentation when the drug was added at one hour before virus inoculation (18% of analyzed cells) and at the same time as the virus was added (15% of analyzed cells), and until two hours after virus inoculation (21% of cells). When the drug was added after three (38% of cells) and four hours (45%) after virus inoculation the percentage of fragmented DNA is almost half of the positive control (64% of analyzed cells). After this period, the percentage of fragmented cells is closer to the positive control, suggesting that the DNA fragmentation was released from CHX inhibition at 4 hpi ($p=0.0272$), a time that virus production is still low. Therefore, we conclude that the process of apoptosis is triggered on HeLa cells sometime at the first four hours after OROV inoculation. Since the peak of virus

production occurs at this moment (Fig. 4C), we suggest that some viral protein(s) might play an important role at the process of apoptosis induction on this model.

Caspase Inhibition does not Influence OROV Replication

Having demonstrated significant activation of both caspase 9 and 3 in virus-infected HeLa cell cultures, and that the apoptosis activation on this model is dependent on virus replication and protein synthesis, we next determined the effect of caspase inhibition on virus-induced cell death. DNA fragmentation in the hypoploid sub-G1 peak was assessed on HeLa infected cells by flow cytometric measure in the presence and absence of a broadly acting pan-caspase inhibitor, Z-VAD-FMK (Promega). This drug significantly protected HeLa cells from virus-induced apoptosis at 36 hours post infection, with a 88% reduction in the levels of DNA fragmentation compared to untreated infected cells (Fig. 5A). Furthermore, the cytopathic effect on these cells was reduced when the cells were treated with this drug. Cells treated with ZVAD and actinomycin D (Fig. 5A) also had the percentage of fragmented DNA reduced, which proves that the activity of the drug is efficient on the apoptosis inhibition independently of the stimulus. On the other hand, the addition of Z-VAD-FMK to the OROV infected cell culture did not interfere with the replication of the virus, as detected by virus titration assays (Fig. 5B). These results suggest that caspase inhibition protects infected cells against virus-induced apoptotic death. Therefore, we conclude that in the presence of Z-VAD-FMK the virus replication is not reduced, but the apoptotic response is absent, indicating that on this particular model the apoptosis process is not an essential condition for OROV replication.

DISCUSSION

On virus-infected cells, the induction of early cell death can limit the virus production, which reduces the spread of progeny in the host. Therefore, many animal viruses have evolved strategies to evade or delay early apoptosis to allow production of high yields of progeny virus. On the other hand, apoptosis is also considered an efficient mechanism by which viruses can induce cell death and disseminate progeny while

limiting induction of inflammatory and immune responses on the host (ROULSTON, 1999).

We now have demonstrated the importance of apoptosis as a consequence of Oropouche virus-induced cytopathic effect on HeLa cells. Our study is the first to demonstrate the relation of the apoptotic process and its influence on virus replication for this important South American arbovirus. Therefore, we have studied the mechanisms by which the virus induces apoptosis in the infected cell. The fragmentation of cellular DNA could be detected after 24 hours post infection in OROV-infected HeLa cells, a time at which viral production is very accentuated. The DNA fragmentation is an important morphological characteristic of apoptotic cells, and this phenomena is caused by the DNA cleaving capacity of endonucleases that are activated during this process (KROEMER, 2009).

It is well characterized that cytochrome c is an important factor released from the mitochondria into the cytosol of cells that are under apoptosis (HENGARTNER, 2000). When released, cytochrome c binds to the cytoplasmic protein Apaf-1, and acts as a cofactor in the activation of caspase 9, forming a complex known as the apoptosome. Thus, cytochrome c release from the mitochondria can be considered a key signal that initiates the irreversible events in cell death (EVERETT, 2001). During OROV infection, cytochrome c was shown to be released from the mitochondria portion of infected cells after 36 hours, suggesting that apoptosis induced by this virus involves the mitochondrial pathway.

The activation of caspases is another important event of the apoptosis cascade. Caspases are activated either via the receptor-mediated pathway, leading to the activation of caspase-8, or the mitochondrial pathway. On the later, proapoptotic members of the Bcl-2 family bind to the mitochondria and induce the release of cytochrome c and other proteins which leads to the activation of procaspase 9, and consequently, the effector caspases, such as caspase 3. We report here that OROV infection activates caspase 3 and caspase 9 at 24 hours post infection. These results, together with those obtained on the cytochrome c release, suggest that OROV induces apoptosis through the mitochondrial rather than the receptor-mediated pathway.

The induction of apoptosis can occur in the absence of viral replication, at an early stage of the virus cycle, as already has been reported for several viruses, such as african swine fever virus, which induces apoptosis in Vero cells during viral uncoating (CARRASCOSA, 2002), a phenomena that was also observed for the avian reovirus (LABRADA, 2002). Furthermore, for some viruses, at least one specific viral protein is involved with the apoptotic process: sigma-1 attachment protein in type 3 reovirus (TYLER, 1995), Env protein interacting with TNF receptor component in avian leukosis virus (BROJATSCH, 1996), virion LIR protein in vaccinia virus (RAMSEY-EWING, 1998), or surface glycoproteins E2 and E1 in Sindbis virus (JAN, 1999).

On the other hand, it is well known that viral replication is required for the induction of apoptosis during cell infection by many types of viruses (SHIH, 2008). We have demonstrated that in the case of OROV, virus binding to the cell receptor is not sufficient to induce the apoptotic process, as was demonstrated by the inoculation of UV-inactivated virions on HeLa cell cultures. According to this observation it was stated that OROV needs to penetrate the host cell in order to trigger the mechanisms of cell death, excluding the possibility of induction of apoptosis by the interaction of the virus with components of the cellular membrane during virus entry. This result is similar to that obtained with UV inactivated herpes simplex virus 1 in human HEp-2 cells (AUBERT, 1999), which was not observed for UV inactivated vaccinia virus in nonpermissive CHO cells (RAMSEY-EWING, 1998) and avian reovirus (LABRADA, 2002).

We next analyzed if viral uncoating was necessary for apoptosis induction on OROV-infected HeLa cells. We have previously shown that endosomal acidification is necessary for OROV uncoating on HeLa cells (SANTOS, 2008). In the present study, we have demonstrated that DNA fragmentation of the infected cells is reduced in OROV-infected HeLa cells incubated in the presence of chloroquine. This fact indicates that the proper uncoating of OROV particles was necessary for the induction of the apoptotic signal.

We also demonstrated that genome replication and viral protein synthesis was required for the induction of apoptosis, since DNA fragmentation was not detected in HeLa cells infected with OROV in the presence of cicloheximide (CHX), which can reduce the cytoplasmic protein synthesis. Furthermore, the effect of time of addition of

CHX was consistent with that expected for an inhibitor of virus protein synthesis: the fragmentation of cellular DNA was released from CHX inhibition at 4 hours after virus inoculation ($p=0.0272$). It is possible that a death signal could arise by interactions between viral proteins expressed after viral uncoating at this moment. Since the treatment of the cells with CHX at the presence of actinomycin D did not inhibit apoptosis, we suggest that CHX at the given concentration did not interfere with the cellular protein synthesis in a way that could affect the apoptosis process.

Our results suggest that the apoptotic signal in OROV-infected HeLa cells is triggered during virus replication, after virus internalization and uncoating. Our data also indicate that this process most likely occurs during viral protein synthesis. Therefore, it is possible to propose that one or more viral proteins may be involved on this process. It has been discussed whether the non-structural protein (NSs) of different viruses from the Bunyaviridae family is involved on the induction of apoptosis and interferon expression (BRIDGEN, 2001; KOHL, 2003; BLAKQORI, 2007; BLAKQORI and WEBER, 2005). It was also reported that this non structural protein from the La Crosse Bunyavirus presents a sequence homology with the *Drosophila* apoptosis inducer protein Reaper (COLON-RAMOS, 2003). Therefore, the importance of this OROV NSs protein is currently being addressed by our group.

We observed that when HeLa cells were treated with the pan-caspase inhibitor Z-VAD-FMK the inoculation of OROV did not induce apoptosis, but the viral progeny was not altered. Therefore, it is possible to conclude that, *in vitro*, the apoptotic process is not an essential condition for OROV replication. It was noticed that even though cells treated with this drug and infected with the virus produced an infective progeny with the same titer as cells not treated, these cells did not present the same morphological cytopathic effect, which indicates that this effect observed on cells infected by OROV are caused by apoptotic process.

It is known that the inhibition of apoptosis on host cells can affect the replication of viruses on different diseases. It has been demonstrated that virus replication is not affected when apoptosis is blocked on West Nile Virus infection (KLEINSCHMIDT, 2007), Coxsackie B3 (MARTIN, 2007), Japanese Encephalitis Virus (CHANG, 2005) and Vesicular Stomatitis Virus (HOBBS, 2001). However, the present results were

conducted on an *in vitro* model, using cell cultures, which are deprived from the host immune system. Therefore, these results cannot be considered to be reproduced on an animal model. However, since OROV could replicate on either cells that showed the apoptotic phenotype and cells with this process inhibited, it can be concluded that the apoptotic process is not a restrictive process for virus replication, but a mechanism that could facilitate viral dissemination *in vivo*.

In summary, these experiments shed light on the basic events required to induce apoptosis in OROV infection on HeLa cells. We concluded that OROV induced apoptosis in the infected cells is dependent on virus replication, which occurs by an intracellular pathway involving the mitochondria, and probably triggered during the process of viral protein synthesis. Moreover, it was also possible to observe that apoptosis inhibition does not interfere with virus load production, indicating that this is not an essential process for viral replication on *in vitro* conditions.

MATERIAL AND METHODS

Cells and Virus

HeLa cells were cultured on Minimum Essential Medium (MEM, Gibco/Invitrogen) supplemented with 10% Foetal Bovine Serum (FBS, Gibco/Invitrogen), 1% of antimycotic and antibiotic solution (Gibco/Invitrogen) and 100mM L-glutamine (Gibco/Invitrogen) and incubated at 37°C with 5% CO₂. The OROV strain BeAn19991 was propagated on Vero cells and titrated by the Reed and Muench (REED and MUENCH, 1938) TCID₅₀ method. Cell cultures were infected at a multiplicity of infection (m.o.i.) of 10 in a small volume of medium (supplemented with 2% serum) for 1 hour at 4°C, washed away from virus inoculum, and further incubated in fresh culture medium at 37°C. After the period of incubation determined by the experiments described on the text the cells were harvested using a cell scraper and submitted for titration as mentioned above or other treatments as mentioned at the text.

DNA Fragmentation assay by gel electrophoresis

At the indicated periods of time, OROV-infected and mock-infected HeLa cell cultures were harvested using a cell scraper and transferred to a 15mL tube and submitted to centrifugation at 1,000g for 10 minutes. The supernatant was discarded and the cell pellet was resuspended on 500uL of lysis solution (Tris 10mM, pH7,4 + EDTA 1mM + 0,2% Triton X-100) (Sigma Aldrich, Gibco/Invitrogen and Invitrogen respectively) and incubated at 4°C for 20 minutes followed by centrifugation at 12,000g for 20 minutes. The cleared lysates (supernatant) were then treated with 100ug/mL RNase A (Invitrogen) for 1 hour at 37°C followed by 0.1mg/mL proteinase K (Invitrogen) incubated at 57°C for 1 hour and extracted with phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1) (Sigma Aldrich). This solution was centrifuged at 12,000g for 5 minutes and next precipitated with 3M NaCl (Synth) and cold ethanol (Merck) for 10h at -20°C. Precipitates were then collected by centrifugation at 13,000g for 20 minutes, washed with 70% ethanol, resedimented, dried, and resuspended in TE (10 mM Tris-HCl, pH 7.4, 10 mM EDTA). Samples were analyzed by electrophoresis on 1.5% agarose gel. DNA was visualized by illumination with ultraviolet light after soaking the gel in electrophoresis buffer supplemented with 0.5 ug/ml ethidium bromide.

DNA Fragmentation assay by flow citometric sub-G1 peak analysis

After OROV infection or incubation with apoptotic drug, approximately 10^6 cells were washed with PBS and fixed in 70% cold ethanol at 4°C for 20 minutes. Fixed cells were washed on PBS with 0.05% BSA (Sigma Aldrich) and resuspended in 50ug/mL propidium iodide (Sigma Aldrich) containing 40ug/ml RNase A. Cells were analyzed using a Becton-Dickinson FACScan Advantage to determine the percentage of apoptotic cells.

Western Blot

OROV-infected and mock-infected HeLa cells were harvested using a cell scraper, washed with PBS and lysed in lysis buffer: Tris-HCl 25 mM pH 7.5; 0.1mM PMSF (Sigma Aldrich); 0.5mM EDTA; 10mM KCl (Synth); 5mM MgCl₂ (Synth); 1mM DTT (Sigma Aldrich); 5% glycerol (Merck); 1mM Aprotinin (Sigma Aldrich), 5mM Leupeptin (Sigma Aldrich). This suspension was lysed by 5 pulses on an ultrasonic cell disruptor on ice, and then the protein solution was obtained by centrifugation at 15,000g for 30 minutes. Protein concentration was determined by the bicinchoninic acid method with BCA Protein Assay Reagent (Pierce). Protein extracts (30ug) were subjected to sodium dodecyl sulfate (SDS) 12.5% polyacrylamide gel electrophoresis, and then electroblotted onto a nitrocellulose (Protran, Schleicher & Schuell) membrane. The membranes were incubated with 1:200 specific mouse anti-caspase 9 antibody (BD Pharmingen) for 12 hours, followed by another incubation with 1:1,000 of horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary rabbit anti-mouse antibody (Molecular Probes) for 1 hour. The membranes were then revealed by 0.03% DAB (3,3'-diaminobenzidine, Sigma Aldrich) detection.

Cytochrome C detection

OROV-infected and mock-infected HeLa cells were harvested using a cell scraper, washed with PBS and resuspended on extraction buffer MB: 210mM mannitol (Sigma Aldrich) 70mM sucrose (Sigma Aldrich); 1mM EDTA (Sigma Aldrich); 10mM HEPES pH 7.5 (Sigma Aldrich), 0.1mM PMSF (Sigma Aldrich); 1mM Aprotinin (Sigma Aldrich), 5mM Leupeptin (Sigma Aldrich). These cells were then ruptured using a needle of 25G1 (BD-Becton, Dickinson Company) attached to a 5mL syringe (BD-Becton, Dickinson Company) and then centrifuged at 500g for 5 minutes. The supernatant was centrifuged one more time at 10,000g for 30 minutes in order to obtain a pellet which corresponds to heavy membrane organelles, including mitochondria. This fraction of the cell extract was named "high membrane portion" (HM) and it was resuspended with the MB buffer with 1% Triton X-100 (Invitrogen). The supernatant obtained from the

previous centrifugation was then centrifuged at 100,000g for 1 hour at 4°C on ultracentrifuge tubes (Beckman Coulter), and the supernatant was collected and named “cytoplasmic portion” (C). Both cellular protein extracts portions (HM and C) were then used to determine the presence of cytochrome c by Western Blot with 1:500 dilution of a mouse anti-cytochrome c (BD Pharmingen) as primary antibody, as described above.

Caspase 3 activation

OROV-infected and mock-infected HeLa cells were harvested using a cell scraper, washed once and resuspended in PBS in order to obtain a concentration of 1×10^6 cells/mL. The specific caspase 3 fluorogenic substrate (Z-Asp-Glu-Val-Asp)-2-rhodamine 110-bisamide (Calbiochem) was added to this suspension at 50uM and then the suspension was incubated at 37°C for 10 minutes protected from light. The cells were then washed with PBS to remove the excess of the substrate and the fluorescence was analyzed by flow cytometry using a Becton–Dickinson FACScan Advantage.

UV Inactivation of OROV

500uL of OROV strain BeAn19991 were inactivated by exposing the virus to a germicidal ultraviolet lamp (254nm) at a distance of 5cm for 5 hours on ice. Inactivation was confirmed by titration of samples before and after UV exposition, and by the absence of cytopathic effect after inoculation of HeLa cell monolayers with the UV-irradiated virus samples.

Drug Treatments

All drugs were purchased from Sigma Aldrich Chemical Co. and used at the indicated concentrations unless specified. HeLa cell monolayers were pretreated with cycloheximide (20 ug/ml) or chloroquine (32ug/mL) diluted on MEM medium with 2% FBS for 1 h before exposure to OROV. The drugs were also present at the indicated concentrations in the virus inoculum (during absorption of viral particles), and in the

culture medium along the infective cycle. The cells were harvested after 36 hours post infection and both virus titer and DNA fragmentation by flow cytometry were analyzed as described above. For positive control of the induction of apoptosis the pro-apoptotic drug actinomycin D (0.25ug/mL) was also used and it was introduced to the cell culture or mock-infected cells at the same time as the virus was inoculated.

Timing of Addition Assay with CHX and OROV

HeLa cell monolayers were cultured on 24 wells plate (TPP Tissue Culture Labware) and then mock-infected or inoculated with OROV. CHX was added to the cell culture at different times as indicated previously on the text (from 1 hour before virus inoculation to 30 hours after). The plate was incubated at 37°C and cells were harvested after 36 hours post infection and analyzed for viral titre and DNA fragmentation by flow cytometry as described above.

Pan-caspases inhibition using Z-VAD-FMK

HeLa cell monolayers were cultured on 24 wells plate (TPP Tissue Culture Labware) and then treated with 40uM of the pan-caspase inhibitor Z-VAD-FMK (Promega) at the same time as the OROV strain BeAn19991 was inoculated to the culture. As a control for the cytotoxicity of the drug, cells were treated with 2:1000 DMSO (Sigma Aldrich), which is the diluent of the drug. The plates were then incubated at 37°C and harvested after 36 hours post infection and analyzed for viral titre and DNA fragmentation by flow cytometry as described above.

REFERENCES

- AUBERT, M.;O'TOOLE, J. and BLAHO, J. A. Induction and prevention of apoptosis in human HEp-2 cells by herpes simplex virus type 1. *J Virol*, v.73, n.12, p.10359-70. 1999.
- BLAKQORI, G. and WEBER, F. Efficient cDNA-based rescue of La Crosse bunyaviruses expressing or lacking the nonstructural protein NSs. *J Virol*, v.79, n.16, p.10420-8. 2005.

BLAKQORI, G.;DELHAYE, S.;HABJAN, M.;BLAIR, C. D.;SANCHEZ-VARGAS, I.;OLSON, K. E.;ATTARZADEH-YAZDI, G.;FRAGKLOUDIS, R.;KOHL, A.;KALINKE, U.;WEISS, S.;MICHIELS, T.;STAEHEL, P. and WEBER, F. La Crosse bunyavirus nonstructural protein NSs serves to suppress the type I interferon system of mammalian hosts. **J Virol**, v.81, n.10, p.4991-9. 2007.

BRIDGEN, A.;WEBER, F.;FAZAKERLEY, J. K. and ELLIOTT, R. M. Bunyamwera bunyavirus nonstructural protein NSs is a nonessential gene product that contributes to viral pathogenesis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.98, n.2, p.664-9. 2001.

BROJATSCH, J.; NAUGHTON, J.; ROLLS, M. M.; ZINGLER, K. and YOUNG, J. A. CAR1, a TNFR-related protein, is a cellular receptor for cytopathic avian leukosis-sarcoma viruses and mediates apoptosis. **Cell**, v.87, p.845-855. 1996.

CARRASCOSA, A. L.;BUSTOS, M. J.;NOGAL, M. L.;GONZALEZ DE BUITRAGO, G. e REVILLA, Y. Apoptosis induced in an early step of African swine fever virus entry into vero cells does not require virus replication. **Virology**, v.294, n.2, p.372-82. 2002.

CHANG, C. C.;OU, Y. C.;RAUNG, S. L. and CHEN, C. J. Antiviral effect of dehydroepiandrosterone on Japanese encephalitis virus infection. **J Gen Virol**, v.86, n.Pt 9, p.2513-23. 2005.

COLON-RAMOS, D. A.;IRUSTA, P. M.;GAN, E. C.;OLSON, M. R.;SONG, J.;MORIMOTO, R. I.;ELLIOTT, R. M.;LOMBARD, M.;HOLLINGSWORTH, R.;HARDWICK, J. M.;SMITH, G. K. and KORNBLUTH, S. Inhibition of translation and induction of apoptosis by Bunyaviral nonstructural proteins bearing sequence similarity to reaper. **Mol Biol Cell**, v.14, n.10, p.4162-72. 2003.

EVERETT, H. and MCFADDEN, G. Viruses and apoptosis: meddling with mitochondria. **Virology**, v.288, n.1, p.1-7. 2001.

HANON, E.; HOORNAERT, S.; DEQUIEDT, F.; VANDERPLASSCHEN, A.; LYAKU, J.; WILLEMS, L. and PASTORET, P. P. Bovine herpesvirus 1-induced apoptosis occurs at the G0/G1 phase of the cell cycle. **Virology**, v.232, p.351-358. 1997.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v.407, n.6805, p.770-6. 2000.

HOBBS, J. A.;SCHLOEMER, R. H.;HOMMEL-BERREY, G. and BRAHMI, Z. Caspase-3-like proteases are activated by infection but are not required for replication of vesicular stomatitis virus. **Virus Res**, v.80, n.1-2, p.53-65. 2001.

JAN, J. T. and GRIFFIN, D. E. Induction of apoptosis by Sindbis virus occurs at cell entry and does not require virus replication. **J Virol**, v.73, n.12, p.10296-302. 1999.

KLEINSCHMIDT, M. C.;MICHAELIS, M.;OGBOMO, H.;DOERR, H. W. and CINATL, J., JR. Inhibition of apoptosis prevents West Nile virus induced cell death. **BMC Microbiol**, v.7, p.49. 2007.

KOHL, A.;CLAYTON, R. F.;WEBER, F.;BRIDGEN, A.;RANDALL, R. E. and ELLIOTT, R. M. Bunyamwera virus nonstructural protein NSs counteracts interferon regulatory factor 3-mediated induction of early cell death. **J Virol**, v.77, n.14, p.7999-8008. 2003.

KROEMER, G.;GALLUZZI, L.;VANDENABEELE, P.;ABRAMS, J.;ALNEMRI, E. S.;BAEHRECKE, E. H.;BLAGOSKLONNY, M. V.;EL-DEIRY, W. S.;GOLSTEIN, P.;GREEN, D. R.;HENGARTNER, M.;KNIGHT, R. A.;KUMAR, S.;LIPTON, S. A.;MALORNI, W.;NUNEZ, G.;PETER, M. E.;TSCHOOP, J.;YUAN, J.;PIACENTINI, M.;ZHIVOTOVSKY, B. and MELINO, G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell Death Differ**, v.16, n.1, p.3-11. 2009.

LABRADA, L.;BODELON, G.;VINUELA, J. e BENAVENTE, J. Avian reoviruses cause apoptosis in cultured cells: viral uncoating, but not viral gene expression, is required for apoptosis induction. **J Virol**, v.76, n.16, p.7932-41. 2002.

MARTIN, U.;JARASCH, N.;NESTLER, M.;RASSMANN, A.;MUNDER, T.;SEITZ, S.;ZELL, R.;WUTZLER, P. and HENKE, A. Antiviral effects of pan-caspase inhibitors on the replication of coxsackievirus B3. **Apoptosis**, v.12, n.3, p.525-33. 2007.

O'BRIEN, V. Viruses and apoptosis. **J Gen Virol**, v.79 (Pt 8), p.1833-45. 1998.

PINHEIRO, F. P.;TRAVASSOS DA ROSA, A. P.;TRAVASSOS DA ROSA, J. F.;ISHAK, R.;FREITAS, R. B.;GOMES, M. L.;LEDUC, J. W. and OLIVA, O. F. Oropouche virus. I. A review of clinical, epidemiological, and ecological findings. **Am J Trop Med Hyg**, v.30, n.1, p.149-60. 1981.

RAMSEY-EWING, A. and MOSS, B. Apoptosis induced by a postbinding step of vaccinia virus entry into Chinese hamster ovary cells. **Virology**, v.242, n.1, p.138-49. 1998.

REED, L. J. and MUENCH, H. A simple method of estimating 50 per cent end point. **American Journal of Hygiene**, v.27, n.39, p.493-497. 1938.

ROULSTON, A.;MARCELLUS, R. C. and BRANTON, P. E. Viruses and apoptosis. **Annu Rev Microbiol**, v.53, p.577-628. 1999.

SANTOS, R. I.;RODRIGUES, A. H.;SILVA, M. L.;MORTARA, R. A.;ROSSI, M. A.;JAMUR, M. C.;OLIVER, C. and ARRUDA, E. Oropouche virus entry into HeLa cells involves clathrin and requires endosomal acidification. **Virus Res**. v.138, n.1-2, p.139-43. 2008.

SCHMALJOHN, C. S. and HOOPER, J. W. Bunyaviridae: the viruses and their replication. In: KNIFE, D. M. **FIELDS Virology**. Philadelphia: Lipincott-Williams & Wilkins, v.1, 2006.

SHIH, S. R.; WENG, K. F.; STOLLAR, V. e LI, M. L. Viral protein synthesis is required for Enterovirus 71 to induce apoptosis in human glioblastoma cells. **J Neurovirol**, v.14, n.1, p.53-61. 2008.

TYLER, K. L.; SQUIER, M. K.; RODGERS, S. E.; SCHNEIDER, B. E.; OBERHAUS, S. M.; GRDINA, T. A.; COHEN, J. J. and DERMODY, T. S. Differences in the capacity of reovirus strains to induce apoptosis are determined by the viral attachment protein sigma 1. **J Virol**, v.69, n.11, p.6972-9. 1995.

FIGURE LEGENDS

FIG. 1. Apoptosis induced by OROV in HeLa cells. **(A)** Flow cytometric histograms of mock-infected (C-) or OROV-infected cells analyzed after 12, 24, 36 and 48 hours post infection. Cell DNA content was determined by flow cytometry after propidium iodide staining analysis of the Sub-G1 population. Gate M1 represents population of cells with hypoploid fragmented DNA content, including cells in early apoptosis. C+ stands for cells treated with actinomycin D as positive control for apoptosis induction. **(B)** The graphic represents the results of three repetitions of this assay. **(C)** Agarose gel electrophoresis of the internucleosomal DNA (laddering). At the indicated times after infection, DNA from mock (C-) or OROV-infected HeLa cells were subjected to electrophoresis on a 1.5% agarose gel. C+ stands for cells treated with actinomycin D as positive control for apoptosis induction.

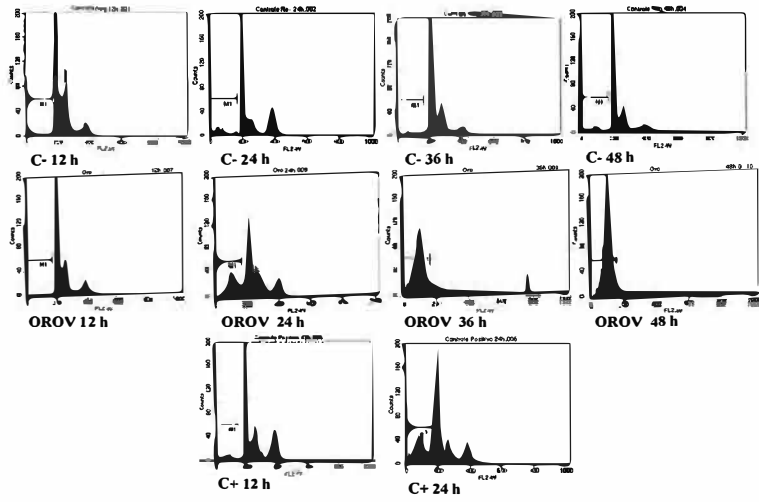
FIG. 2. Apoptosis induced by OROV in HeLa cells. **(A)** Western blot of cytochrome *c* in the mitochondrial fraction (HM) of mock (C-) or OROV-infected cells subjected to SDS–12.5% polyacrylamide gel electrophoresis. Specific anti cytochrome *c* antibody was used for detection of the protein using a DAB-based method. **(B)** Western blot of mitochondrial Hsp70 protein in the mitochondrial fraction (HM) of mock (C-) or OROV-infected cells. **(C)** Caspase 3 activation detected by flow cytometric analysis using the specific fluorescent substrate (Z-Asp-Glu-Val-Asp)₂-rhodamine 110-bisamide. C+ stands for cells treated with actinomycin D as positive control for apoptosis induction. The graphic represents the results of three repetitions of this assay. **(D)** Cleavage of caspase 9 induced by OROV infection. Cell lysates from mock-infected (C-) or OROV-infected HeLa cells obtained at the indicated times after infection were subjected to SDS–12.5% polyacrylamide gel electrophoresis. Anti-caspase 9 antibody was used for detection using a DAB-based method. The 47KDa band represents inactive pro-caspase 9, detected at all cell extracts. The 37KDa fragment represents the activated sub-unit of caspase 9, detected at 24 and 36 hours post infection. C+ represents a cell culture treated with actinomycin D.

FIG. 3. Virus titration and DNA fragmentation of OROV-infected HeLa cells. **(A)** Virus titer after 36 hours post infection of wild OROV (OROV C-) or UV inactivated OROV-infected HeLa cells. Titration analysis by Reed and Muench TCID₅₀ method. **(B)** Flow cytometric histograms of mock-infected (C-), native OROV (OROV C-) or UV-inactivated OROV-infected HeLa cells analyzed 36 hours post infection. Cell DNA content was determined by flow cytometry after propidium iodide staining analysis of the Sub-G1 population. Gate M1 represents population of cells with hypoploid fragmented DNA content, including cells in early apoptosis. **(C)** Virus titer after 36 hours post infection of HeLa cells infected with OROV in the presence of chloroquine and without the drug (OROV). Titration analysis by Reed and Muench TCID₅₀ method. **(D)** Flow cytometric histograms of mock-infected (C-), OROV at the presence of chloroquine, chloroquine without the virus (chlo C-) and OROV-infected HeLa cells analyzed 36 hours post infection. Cell DNA content was determined by flow cytometry after propidium iodide staining analysis of the Sub-G1 population. Gate M1 represents population of cells with hypoploid fragmented DNA content, including cells in early apoptosis.

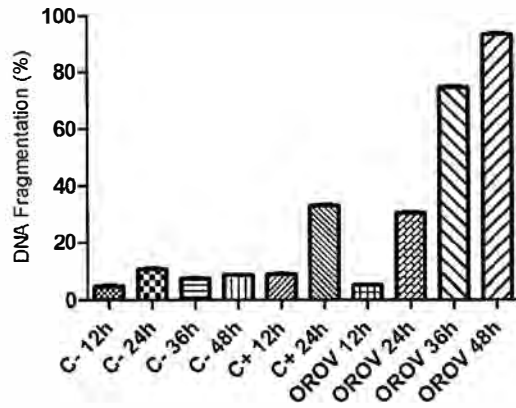
FIG. 4. Virus titration and DNA fragmentation of OROV-infected HeLa cells. **(A)** Virus titer after 36 hours post infection of HeLa cells infected with OROV in the presence of cycloheximide (CHX) and without the drug (OROV). Titration analysis by Reed and Muench TCID₅₀ method. **(B)** Flow cytometric histograms of mock-infected cells (C-), cells treated with actinomycin D (ACTD) and actinomycin D and CHX (ACTD + CHX), OROV at the presence of CHX (OROV + CHX), CHX without the virus (CHX) and OROV-infected HeLa cells analyzed 36 hours post infection. Cell DNA content was determined by flow cytometry after propidium iodide staining analysis of the Sub-G1 population. Gate M1 represents population of cells with hypoploid fragmented DNA content, including cells in early apoptosis. **(C)** Timing of addition assay. Virus titer after 36 hours post infection of HeLa cells infected with OROV in the presence of cycloheximide (CHX) introduced to the cell culture at different times, as indicated at the graphics, and without the drug (OROV). Titration analysis by Reed and Muench TCID₅₀ method. **(D)** Timing of addition assay. Flow cytometric histograms of mock-infected (C-), OROV at the presence of CHX (OROV + CHX) added to the cell culture at different times as indicated at the graphic, CHX without the virus (CHX) and OROV-infected HeLa cells analyzed 36 hours post infection. Cell DNA content was determined by flow cytometry after propidium iodide staining analysis of the Sub-G1 population. Gate M1 represents population of cells with hypoploid fragmented DNA content, including cells in early apoptosis. * stands for statistically significant difference between OROV+CHX4h and OROV+CHX 6h, according to parametric T test ($p=0.0272$).

FIG. 5. Inhibition of caspases and analysis of OROV replication and DNA fragmentation. **(A)** Flow cytometric histograms of mock-infected cells (C-), treated with actinomycin D (ACTD), actinomycin and DMSO (ACTD + DMSO), actinomycin D and Z-VAD-FMK (ACTD + ZVAD), and infected with OROV at the presence of DMSO (OROV + DMSO), OROV at the presence of the pan-caspase inhibitor Z-VAD-FMK (OROV + ZVAD) and OROV-infected HeLa cells analyzed 36 hours post infection. Cell DNA content was determined by flow cytometry after propidium iodide staining analysis of the

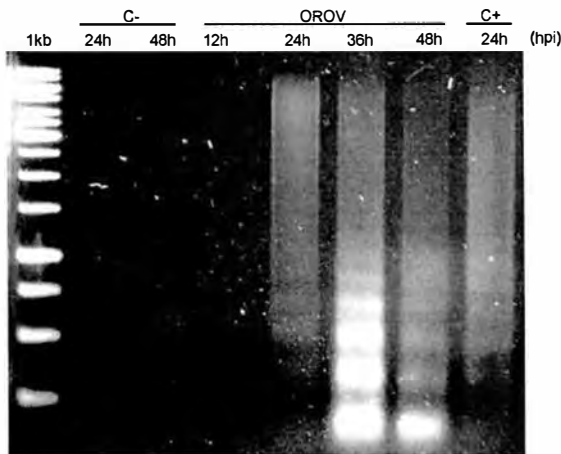
Sub-G1 populaiton. Gate M1 represents population of cells with hypoploid fragmented DNA content, including cells in early apoptosis. **(B)** Virus titer analyzed after 36 hours post infection of HeLa cells infected with OROV in the presence of Z-VAD-FMK (OROV + ZVAD), DMSO (OROV + DMSO) and without the drug (OROV). Titration analysis by Reed and Muench TCID₅₀ method.



A



B



C

Figure 1.

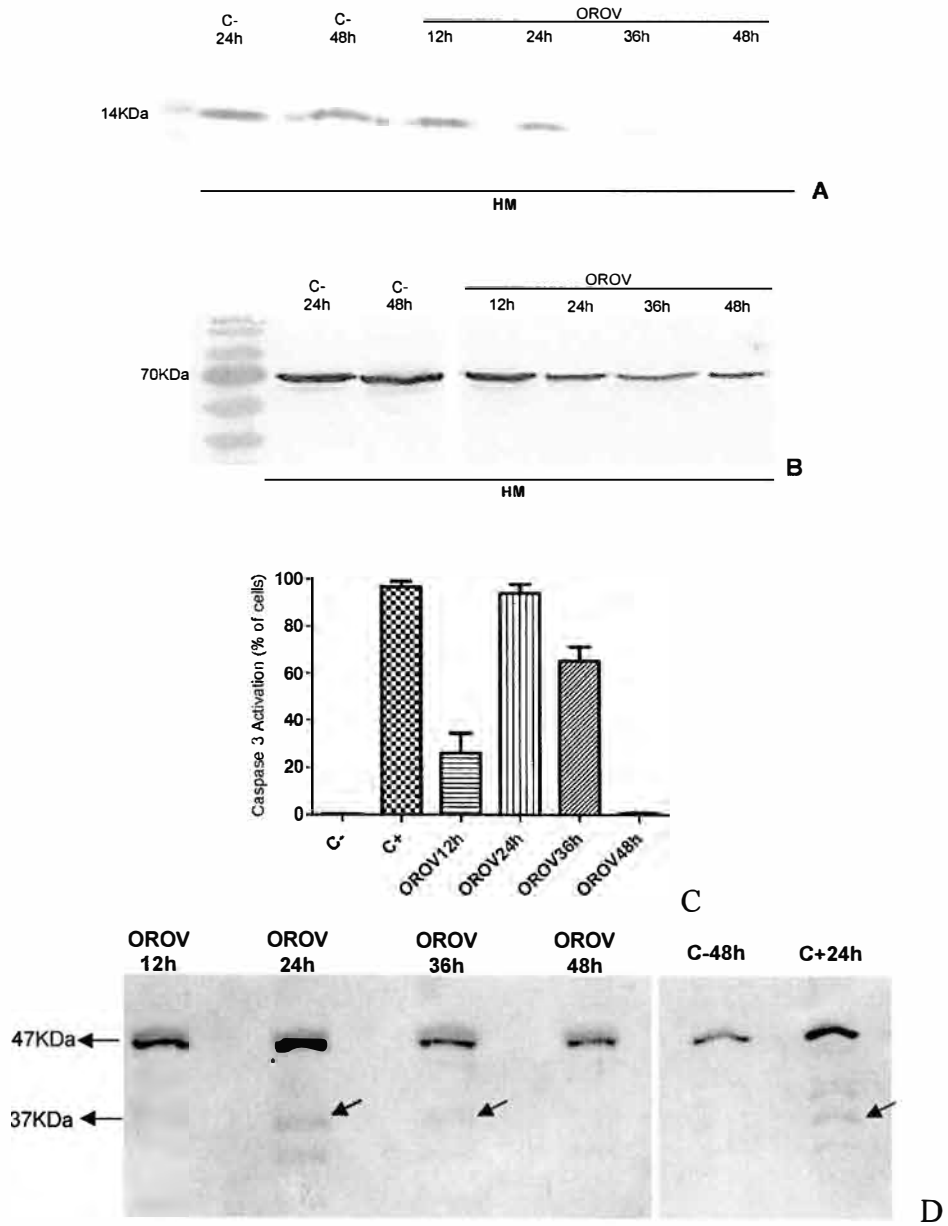


Figure 2.

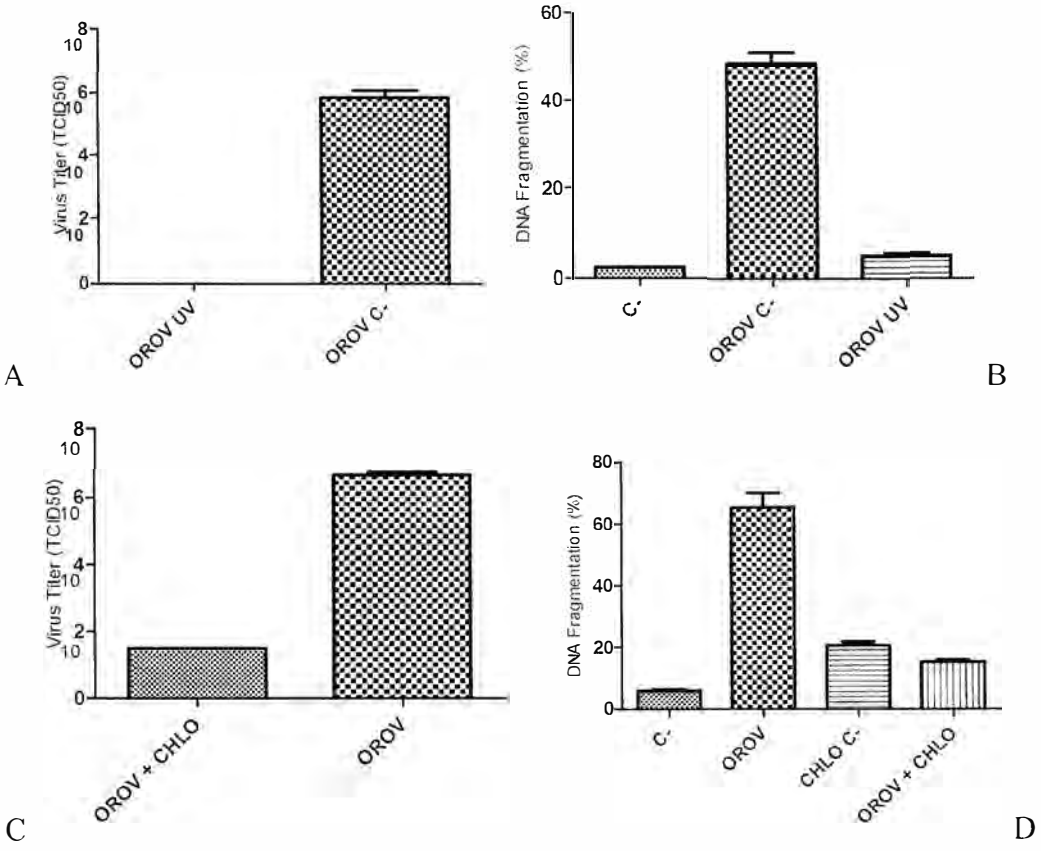


Figure 3.

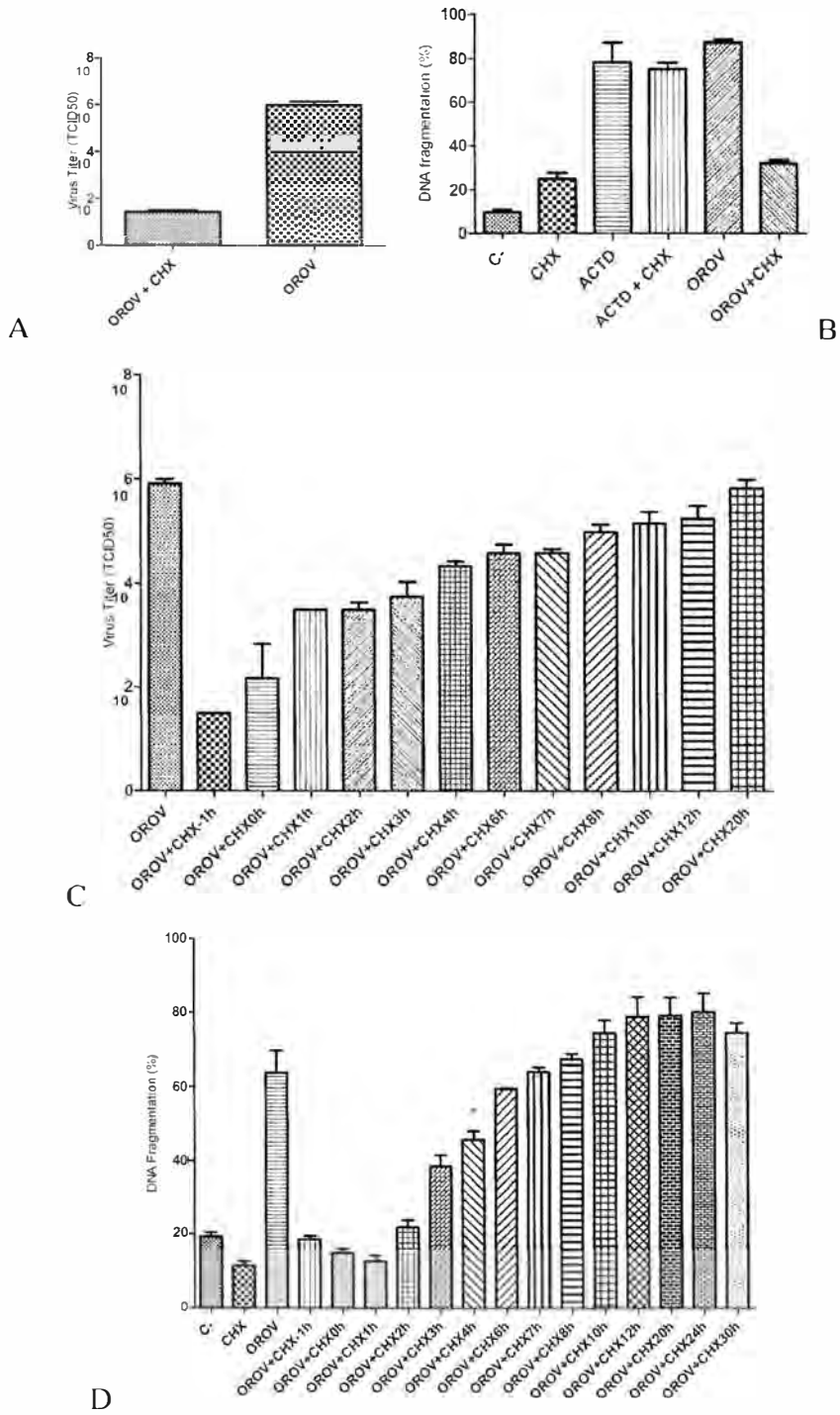


Figure 4.

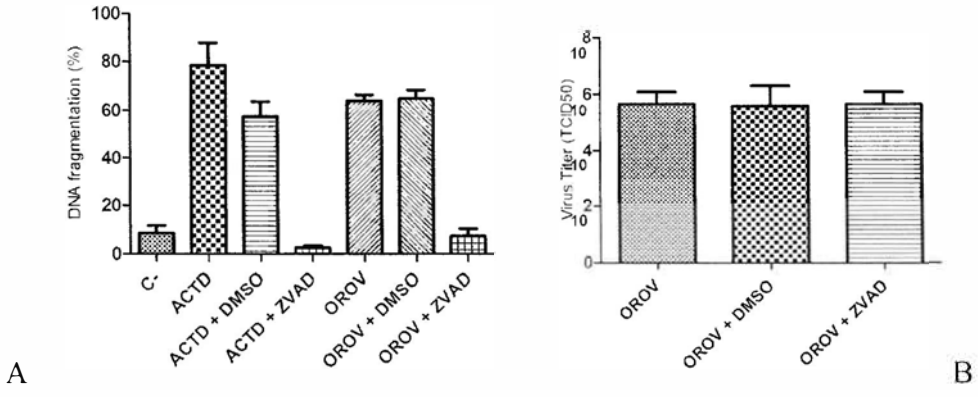


Figure 5.