

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

ANIBAL SILVA DE OLIVEIRA

**Estudo da apoptose induzida pela proteína NSs do vírus Oropouche**

Ribeirão Preto  
2017

ANIBAL SILVA DE OLIVEIRA

**Estudo da apoptose induzida pela proteína NSs do vírus Oropouche**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Eurico de Arruda Neto

Ribeirão Preto

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Oliveira, Anibal Silva

Estudo da apoptose induzida pela proteína NSs do vírus Oropouche. Ribeirão Preto, 2017.

70 f. : il. + 1 DVD

Tese (Doutorado), apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo

Orientador: Prof. Dr. Eurico de Arruda Neto

Palavras chave: 1. Vírus. 2. Oropouche. 3. NSs. 4. Apoptose.

Nome: OLIVEIRA, Anibal Silva de

Título: Estudo da apoptose induzida pela proteína NSs do vírus Oropouche

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Biologia Celular Molecular para obtenção do Título de Doutor em  
Ciências

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

## **Agradecimento**

Agradeço ao Prof. Dr. Eurico de Arruda Neto pela orientação e conhecimento compartilhado durante esse trabalho e as boas conversas.

Maria Lucia (Pity) técnica mãe do laboratório, pela ajuda e os cuidados diários.

Dr. Gustavo Olzanski Acrani pelo apoio e pelos vírus construídos.

Dr Miriã Ferreira Criado pela orientação e ajuda, fundamentais na execução de alguns experimentos e pelas boas conversas.

Ms Ricardo Cardoso pela ajuda nas seções de confocal.

Dr Eduardo Melani Rocha por toda ajuda e doação das células epiteliais de córnea (HCE).

Ao amigo Luiz Carlos Vieira pela amizade, ajuda nos trabalhos e pelos muitos quilômetros pedalados.

Dra. Talita pela amizade e ajuda no laboratório.

Ms Mirela Prates pela amizade e ajuda nos trabalhos.

Agradeço a todos os colegas do laboratório de patogênese viral: Prof. Eurico, Pity, Miriã, Gustavo, Talita, Luciano, Marcus Vinicius, Nathalie, Marcos Michel, Bruno, Tamara, Ronaldo, Ricardo, Marjorie, Italo, Bruna, Mirela, Juliano, Ana, Glauucia, Suelen.

Ao funcionário e aluno Danilo pela constante troca de conhecimentos, e por toda ajuda no uso e empréstimo de equipamentos.

Agradeço as funcionárias, dona Sueli e dona Leila pelas boas conversas e pela ajuda no andamento do CPV.

Agradeço a funcionária Soraya Jabur Brada pela ajuda no andamento do CPV e pelas boas conversas.

Agradeço a todos os professores, funcionários e alunos do CPV pela troca de conhecimentos e pelo convívio diário.

Agradeço a todos os docentes, funcionários e colegas do departamento de Biologia Celular e Molecular da FMRP pela convivência e cuidado com o departamento.

Agradeço a todos os meus familiares e amigos pela paciência e pelo incentivo.

Muito obrigado.

## Epígrafe

Se eu vi mais longe foi por estar de pé sobre ombros de  
gigantes.

Isaac Newton

## RESUMO

OLIVEIRA, A. S. **Estudo da apoptose induzida pela proteína NSs do vírus Oropouche.** 2017. 70f. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

O arbovírus Oropouche (OROV), da família *Peribunyaviridae*, gênero *Orthobunyavirus*, é importante causador de doença febril nas Américas Central e do Sul. Como outros *Orthobunyavirus*, OROV é envelopado, com genoma compreendido por três segmentos de RNA de fita simples de polaridade negativa, nomeados de acordo com o seu tamanho, como S (small), M (médio) e L (large). O segmento S codifica a proteína estrutural do nucleocapsídeo N e, em uma fase de leitura alternativa, a proteína não estrutural NSs. Apesar da patogênese de OROV ser pouco conhecida, dados obtidos com modelos experimentais murinos indicam que a apoptose desempenha um papel central na morte de células infectadas. Portanto, embora não seja essencial à replicação de OROV, NSs pode desempenhar papéis importantes para a patogênese. Nosso grupo demonstrou previamente que OROV induz apoptose em células HeLa pela via intrínseca, e esse efeito requer a síntese de proteínas virais. No presente estudo objetivamos investigar o papel da proteína NSs de OROV na apoptose induzida em células HeLa. Nós encontramos que a superexpressão da proteína NSs de OROV induz apoptose em diferentes linhagens de células humanas (Glioblastoma, Huh7 e HCE) 24 horas após transfecção. NSs induz apoptose pela via intrínseca, com liberação de citocromo c da mitocôndria, ativação de caspases 9 e 3, e fragmentação de cromatina. Curiosamente, a proteína NSs também induz apoptose pela via extrínseca, confirmada pela detecção de caspase 8 ativada. Um clone infeccioso do OROV sem a proteína NSs (OROVdelNSs) também não induz apoptose em células HeLa até 36 horas pós-infecção, confirmando a importância da proteína NSs para a indução de morte celular por apoptose. A predição da estrutura da proteína NSs revelou a presença de uma sequência de treze aminoácidos na região C-terminal da proteína, que tem similaridade como receptor de TNF. Ensaio de PCR *array* indicou que a proteína NSs de OROV causa aumento na quantidade de transcritos de TNF em células HeLa.

**Palavras-chave:** Vírus. Oropouche. NSs. Apoptose.



## ABSTRACT

OLIVEIRA, A. S. **Estudo da apoptose induzida pela proteína NSs do vírus Oropouche.** 2017. 70f. Thesis (Doutoral). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

The arbovirus Oropouche (OROV), of the family *Peribunyaviridae*, genus Orthobunyavirus, is an important cause of febrile disease in Central and South America. Like other Orthobunyaviruses, OROV is enveloped, with a genome comprised of three segments of single-stranded RNA of negative polarity, named according to their sizes as S (small), M (medium) and L (large). The S segment encodes the structural nucleocapsid N protein and, on an alternative reading frame, the NSs nonstructural protein. Although the pathogenesis of OROV is poorly understood, data obtained from murine experimental models indicate that apoptosis plays a central role in killing infected cells. Therefore, while not essential for the replication of OROV, NSs may play important roles in the pathogenesis. Our group has previously demonstrated that OROV induces apoptosis in HeLa cells via the intrinsic pathway, and this effect requires the synthesis of viral proteins. The present study aimed to investigate the role of OROV protein NSs in apoptosis induced in HeLa cells. We found that overexpression of the NSs protein induces apoptosis in different human cell lines (glioblastoma neuroblastoma and human corneal epithelium) 24 hours after transfection. NSs induces apoptosis by the intrinsic pathway, with release of cytochrome c from mitochondria, activation of caspases 9 and 3, and chromatin fragmentation. Interestingly, the NSs protein also induces activation of caspase 8, an element of the extrinsic pathway of apoptosis. An OROV infectious clone lacking the NSs protein (OROV $\Delta$ NSs) does not induce apoptosis in HeLa cells up to 36 hours post-infection, confirming the importance of the NSs protein for the induction of cell death by apoptosis. The prediction of the structure of the NSs protein revealed the presence of a sequence of thirteen amino acids in the C-terminal region of the protein, which has similarity as a TNF receptor, and this could shed light into a possible mechanism of apoptosis to be validated by experiments silencing target genes in HeLa cells.

**Keywords:** Virus, Oropouche, NSs, Apoptosis.

## LISTA DE FIGURAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Figura 1</b> - Desenho esquemático de Orthobunyavirus. ....   | 10 |
| <b>Figura 2</b> - Estratégia de codificação genômica dos Orthobunyavirus. Detalhes no texto. ....  | 11 |
| <b>Figura 3</b> - Ciclo de replicação dos Orthobunyavirus. ....  | 12 |
| <b>Figura 4</b> - Vias Intrínseca e extrínseca da apoptose. ....   | 15 |
| <b>Figura 5</b> - Diagrama representativo do seguimento S de OROV, indicando mutações pontuais desenhadas para criar o clone do vírus deletado da proteína NSs. ....   | 18 |
| <b>Figura 6</b> - Replicação de OROV em células e sobrenadantes de culturas de diferentes linhagens celulares ao longo de 48 horas. ....   | 28 |
| <b>Figura 7</b> - Imunofluorescência para detecção de OROV e para NSs em células HeLa, glioblastoma e HCE, com detecção de fragmentação de DNA por TUNEL. ....   | 29 |
| <b>Figura 8</b> – Imunofluorescência de células HuH7 para detecção de OROVwt, NSs e caspase 3 ativada. ....  | 29 |
| <b>Figura 9</b> - Marcação para fosfatidilserina com Anexina V em células HeLa infectadas com OROVwt, OROVdelNSs. ....   | 31 |
| <b>Figura 10</b> - Imunofluorescência de células HeLa infectadas com OROVwt ou OROVdelNSs ou superexpressando a proteína NSs, para detecção de fragmentação nuclear pelo ensaio de TUNEL. ....                                       | 32 |
| <b>Figura 11</b> - Imunofluorescência de células HeLa infectadas com OROVwt ou OROVdelNSs ou superexpressando a proteína NSs, para detecção de caspase 3 ativada. ....   | 33 |
| <b>Figura 12</b> - Imunofluorescência de células HeLa infectadas com OROVwt ou OROVdelNSs ou super-expressando NSs, para detecção de caspase 9 ativada. ....   | 34 |
| <b>Figura 13</b> - Imunofluorescência para citocromo c em células HeLa infectadas com OROVwt ou OROVdelNSs, ou super-expressando NSs de OROV. ....   | 35 |
| <b>Figura 14</b> - Imunofluorescência para caspase 8 ativada em células HeLa infectadas com os vírus OROVwt ou OROVdelNSs, ou super-expressando NSs de OROV. ....  | 36 |
| <b>Figura 15</b> - Imunofluorescência para caspase 8 ativada em células HeLa após tratamento com meios condicionados obtidos de culturas prévias infectadas com OROVwt (a) ou OROVdelNSs (B), inativados (D e E) ou não por UV. .... | 37 |
| <b>Figura 16.</b> Imunofluorescência para de tecção de p53 em células HeLa infectadas por OROVwt ou OROVdelNSs, ou super-expressando NSs de OROV. ....   | 38 |
| <b>Figura 17</b> – Genes cuja expressão foi mais alterada na presença da proteína NSs de OROV. ....  | 39 |
| <b>Figura 18</b> - Modelo final predito da estrutura secundária da proteína NSs de OROV. ....  | 40 |

**Figura 19** - Predição de domínios transmembrana na proteína NSs de OROV. .... 41

## LISTA DE TABELAS

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabela 1</b> - Linhagens celulares..... | 19 |
|--|----|

## Sumário

|   |    |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO.....  | 8  |
| 1.1. O vírus Oropouche.....   | 8  |
| 1.2. Estrutura e replicação de Orthobunyavirus.....                                 | 9  |
| 1.3. Patogênese .....   | 12 |
| 1.4. Apoptose .....   | 13 |
| 1.3.1. Vírus e apoptose .....   | 15 |
| 1.3.2. Apoptose induzida por OROV .....   | 16 |
| 2. OBJETIVOS.....   | 17 |
| 2.1. Objetivo Geral.....  | 17 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS.....  | 18 |
| 3.2. Vírus.....   | 18 |
| 3.3. Células e cultivo.....   | 19 |
| 3.3.1. Linhagens .....  | 19 |
| 3.3.2. Cultivo .....  | 19 |
| 3.4. Ensaio de titulação viral por TCID <sub>50</sub> .....                         | 19 |
| 3.5. Imunofluorescência indireta .....  | 20 |
| 3.6. Ensaio de TUNEL para análise da fragmentação de cromatina .....                | 21 |
| 3.7. Ensaio de ativação de caspases 3, 8 e 9 .....                                  | 22 |
| 3.8. Ensaio para detecção de extravasamento de citocromo c mitocondrial.....        | 22 |
| 3.9. Translocação de p53 .....  | 23 |
| 3.10. Análise da exposição de resíduos de fosfatidilserina com Anexina V.....       | 24 |
| 3.11. Ensaio de meio condicionado para detecção de atividade parácrina de OROV .... | 24 |
| 3.12. PCR Array.....  | 25 |
| 3.13. Análise computacional da proteína NSs de OROV .....                           | 26 |
| 4. RESULTADOS .....   | 27 |

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 4.1.   | Susceptibilidade à infecção por OROV e apoptose induzida pela proteína NSs em diferentes linhagens de células humanas ..... | 27 |
| 4.2.   | Detecção com anexina V da exposição de fosfatidilserina .....   | 30 |
| 4.3.   | Ativação da via intrínseca de apoptose pela proteína NSs de OROV .....  | 31 |
| 4.4.   | Ativação da via extrínseca pela proteína NSs .....  | 35 |
| 4.4.1. | Ensaio de meio condicionado para avaliação da atividade parácrina na apoptose induzida por OROV .....                       | 36 |
| 4.5.   | Translocação de p53 .....   | 37 |
| 4.6.   | PCR Array .....   | 38 |
| 4.7.   | Predição da estrutura da proteína NSs de OROV .....   | 39 |
| 5.     | DISCUSSÃO .....   | 42 |
| 6.     | CONCLUSÕES .....  | 48 |
| 7.     | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....  | 49 |
| 8.     | APÊNDICES .....   | 55 |

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. O vírus Oropouche

O vírus Oropouche (OROV) é um arbovírus que circula nas Américas do Sul e Central, com importantes impacto em saúde pública (Pinheiro et al., 2004). O OROV atualmente está classificado na ordem *Bunyavirales*, família *Peribunyaviridae* (ICTV, EC 48, Budapest, Hungary, August 2016). OROV foi primeiramente isolado em 1955 do sangue de um paciente com doença febril, e de um *pool* de mosquitos *Coquillettidia venezuelensis*, em Vega do Oropouche, um vilarejo próximo ao rio Oropouche, em Trinidad e Tobago (ANDERSON et al., 1961). O isolamento se deu no *Trinidad Regional Virus Laboratory*, um centro para a pesquisa de vírus em regiões tropicais financiado pela Fundação Rockefeller, em cooperação com o governo de Trinidad e Tobago (ROCKEFELLER FOUNDATION, 1962; DOWNS, 1982). No Brasil, o OROV foi isolado pela primeira vez em 1960, do sangue de uma bicho-preguiça, *Bradypus tridactylus*, e de um *pool* de mosquitos *Ochlerotatus serratus*, ambos capturados no estado do Pará, próximo a área de floresta durante a construção da rodovia Belém-Brasília (BR 010) (PINHEIRO et al., 1962). Desde o primeiro isolamento do OROV no Brasil em 1960, foram relatadas dezenas de epidemias causadas por OROV na região norte do Brasil (PINHEIRO et al., 1962; PINHEIRO et al., 1981; LEDUC et al., 1981; VASCONCELOS et al., 1989; AZEVEDO et al., 2007; MOURÃO et al., 2009), além de outros países como Peru, Panamá e Trinidad e Tobago (PINHEIRO; TRAVASSOS DA ROSA; VASCONCELOS, 2004; VASCONCELOS et al., 2011).

OROV é mantido em dois ciclos epidemiológicos, o urbano e o silvestre. O ciclo silvestre envolve diferentes hospedeiros vertebrados e vários possíveis vetores artrópodes (PINHEIRO; TRAVASSOS DA ROSA; VASCONCELOS, 2004), e o ciclo urbano ocorre em cidades tropicais, tendo seres humanos como principais hospedeiros e a mosca hematófaga *Culicoides paraensis*, popularmente conhecida como maruim, como principal vetor (PINHEIRO et al., 1981). Em áreas urbanas OROV é disseminado predominantemente em surtos epidêmicos de largas proporções que acometem especialmente populações ribeirinhas da região amazônica, mas também têm sido registrados casos esporádicos (MOURÃO et al., 2009).

Apesar da circulação do OROV no Brasil ser fortemente predominante na região norte, principalmente nos estados do Pará, Amazonas, Amapá, Acre, Rondônia, Tocantins e Maranhão (AZEVEDO et al., 2007), houve o relativamente recente isolamento do agente em um símio do gênero *Callithrix spp* encontrado morto no Parque Nacional Grande Sertão

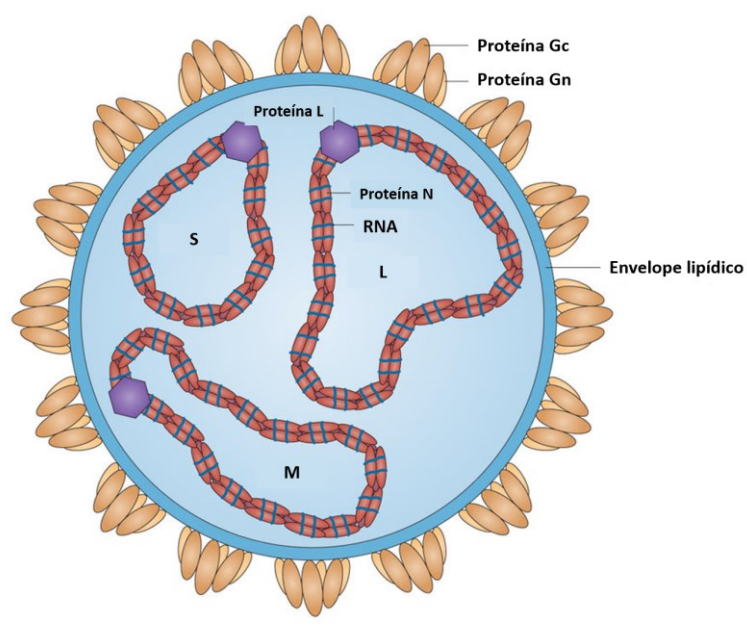
Veredas, no município de Arinos, MG (NUNES et al., 2005). O vírus isolado era do genótipo III, anteriormente registrado apenas no Panamá, o que evidencia o potencial de disseminação do vírus para outras regiões da América do Sul, com especial destaque a populosa região sudeste do Brasil (NUNES et al., 2005). Mais recentemente OROV foi detectado por RT-PCR e por imunofluorescência de leucócitos do sangue periférico, em uma paciente que adquiriu o vírus em viagem de férias a Porto Seguro, no sul da Bahia em 2014, podendo ser considerado o primeiro caso documentado de infecção humana por OROV adquirido fora da região amazônica (LUNA et al., 2017).

## **1.2. Estrutura e replicação de *Orthobunyavirus***

Apesar de sua importância em saúde pública, pouco se sabe especificamente sobre a biologia molecular de OROV, e a maior parte do que se sabe são conhecimentos adquiridos em experimentos com outros *Orthobunyavirus*, com Bunyawera (BUNV), protótipo da família, e Lacrosse (LACV) (GUU; ZHENG; TAO, 2012). No entanto, tem se tornado progressivamente mais claro que existem significantes diferenças de estrutura e mecanismos moleculares entre diferentes *Orthobunyavirus*, e é provável que existam exceções às generalizações comumente feitas para o gênero (ELLIOTT, 2014). Como outros *Orthobunyavirus*, OROV é provido de envelope, com diâmetro entre 80 e 120 nm, e o envelope tem glicoproteínas de superfície inseridas na bicamada lipídica. O genoma se constitui de três segmentos de RNA de polaridade negativa: designados L (*large*), M (*medium*) e S (*small*) (NICHOL et al., 2001; SCHMALJOHN; NICHOL, 2006; GUU; ZHENG; TAO, 2012, ELLIOTT; SCHMALJOHN, 2013) (Figura 1).



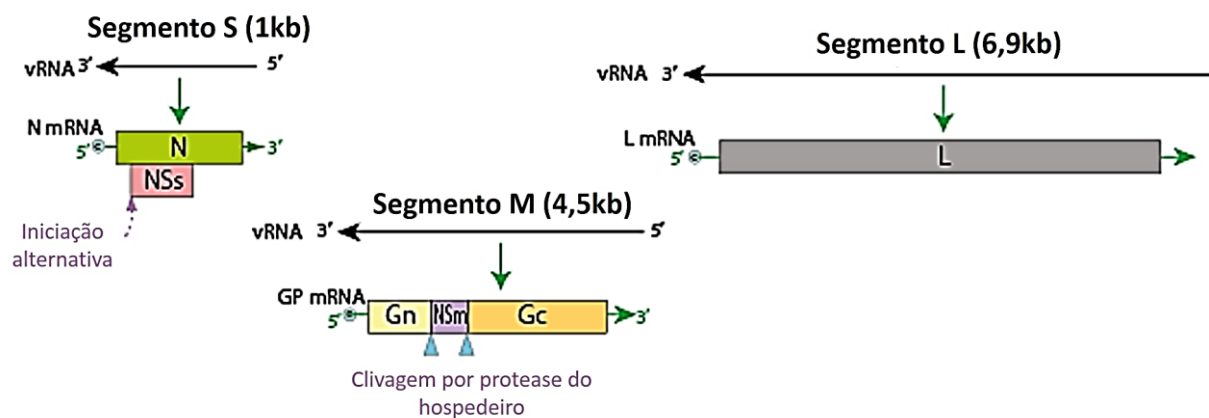
**Figura 1** - Desenho esquemático de Orthobunyavirus.



Modificado de ELLIOTT, 2014.

O segmento L de RNA codifica uma proteína grande (L), que tem atividade de RNA-polimerase-RNA-dependente (RpRd), que é parte integrante dos nucleocapsídeos, e executa a transcrição e a replicação dos segmentos do RNA genômico. O segmento M de RNA codifica uma poliproteína, cuja clivagem origina as glicoproteínas de superfície Gn e Gc, respectivamente das regiões 5' e 3' do mRNA, e a proteína não estrutural NSm, situada entre Gn e Gc. O segmento S de RNA codifica a proteína estrutural do nucleocapsídeo N e, em uma ORF (*open reading frame*) alternativa superposta, a proteína não estrutural NSs (ELLIOTT, 1990; SCHMALJOHN; NICHOL, 2006; WALTER; BARR, 2011; ELLIOTT; SCHMALJOHN, 2013; ELLIOTT, 2014) (Figura 2).

**Figura 2** - Estratégia de codificação genômica dos Orthobunyavirus. Detalhes no texto.



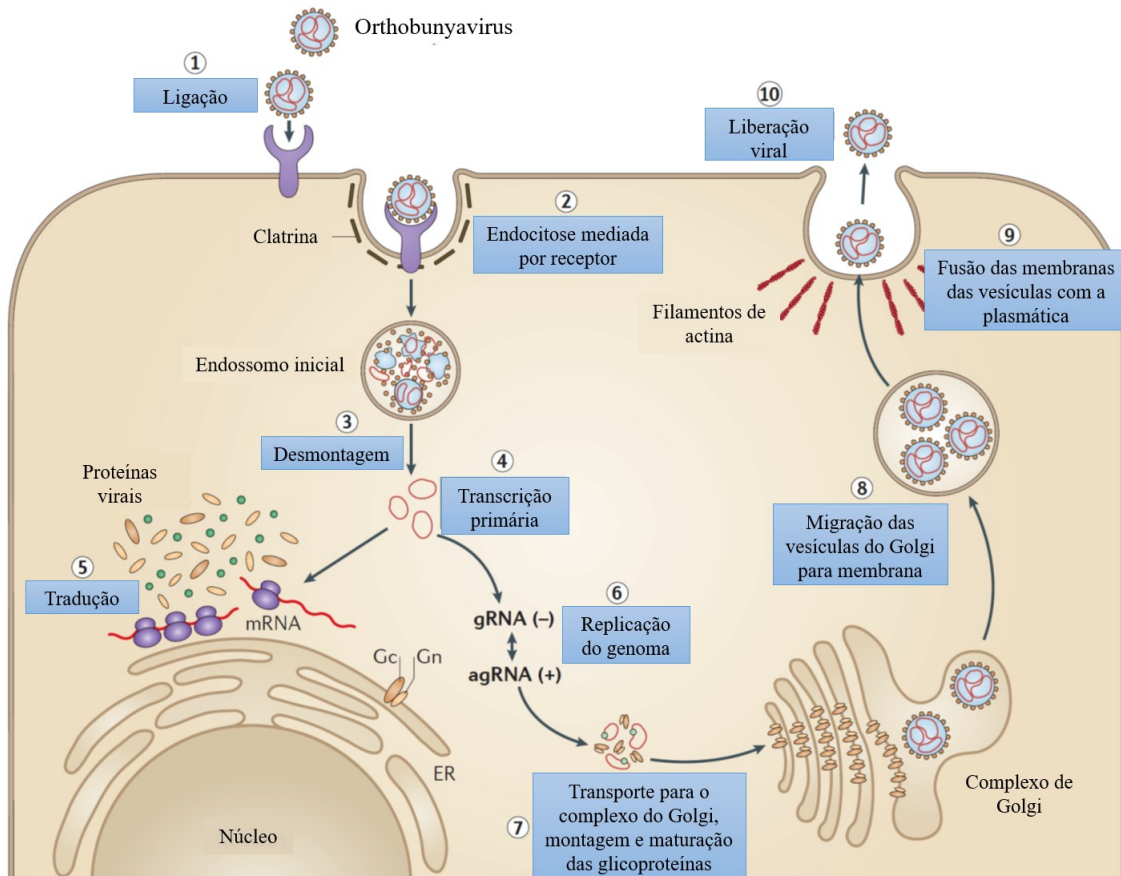
Modificado de [http://viralzone.expasy.org/82?outline=all\\_by\\_species](http://viralzone.expasy.org/82?outline=all_by_species).

O ciclo de replicação dos *Bunyaviridae* se inicia com a ligação do vírus à célula hospedeira mediada pela interação das glicoproteínas virais com receptor cuja identidade ainda é desconhecida no caso do OROV (Figura 3, etapa 1). A entrada de OROV se dá por endocitose mediada por clatrina (Figura 3, etapa 2), cuja acidificação desencadeia o processo de fusão do envelope viral à membrana do endossomo levando ao desnudamento dos ribonucleocapsídeos (Figura 3, etapa 3) (SANTOS et al., 2008). A exposição ao citosol de ribonucleocapsídeos aos quais se associa a RpRd resulta na transcrição de mRNAs a partir do RNA genômico, cuja tradução dá origem às proteínas virais (Figura 3, etapas 4 e 5); bem como de RNA(+) complementar, de comprimento equivalente ao genoma, e que servirá de molde para a síntese dos genomas da progênie (Figura 3, etapa 6) (SCHMALJOHN; NICHOL, 2006; ELLIOTT; SCHMALJOHN, 2013; ELLIOT, 2014).

Os vírus da família *Bunyaviridae* utilizam a estratégia de *cap snatching*, que consiste em remover estruturas cap 5' de mRNAs celulares e utilizá-los como iniciadores para a síntese de mRNAs virais, executada por uma atividade endonuclease da própria RpRd viral (GUU; ZHENG; TAO, 2012). À medida que há tradução de proteínas virais e produção de RNA genômico, ocorre a montagem de *virions* da progênie, com posterior maturação, que para a maioria dos *Bunyaviridae* já estudados ocorrem no complexo de Golgi (Figura 3, etapas 7, 8, 9 e 10), com exceção dos hantavírus Sin Nombre e Black Creek Canal, que brotam da membrana plasmática (SCHMALJOHN; NICHOL, 2006). Não são conhecidos detalhes da montagem de OROV, mas estudos recentes indicam que esta ocorre em estruturas semelhantes a corpos multivesiculares (Nathalia Barbosa em submissão). A infecção de células HeLa com

OROV BeAn19991 (MOI=10) mostrou que 30 a 36 horas após a infecção houve máxima produção de progênie, resultando em eficiência replicativa de cerca de  $4 \log_{10}$  (ACRANI et al., 2010).

**Figura 3** - Ciclo de replicação dos Orthobunyavirus.



Modificado de ELLIOTT et al., 2014. Detalhes no texto.

### 1.3. Patogênese

Muito pouco se sabe sobre a patogênese da infecção humana por OROV. Sabe-se que a infecção é sistêmica, com viremia nos primeiros 2-4 dias de sintomas (PINHEIRO et al., 1981), e que aproximadamente 5% dos pacientes têm acometimento do sistema nervoso central (SNC), com meningite ou meningoencefalite (AZEVEDO et al., 2007; MOURÃO et al., 2009). O vírus é detectável no líquido (PINHEIRO et al., 1982; FIGUEIREDO, 2007), embora não se saiba como o vírus chega ao espaço subaracnóideo (PINHEIRO et al., 1982). O vírus infecta leucócitos do sangue periférico (LUNA et al., 2017), e é possível que atinja o SNC e outros tecidos pela estratégia de cavalo de Tróia, consequente à diapedese. A patogênese dos sintomas

gerais e sistêmicos da infecção não é conhecida, mas à semelhança de outras infecções arbovirais poderia ser devida à reação inflamatória sistêmica da fase aguda com circulação de citocinas, e é possível que a ativação direta de leucócitos pela infecção por OROV contribua para esse quadro. É curioso que cerca de 2 a 10 dias após o fim dos sintomas cerca de metade dos pacientes com OROV sofrem recrudescência dos sintomas, com quadro idêntico ao da fase aguda, porém sem viremia detectável por isolamento em cultura de células (PINHEIRO et al., 1981; PINHEIRO; TRAVASSOS DA ROSA; VASCONCELOS, 2004). Mortes devidas a infecção por OROV nunca foram relatadas, e não existem dados de autópsia disponíveis.

A infecção experimental por OROV foi induzida em nosso laboratório, tanto em hamsters (RODRIGUES et al., 2011) quanto em camundongos (SANTOS et al., 2012; SANTOS et al., 2014). Cerca de metade dos animais inoculados desenvolve infecção sistêmica sintomática, com títulos virais que atingem  $10^{6.0}$  TCID<sub>50</sub>/mL de plasma no terceiro dia pós-infecção, com hepatite e meningoencefalite, e com abundante marcação para antígeno de OROV em neurônios (RODRIGUES et al., 2011; SANTOS et al., 2012). O modelo experimental evidenciou que em infecção murina pela via subcutânea OROV alcança o cérebro em modelos murinos pela via neural, com abundante infecção de neurônios e intensa gliose reativa (SANTOS et al., 2012).

#### **1.4. Apoptose**

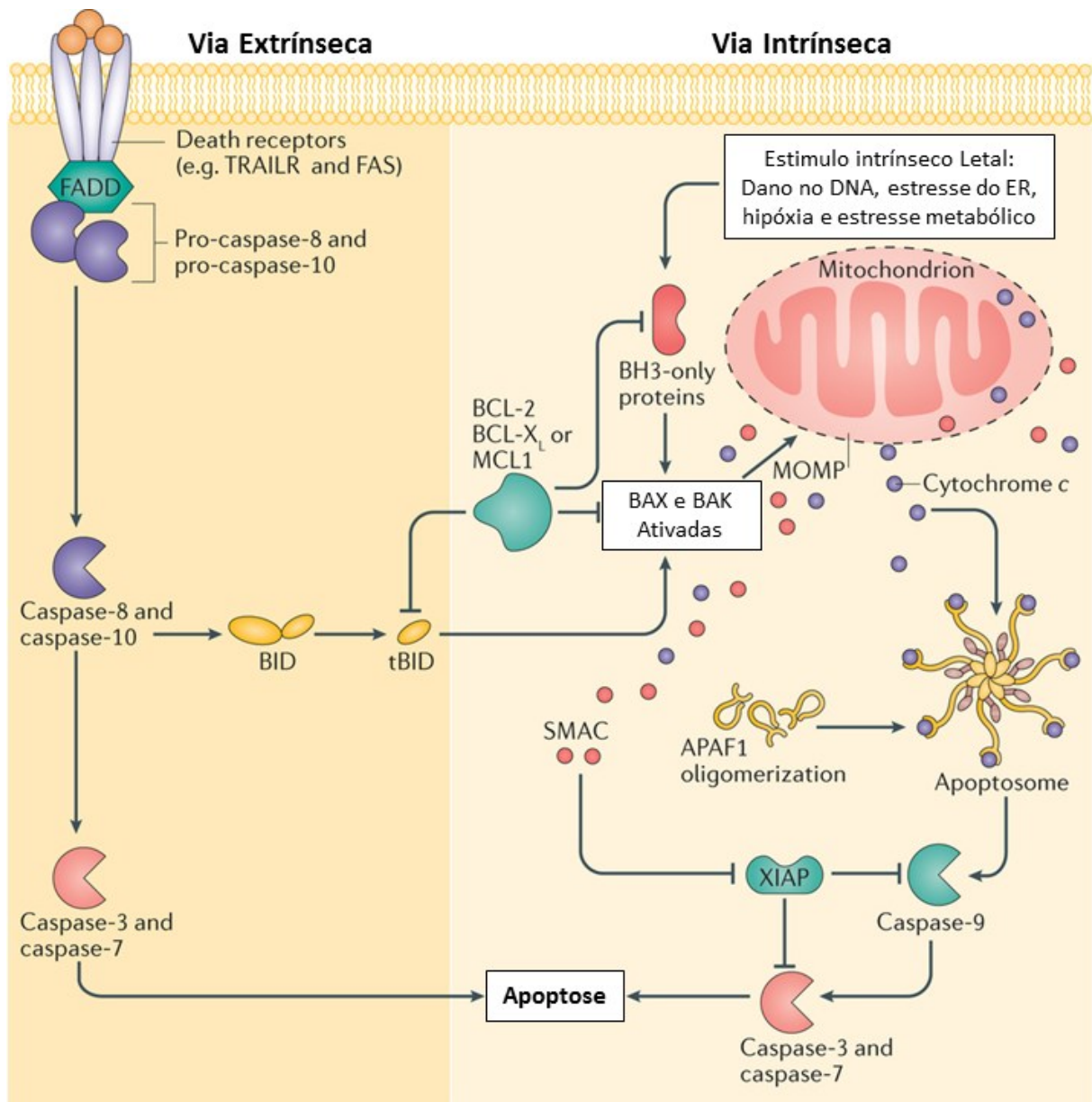
Apoptose, ou morte celular programada, está intimamente ligada à homeostase tecidual, especialmente na eliminação de células em diversas situações, com destaque para a modelagem tecidual no período embrionário (BRILL et al., 1999). As células em apoptose sofrem mudanças morfológicas caracterizadas pelo retraimento da célula, hipercondensação da cromatina, clivagem dos cromossomos em fragmentos, em bolhamento (*blebbing*) da membrana plasmática, e empacotamento de conteúdos celulares em formações envoltas por membrana, chamadas corpos apoptóticos, que serão subsequentemente fagocitados por macrófagos. A apoptose pode ser desencadeada por duas vias principais, uma delas iniciada pela ligação de moléculas ativadoras de receptores de morte presentes na membrana, como as proteínas da família do receptor de TNF, que inclui a proteína Fas, e a outra iniciada por sinais intracelulares que levam a perturbações no potencial de membrana mitocondrial, com consequente liberação de elementos pró-apoptóticos como citocromo C e Smac/DIABLO para o citosol. Ambas as vias da apoptose promovem a ativação de uma cascata proteolítica constituída por uma família de proteases denominadas caspases (WU et al., 2001; ALBERTS et al., 2014).

Caspases são cisteíno-proteases pertencentes a uma família com 11 representantes conhecidos em seres humanos: caspases 1-10 e caspase 14. As caspases clivam vários substratos celulares após resíduos de ácido aspártico, e desempenham papéis essenciais na apoptose, inflamação, proliferação e diferenciação celular (THORNBERRY; LAZEBNIK, 1998; FISCHER et al., 2003). As caspases são sintetizadas como zimógenos, consistindo em um domínio pro-amino-terminal de comprimento variável e um domínio de protease carboxi-terminal, e podem ser subdivididas de acordo com o comprimento de seus prodomínios amino-terminais. As caspases iniciadoras (como as caspases 8, 9 e 10) possuem grandes pro-domínios, contendo motivos de interação proteína-proteína da superfamília dos domínios de morte, tal como o domínio de recrutamento de caspase (CARD) ou o domínio efetor de morte (DED). Esses motivos de interação permitem o recrutamento de pró-caspases em complexos multiproteicos (como o apoptossomo), por interações com moléculas adaptadoras. Dentro desses complexos, as pró-caspases sofrem alterações conformacionais e/ou autoprocessamentos necessários para sua ativação. Em contraste, as caspases efetoras (caspases 3, 6 e 7) têm pro-domínios curtos de apenas alguns aminoácidos, e não possuem motivos de interação. Essas caspases requerem ativação proteolítica pelas caspases iniciadoras, ou por outras proteases para exercer sua atividade enzimática (BOATRRIGHT et al., 2003; SHI, 2004).

Na via intrínseca da apoptose o papel das membranas mitocondriais é controlado principalmente pelo balanço entre ações de proteínas pró- e anti-apoptóticas da família Bcl2. A família de proteínas Bcl2 compreende três principais subfamílias: 1) elementos anti-apoptóticos, incluindo Bcl2 e Bcl-xL, que possuem quatro domínios de homologia com Bcl2 (BH): BH1, BH2, BH3 e BH4; 2) elementos pró-apoptóticos, tais como Bax, Bak e Bok, que têm os domínios BH1, BH2 e BH3; e 3) proteínas contendo apenas o domínio BH3, tais como Bid, Bim, Bad, Bik e Puma (TSUJIMOTO, 2002). A família Bcl2 de proteínas regulam a apoptose por alteração da permeabilidade da membrana mitocondrial e controlando a liberação de citocromo c.

Em algumas situações, a via extrínseca de apoptose pode cruzar com a via intrínseca, através de proteólise da proteína Bid mediada pela caspase 8. Após ser clivada, Bid truncada (tBid) pode promover a liberação de citocromo c mitocondrial e a montagem do apoptossomo (formado por aproximadamente 7 moléculas de APAF-1 e o mesmo número de unidades de caspase 9) (TSUJIMOTO, 2002; ALBERTS et al., 2014).

Figura 4 - Vias Intrínseca e extrínseca da apoptose.



Modificado de ICHIM et al., 2016. Detalhes no texto.

### 1.3.1. Vírus e apoptose

Muitas infecções virais produtivas resultam em danos à célula infectada, e a apoptose é uma via de morte celular que pode ser iniciada por interferência viral com vias metabólicas específicas (EVERETT; MCFADDEN, 1999; GALLUZZI et al., 2008). Apoptose é frequentemente considerada como uma defesa da célula hospedeira, desencadeada por proteínas de *checkpoint* do ciclo celular em resposta a danos ao DNA, mas também como efeito de produtos gerados durante infecções. Esse conceito é muito útil para explicar infecções por vírus

que modulam a apoptose, por inibir ou atrasar o processo, de modo em que a vida da célula seja prolongada e permita a produção da progênie viral (O'BRIEN, 1998). Por outro lado, há produtos de infecções virais que podem induzir apoptose (EVERETT; MCFADDEN, 1999; SINGH et al., 2012), e acredita-se que traga vantagem ao vírus por ser um processo mais 'silencioso' do que a necrose celular quanto ao recrutamento de respostas imuno-inflamatórias, assim favorecendo a disseminação viral no tecido antes da deflagração completa de resposta antiviral local (HAY; KANNOURAKIS, 2002).

### **1.3.2. Apoptose induzida por OROV**

Estudos prévios realizados pelo nosso grupo de pesquisa mostraram que OROV induz morte celular por apoptose em células HeLa, coincidindo com a máxima produção de progênie, com ativação de caspases 3 e 9, alteração de potencial de membrana mitocondrial e extravasamento de citocromo c (ACRANI et al., 2010), indicando ativação de apoptose pela via intrínseca. Ficou também demonstrado que a indução da apoptose por OROV em células HeLa dependia da produção de proteínas virais, e não era desencadeada por OROV inativado por UV (ACRANI et al., 2010).

Estudos de patogênese de OROV em modelos de infecção experimental subcutânea em murinos mostraram que há intensa reação glial e sinais indicativos de fagocitose neuronal, característica frequentemente associada com apoptose (RODRIGUES et al., 2011; SANTOS et al., 2012). De fato, experimentos realizados pelo nosso grupo mostraram que a infecção experimental de camundongos (SANTOS et al., 2012) e hamsters (dados não publicados) induz apoptose em células do SNC e do fígado.

Na família *Orthobunyaviridae* o efeito apoptótico foi primeiramente notado em culturas de células e em cérebros de camundongos recém-nascidos infectados com (LACV) (PEKOSZ et al., 1996). Foi identificado que a proteína NSs de LACV tem uma sequência de aminoácidos similar à da proteína Reaper de *Drosophila*, que está envolvida na regulação da atividade de caspases e pode induzir apoptose (COLON-RAMOS et al., 2003).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

O objetivo geral deste projeto foi aprofundar a investigação sobre a apoptose induzida pela proteína NSs de OROV.

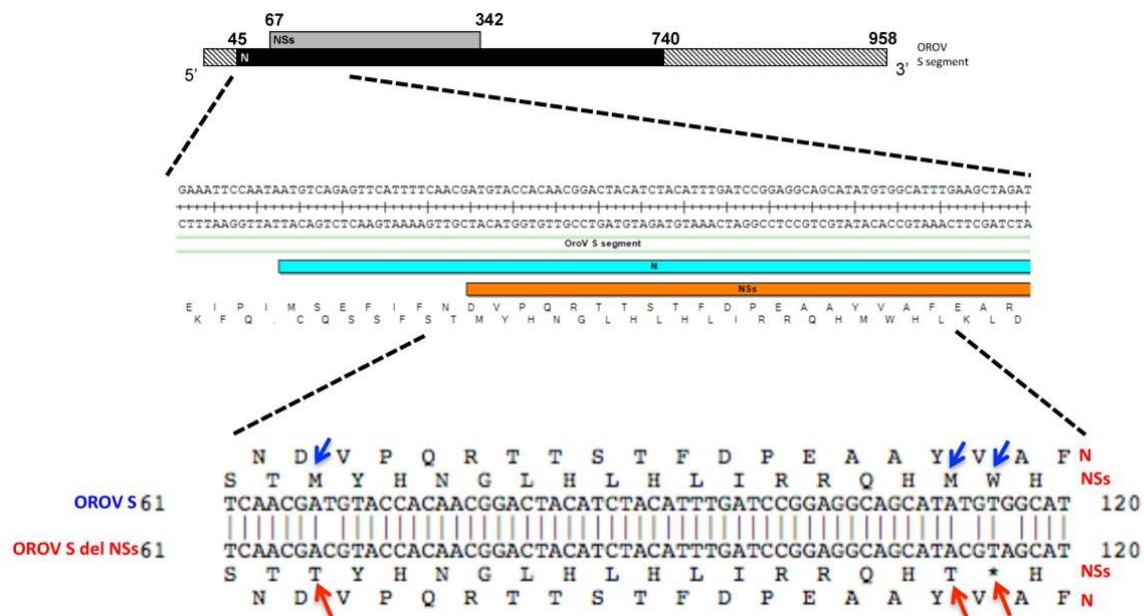


### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.2. Vírus

Foram utilizados vírus Oropouche selvagem (OROVwt) cepa BeAn19991 e OROV recombinante incapaz de produzir a proteína NSs (OROVdelNSs). Clone infeccioso de OROVdelNSs foi produzido mediante estratégia de genética reversa (TILSTON-LUNEL; ACRANI et al., 2016), e resgatado pela transfecção simultânea de células com três plasmídios onde foram clonados os três segmentos de RNA viral, com o segmento menor mutado por mutagênese sítio-dirigida, de modo a silenciar um códon alternativo de iniciação, desse modo não havendo produção da proteína NSs. Como a sequência codificante de NSs está no mesmo segmento genômico da proteína N, em uma ORF superposta, a mutação no gene da NSs foi feita de modo a não alterar a sequência de aminoácido do gene N, como esquematizado na Figura 5.

**Figura 5** - Diagrama representativo do seguimento S de OROV, indicando mutações pontuais desenhadas para criar o clone do vírus deletado da proteína NSs.



A área destacada mostra a sequência dos nucleotídeos 61 ao 120. A sequência superior corresponde ao seguimento S original, enquanto a sequência inferior corresponde a sequência mutada. As setas vermelhas e azuis indicam os resíduos que foram mutados por Quick Change PCR.

Após ter sido obtida a mutação desejada, o vírus foi resgato em nosso laboratório pela transfecção dos três plasmídeos que correspondem ao genoma viral, em células da linhagem BSRT7/5, que produz constitutivamente a T7 RNA polimerase necessária para a transcrição de RNAs virais a partir das sequências dos plasmídeos.

### 3.3. Células e cultivo

#### 3.3.1. Linhagens

**Tabela 1** - Linhagens celulares.

| <b>Célula</b>         | <b>Origem</b>   | <b>Meio de cultivo</b> |
|-----------------------|---|------------------------|
| HeLa                  | Epitelial - Adenocarcinoma cervical humano                              | MEM                    |
| Glioblastoma U-251    | Glioblastoma, astrocitoma humano  | DMEM                   |
| Neuroblastoma SH-SY5Y | Medula óssea – Neuroblastoma humano                                     | DMEM/F12               |
| Huh7                  | Hepatócito – Carcinoma hepático humano                                  | DMEM sem piruvato      |
| HCE                   | Células epiteliais de córnea humana transformadas com vetor Adeno SV-40 | SHEM                   |

Fonte: ATCC, ECACC, [www2.brc.riken.jp/cache/cell/RCB2280](http://www2.brc.riken.jp/cache/cell/RCB2280)

#### 3.3.2. Cultivo

As células foram cultivadas em meio apropriado para cada linhagem celular, suplementado com 10% de soro fetal bovino e antibióticos necessários para a manutenção das mesmas. As culturas foram mantidas a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Passagens para placas de 24 cavidades (com ou sem lamínulas, dependendo dos experimentos) foram feitas por tripsinização de monocamadas 100% confluentes, seguida de repique na quantidade de células necessárias para a obtenção da confluência desejada após 24 h. Após obter a confluência desejada, as culturas infectadas foram mantidas com o meio específico, porém com 2% de soro fetal bovino.

### 3.4. Ensaio de titulação viral por TCID<sub>50</sub>

Para quantificar títulos virais em experimentos de *one-step growth* de OROV, foi usada a técnica de TCID<sub>50</sub>/100 µL. Monocamadas semi-confluentes de células foram preparadas em placas de 24 cavidades e no momento da infecção as células foram contadas em câmara de

Neubauer para assegurar o uso de  $MOI=1$ . As cavidades contendo células foram lavados com 500  $\mu\text{L}$  de PBS gelado e, rapidamente, foi adicionado 200  $\mu\text{L}$  de PBS contendo vírus diluído, ou somente PBS no controle negativo. As células foram incubadas com o vírus em *rocker* com agitação lenta por duas horas em geladeira, para adsorção das partículas virais e a seguir as células foram lavadas com PBS e meio fresco com 2% de soro fetal bovino, previamente aquecido a  $37^{\circ}\text{C}$ , foi repostado para um volume final de 500 $\mu\text{L}$  por cavidade, sendo este definido como tempo 0 (zero). As culturas foram incubadas em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  com 5%  $\text{CO}_2$  por até 48 horas após a infecção. Nos tempos 0, 24, 36 e 48 horas o meio de cultura de uma das cavidades foi retirado, e as células remanescentes foram raspadas em 500 $\mu\text{L}$  de meio. Tanto o meio aspirado, quanto as células raspadas (após serem lisadas por três séries de congelamento/descongelamento rápido) foram clareados por centrifugação para baixar *debris* celulares, e a seguir os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos e armazenados em freezer a  $-70^{\circ}\text{C}$  para posterior titulação. Para titulação foram feitas diluições seriadas até  $10^{-8}$ , que foram inoculadas em quadruplicatas em células Vero preparadas em placas de 96 cavidades. As placas de titulação foram incubadas em estufa a  $37^{\circ}\text{C}$  com 5%  $\text{CO}_2$  até que fosse atingido efeito citopático para a leitura do título.

### **3.5. Imunofluorescência indireta**

Para ensaios de imunofluorescência (IF) indireta, cada lamínula foi transferida individualmente para uma placa de 24 cavidades contendo 400  $\mu\text{L}$  de solução fixadora (paraformaldeído 2%). As placas contendo lamínulas foram incubadas por 20 minutos à temperatura ambiente e em seguida foram lavadas cinco vezes com 500  $\mu\text{L}$  de PBS pH 7,4. Na última lavagem o PBS não foi retirado, e as placas foram mantidas na geladeira até o momento do uso. As lamínulas agora fixadas foram lavadas com 400  $\mu\text{L}$  de PBS pH 7,4 com glicina 0,1M por dez minutos, e depois mais três vezes de cinco minutos cada com 500  $\mu\text{L}$  de PBS pH 7,4. Em seguida, as células foram permeabilizadas com 400  $\mu\text{L}$  de solução de Triton X-100 diluído 0,3% em PBS pH 7,4 por 15 minutos, e lavadas cinco vezes com 500  $\mu\text{L}$  de PBS pH 7,4. Cada lamínula foi incubada por 40 min em câmara úmida a  $37^{\circ}\text{C}$  com solução bloqueadora consistindo em PBS pH 7,4 com 1% de BSA e 3% de soro de animal da mesma espécie na qual foi produzido o anticorpo secundário utilizado, para bloquear ligações inespecíficas do anticorpo, seguindo-se 2 lavagens de 5 minutos com 500  $\mu\text{L}$  de PBS pH 7,4. Cada lamínula foi incubada por 1 hora em câmara úmida a  $37^{\circ}\text{C}$  com 25  $\mu\text{L}$  do anticorpo primário em diluições

previamente padronizadas para cada anticorpo, preparadas em solução de PBS pH 7,4 com 1% de BSA. Em seguida as lamínulas foram lavadas cinco vezes por 5 minutos cada com 500  $\mu$ L de PBS pH 7,4. Após incubação com os anticorpos primários, as lamínulas foram incubadas por 40 minutos em câmara úmida a 37°C com 25  $\mu$ L cada do anticorpo secundário, em diluições previamente padronizadas para cada anticorpo, preparadas em solução de PBS pH 7,4 com 1% de BSA. As lamínulas foram lavadas cinco vezes por 5 minutos com 500  $\mu$ L de PBS pH 7,4 e incubadas com o corante DAPI diluído 1:8000 para a marcação dos núcleos celulares por 10 minutos em câmara úmida a 37°C e ao abrigo da luz, em um volume suficiente para cobrir a lamínula. Em seguida, cada poço foi lavado cinco vezes por 5 minutos com PBS pH 7,4. Terminadas as marcações, as lamínulas foram montadas invertidas sobre cerca de 5  $\mu$ L de solução de montagem Fluormont em lâminas de vidro de microscopia comuns. As preparações foram examinadas em microscópio de fluorescência comum ou confocal em alguns experimentos.

### **3.6. Ensaio de TUNEL para análise da fragmentação de cromatina**

Para avaliar a ocorrência da fragmentação internucleossomal devido à morte celular por apoptose, foi realizado ensaio de TUNEL (Terminal *dUTP Nick End-Labeling*), que consiste na marcação das extremidades 3' OH livres do DNA clivado com nucleotídeos marcados com *tetramethylrhodamine* (TMR), adicionados pela enzima *terminal deoxynucleotidil transferase* (TdT) durante a reação. A marcação por TUNEL foi realizada conforme as recomendações do fabricante do kit *In Situ Cell Death Detection Kit, TMR red* (Roche). Quando o ensaio de TUNEL foi feito na mesma preparação submetida a IF, foi realizado sempre após marcações com os anticorpos. Após incubação com 50  $\mu$ L da reação de TUNEL do kit por uma hora em câmara úmida a 37°C, as lamínulas foram lavadas três vezes por 5 minutos com 500  $\mu$ L de PBS pH 7,4 e em seguida incubadas com DAPI 1:8000 por 10 minutos em câmara úmida a 37°C. Finalizada a marcação, as lamínulas foram montadas invertidas sobre 5  $\mu$ L de solução de montagem *Fluormont* em lâminas de vidro de microscopia e seladas com esmalte sem formol para preservação. Após montadas, as lâminas foram levadas para visualização no microscópio de fluorescência OLYMPUS BX40.

### 3.7. Ensaio de ativação de caspases 3, 8 e 9

Monocamadas semiconfluentes de células HeLa preparadas sobre lamínulas transfectadas com vetor de expressão da proteína NSs (pcDNA3.2/NSs), infectadas com OROV (MOI=1), ou tratadas com actinomicina D como controle positivo, além dos controles negativos: células transfectadas com vetor vazio, ou tratadas apenas com Lipofectamina 2000, ou apenas células normais, foram avaliadas por IF para caspase 3 efetora, e para as caspase iniciadoras 8 e 9. As células transfectadas bem como as tratadas com actinomicina D e Lipofectamina foram avaliadas após 24 horas, e as células infectadas com OROV e controle negativo foram avaliadas após 36 horas, tempos em que se observa cerca de 50% de efeito citopático.

Foram padronizadas as diluições apropriadas de cada anticorpo específico anti-caspase 3, 8 e 9, todos específicos para caspases em sua forma ativada. Após padronizadas as concentrações dos anticorpos primários, foram realizados ensaios de IF para detecção da ativação das caspases 3, 8 e 9, utilizando os anticorpos primários, policlonal anti-caspase 3 ativada (AB3623 - Chemicon) diluído 1:25, anticorpo monoclonal anti caspase 8 ativada (MA5-15054 -) diluído 1:100 e o anticorpo policlonal anti-caspase 9 ativada (PA1-26434 - Thermo Fisher Scientific) diluído 20 ug/ml além do anticorpo policlonal anti-OROV diluído 1:300. Os anticorpos secundários utilizados foram anti-mouse, IgG (H+L) Alexa Fluor 488 (A21202 - Invitrogen) diluído 1:700 contra o anticorpo anti-vírus para marcação de OROV, e anti-rabbit, Alexa Fluor 594 (ab150080 - Abcam) diluído 1:700 para marcação das caspases ativadas. As lamínulas foram incubadas com DAPI diluído 1:8000, e montadas invertidas com *Fluormount* sobre lâminas de microscopia. As imagens foram obtidas no microscópio de fluorescência OLYMPUS BX40.

### 3.8. Ensaio para detecção de extravasamento de citocromo c mitocondrial

Citocromo c é um importante componente da cadeia transportadora de elétrons (CTE) encontrada no espaço intermembranar da mitocôndria em condições normais. No citosol, citocromo c se liga a Apaf1 (*apoptotic protease activating factor-1*), causando sua oligomerização em uma estrutura de heptâmero chamada apoptossomo. O apoptossomo recruta e, por clivagem proteolítica, ativa a pró-caspase 9 iniciadora, que irá ativar caspases efetoras, como caspase 3, 6 e 7. As caspases efetoras, por sua vez, desempenham diversas funções no processo apoptótico final como, por exemplo, a ativação de endonucleases que levam à

fragmentação nuclear. Portanto, o citocromo c é um importante marcador da morte celular por apoptose envolvendo a mitocôndria.

Para avaliar a ocorrência de extravasamento do citocromo c de mitocôndrias devido à expressão da proteína NSs, foi feita IF de células HeLa em lamínulas infectadas com OROVwt e OROVdelNSs, ou transfectadas com vetor de expressão da proteína NSs. As culturas foram mantidas em estufa a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> até os tempos de 12 e 24 horas. Pouco antes de cada coleta, as células foram lavadas com PBS e foi adicionado o corante catiônico comercial MitoTracker Red (M7512, estoque a 1 mM), que é retido pelas mitocôndrias em condições normais de potencial de membrana mitocondrial, diluído 1:6000 em PBS. As células foram devolvidas à estufa e incubadas *in vivo* por mais 20 minutos. Em seguida, o corante foi retirado e as células foram lavadas em PBS e as lamínulas foram fixadas para IF. O protocolo de IF foi feito como descrito no item 1.9, usando anticorpo monoclonal anti-citocromo c (556433 - BD Pharmingen) diluído 1µg/mL e como anticorpo secundário o anticorpo anti-mouse IgG (H+L) com Alexa Fluor 488 (A21202 - Invitrogen) diluído 1:700. As mitocôndrias foram marcadas *in vivo* previamente com MitoTracker Red (ThermoFisher) e os núcleos foram corados com DAPI diluído 1:8000. As lamínulas foram montadas invertidas sobre lâminas de microscopia com *Fluormount* e as imagens foram obtidas no microscópio Confocal Leica SP5 do Laboratório Multiusuário de Microscopia Confocal (LMMC - FMRP-USP).

### 3.9. Translocação de p53

p53 é um fator de transcrição que se liga em sequências específicas de DNA para ativar a transcrição de genes-alvo envolvidos no controle do ciclo celular e apoptose (EL-DEIRY et al., 1992). Para avaliar a participação de p53 na apoptose desencadeado pela proteína NSs foi realizada IF indireta para detecção de p53 com anticorpo policlonal anti-p53 (sc-6243 - Santa Cruz Biotechnology) diluído 1:50 e como secundário contra ele o anti-rabbit, Alexa Fluor 594 (ab150080 - Abcam) diluído 1:700. Células HeLa em lamínulas depositadas em placas de 24 cavidades foram infectadas com os vírus OROVwt e OROV-deltaNSs (MOI=0,1). Outras cavidades foram transfectadas com os vetores de expressão pcDNA3.2/NSs e o vetor vazio pcDNA3.2/CAT como controle. Actinomicina D foi utilizada como controle positivo de apoptose, e uma cavidade foi mantida apenas com células HeLa normais. Após 24 horas de incubação em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, as células foram fixadas e submetidas ao ensaio de imunofluorescência com o anticorpo anti-OROV e anti-p53 diluído. As lamínulas foram

montadas invertidas sobre lâminas de microscopia com *Fluormount* e as imagens foram obtidas no microscópio de fluorescência OLYMPUS BX40.

### **3.10. Análise da exposição de resíduos de fosfatidilserina com Anexina V**

Em células normais os resíduos de fosfatidilserina (PS) encontram-se na face interna da membrana plasmática, mas se a célula entrar em processo de apoptose esses resíduos são expostos na superfície da membrana plasmática como um sinal para que sejam reconhecidas e fagocitadas (ENGELAND et al., 1998). Anexina V, uma proteína anticoagulante que na presença de  $\text{Ca}^{2+}$  interage forte e especificamente com resíduos de fosfatidilserina, pode ser utilizada como marcador da alteração de estrutura da membrana plasmática na apoptose (ANDREE et al., 1990). Para avaliar se o vírus OROVdelNSs promove a ativação de apoptose como o OROVwt, foi realizada detecção de resíduos de PS na face externa da membrana plasmática usando Anexina V conjugada com fluoróforo. Culturas semiconfluentes de células HeLa preparadas em lamínulas em placas de 24 cavidades e infectadas com OROVwt ou OROVdelNSs. As culturas foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de  $\text{CO}_2$  por aproximadamente 20 horas. A seguir as células foram lavadas com PBS gelado e em seguida incubadas com tampão de ligação da anexina (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, and 2.5 mM  $\text{CaCl}_2$ , pH 7.4) ao qual foi adicionado 20  $\mu\text{L}$  de Anexina V conjugada, à temperatura ambiente por 15 minutos. A seguir as células foram lavadas com tampão de ligação de anexina e fixadas, para a logo depois serem submetidas ao ensaio de IF. As lamínulas foram montadas invertidas sobre lâminas de microscopia com *Fluormount* e as imagens foram obtidas no microscópio de fluorescência OLYMPUS BX40.

### **3.11. Ensaio de meio condicionado para detecção de atividade parácrina de OROV**

Monocamadas semiconfluentes de células HeLa foram preparadas em placas de 6 cavidades e infectadas com os vírus OROVwt, OROVdelNSs, ou com o mock meio de cultura de uma cultura de HeLa não infectada como controle negativo. Os dois inóculos virais e o mock foram preparados em duplicata, sendo um previamente inativado por UV e outro não inativado. Após infectadas as culturas foram mantidas em estufa a 37°C e 5% de  $\text{CO}_2$  por 3 horas e a seguir os sobrenadantes foram coletados e congelados rapidamente em nitrogênio líquido. As alíquotas destinadas à inativação foram colocadas em placas de Petri e expostas à radiação UV a uma

distância de 5 centímetros da fonte por 5 horas sobre gelo. Os controles não inativados foram também mantidos sobre gelo pelo mesmo período de tempo, mas não expostos à radiação UV. Após inativação por UV, cada amostra foi titulada por ensaio de TCID<sub>50</sub> para confirmar a inativação. Comprovada a inativação dos vírus OROVwt e OROVdeINSs, foi realizado então o ensaio com o meio condicionado, em que células HeLa preparadas em monocamadas semiconfluentes sobre lamínulas de vidro foram tratadas com os sobrenadantes coletados inativados, puros e diluídos 1:2, 1:10, 1:100 e 1:1000, e uma cavidade foi preparada com sobrenadantes não submetidos à inativação, puros. As cavidades tratadas com os sobrenadantes inativados e não inativados foram suplementadas com 2% de soro fetal bovino. As culturas foram incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub> por 20 horas, e em seguida as lamínulas foram coletadas e fixadas em paraformaldeído a 4% para IF e detecção de caspase 8 ativada e as imagens foram obtidas em microscópio de fluorescência OLYMPUS BX40.

### **3.12. PCR Array**

Para ensaios de PCR array monocamadas 70% confluentes de células HeLa foram preparadas em placas de 24 cavidades e infectadas com OROVwt, rOROVwt, OROVdeINSs (MOI=1). Outras culturas foram transfectadas com vetores pcDNA3.2-NSs ou vetor vazio pcDNA3.2-CAT, ou somente com Lipofectamina como controle da transfecção. Outra cultura foi inoculada com o meio mock, consistindo em sobrenadante de uma cultura de células não infectada da mesma linhagem onde os vírus foram propagados. Cada controle foi preparado em triplicata, e o experimento inteiro foi repetido em dois dias diferentes. Após o tempo de 12 horas, cerca de metade (250 µL) do sobrenadante de uma das cavidades em triplicata foi retirado, bem como todo o sobrenadante das outras duas cavidades. Na cavidade em que o meio remanesceu, as células foram raspadas com os 250 µL restantes do sobrenadante, gerando suspensão celular que foi transferida para a próxima cavidade da triplicata, e em seguida à terceira cavidade, obtendo-se um produto final concentrado de 250 µL. A cada suspensão celular foi adicionado 750 µL do reagente de extração Trizol Reagent (Life Technologies) e cada tubo foi homogeneizado por inversão por seis vezes. Essa mistura foi submetido ao protocolo de extração de RNA total por Trizol, como recomendado na bula do fabricante. Ao final da etapa de extração, os RNAs foram ressuspensos com 30 µL de água ultra pura (Gibco), e foi adicionado 1 µL de inibidor de RNaseOut (Invitrogen), um reagente de preservação de RNA. O RNA total foi submetido à reação de transcrição reversa com o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems) e o cDNA obtido foi



armazenado a  $-30^{\circ}\text{C}$  (por uma semana) até o momento do uso. A mistura de PCR para o ensaio de PCR *array* foi preparada com 112,50  $\mu\text{L}$  de TaqMan Universal Master Mix II, No AmpErase UNG (2X), 1,80  $\mu\text{L}$  de cDNA, e 110,70  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  ultrapura, totalizando volume de 225  $\mu\text{L}$ , suficiente para 2 portas do *card* de PCR *array*.

Cada *mix* de de PCR foi homogeneizada por inversão seis vezes, e então centrifugada brevemente, e mantidas no gelo durante todo o preparo até a aplicação no *card*. Para aplicação das amostras foram utilizadas ponteiras de 200  $\mu\text{L}$  livres de nucleases, com filtro. Cada amostra foi aplicada duas vezes, cada uma com 112,50  $\mu\text{L}$  nas portas correspondentes do *card*. A PCR em tempo real foi pre-carregada via CD disponibilizado pela empresa, no equipamento ViiA 7 Real Time PCR System (Applied Biosystems). Após serem obtidos os dados de cada corrida, foi utilizada plataforma para análises de quantificação relativa com software específico presente no Cloud - Thermo Fisher.

### **3.13. Análise computacional da proteína NSs de OROV**

A predição analítica dos aspectos físico, químicos e estruturais de uma proteína é uma importante ferramenta para o entendimento da sua função. Para realizar a análise computacional da proteína NSs foram utilizados duas plataformas *online* diferentes, o Tmpred para predição de hélices transmembrana (encontrado no portal ExPASy - SIB Bioinformatics Resource) e o Phyre2 (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>) para a predição estrutural. A sequência de aminoácidos da proteína NSs foi submetida a avaliação por essas ferramentas que baseiam suas análises na comparação com sequências depositadas em bancos de proteínas resolvidas quanto às suas propriedades estruturais.

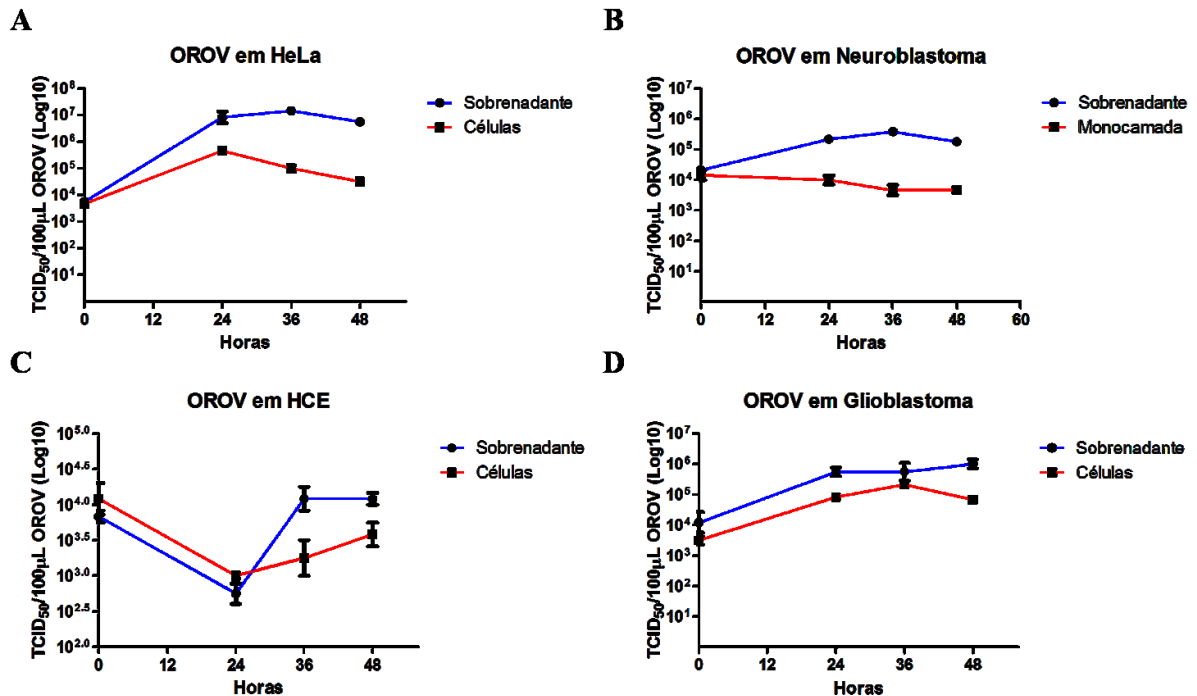
## 4. RESULTADOS

### 4.1. Susceptibilidade à infecção por OROV e apoptose induzida pela proteína NSs em diferentes linhagens de células humanas

A primeira etapa desse trabalho foi avaliar se havia efeito pró-apoptótico desencadeado pela infecção por OROV e pela super-expressão da proteína NSs de OROV em células HeLa, bem como em outras linhagens celulares humanas contínuas, como linhagem de células epiteliais de córnea humana (HCE), glioblastoma (U-251) e neuroblastoma (SH-SY5Y).

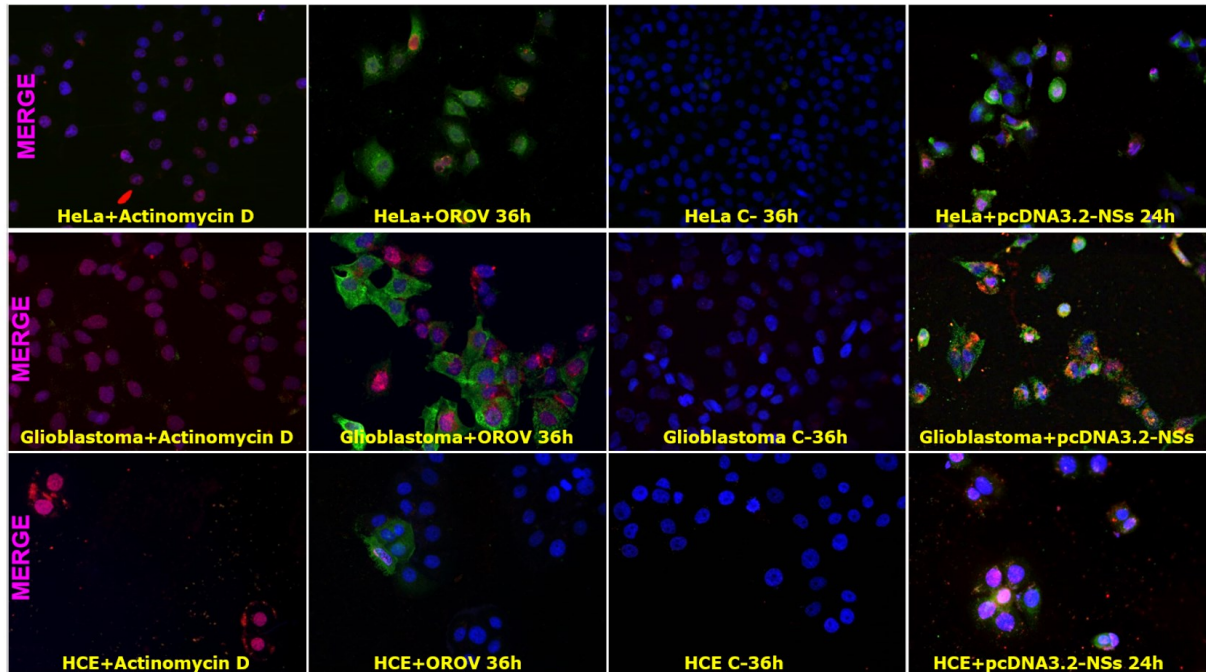
Os títulos de OROV obtidos ao longo do tempo pós-infecção de cada uma das linhagens celulares (MOI=1) mostraram variação tanto no sobrenadante quanto nas células coletadas da monocamada nos tempos 0, 24, 36 e 48 horas pós-infecção (Figura 6). O maior título foi observado 36 horas após a infecção em células HeLa ( $10^{7,5}$  TCID<sub>50</sub>/mL) (Figura 6-A), seguindo-se as linhagens de neuroblastoma SH-SY5Y ( $10^{6,5}$  TCID<sub>50</sub>/mL) (Figura 6-B). As células epiteliais de córnea humana (HCE) tiveram máxima produção viral 36 horas pós-infecção, porém geraram o menor título ( $10^{4,0}$  TCID<sub>50</sub>/mL) (Figura 6-C); e a replicação viral nas células de glioblastoma U-251 foi a mais lenta, atingindo produção máxima no sobrenadante somente às 48 horas pós-infecção, com título de  $10^{6,5}$  TCID<sub>50</sub>/mL (Figura 6-D).

**Figura 6** - Replicação de OROV em células e sobrenadantes de culturas de diferentes linhagens celulares ao longo de 48 horas.



Para avaliar a apoptose induzida pela proteína NSs de OROV também ocorre em diferentes linhagens celulares, vimos que a fragmentação nuclear por ensaio de TUNEL ocorria em diferentes linhagens celulares de origem humana, dentre elas HCE, neuroblastoma SH-5YSY e glioblastoma U-251 e células hepáticas HuH7 foram marcadas para caspase 3 ativada na vigência de infecção por OROV. A infecção por OROV, bem como a expressão da proteína NSs postransfecção, foram confirmadas por IF nas linhagens. A fragmentação nuclear foi visualizada por ensaio de TUNEL em células tratadas com actinomicina D, infectadas com o OROV, ou transfectadas com vetor de expressão da proteína NSs, mas não em células normais como controles (Figura 7).

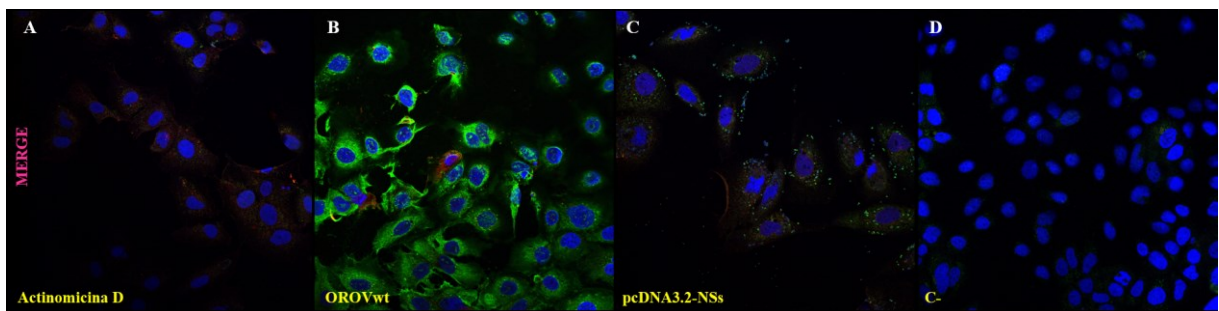
**Figura 7** - Imunofluorescência para detecção de OROV e para NSs em células HeLa, glioblastoma e HCE, com detecção de fragmentação de DNA por TUNEL.



Painel com todas as imagens do experimento em APÊNDICE A, B e C.

As células da linhagem hepáticas Huh7 também apresentaram evidência de apoptose, com marcação positiva para caspase 3 ativada, nas mesmas condições em que as outras linhagens foram positivas pelo ensaio de TUNEL (Figura 8-A, B e C). As células controles negativas do experimento não apresentaram marcação para vírus ou proteína e nem para caspase 3 ativada (Figura 8-D). Esses dados juntos demonstram que várias linhagens celulares são susceptíveis à apoptose desencadeada por OROV ou pela proteína NSs.

**Figura 8** – Imunofluorescência de células HuH7 para detecção de OROVwt, NSs e caspase 3 ativada.

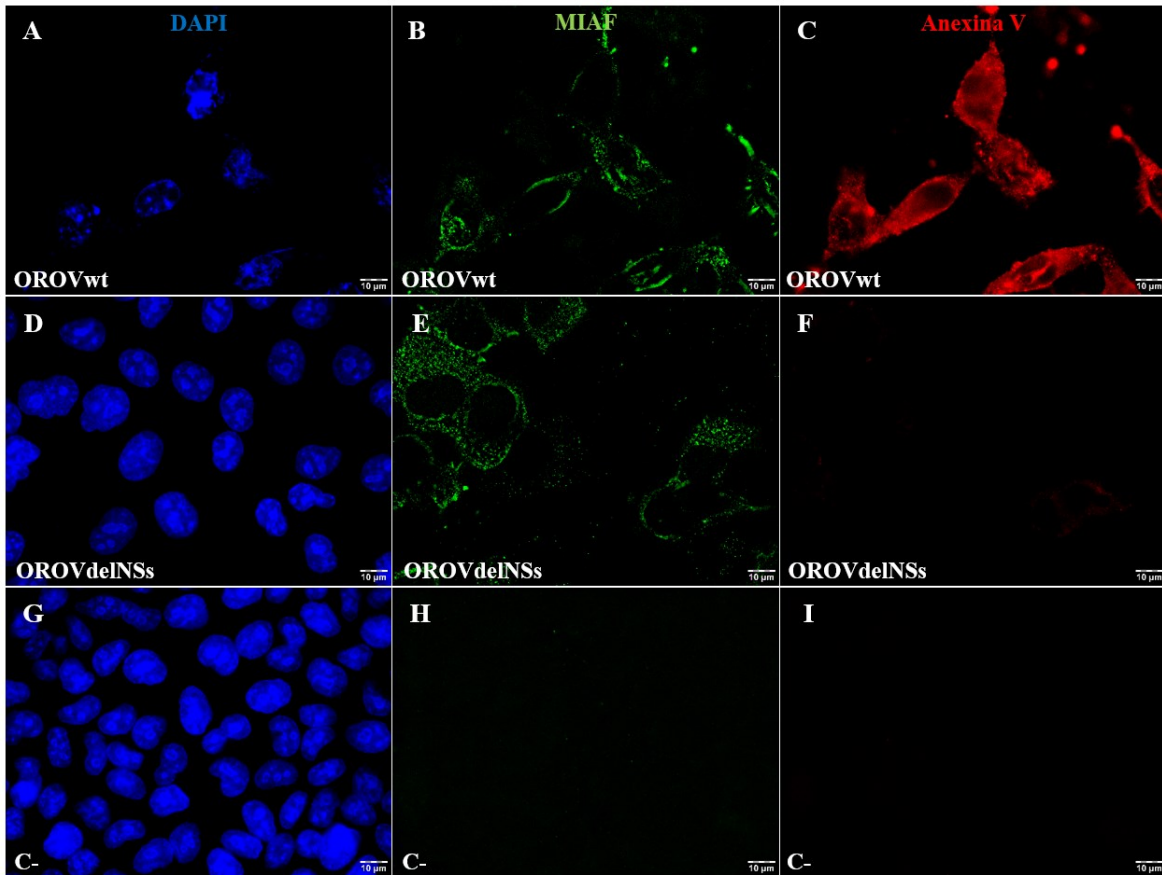


Painel com todas as imagens do experimento em APÊNDICE D.

#### **4.2. Detecção com anexina V da exposição de fosfatidilserina**

As células em apoptose modificam a organização da estrutura de suas membranas plasmáticas para sinalizar sua morte no ambiente extra-celular, e células fagocitárias reconhecem este sinal e removem as células que estão morrendo pelo processo de fagocitose. Um desses sinais é a exposição de resíduos de fosfatidilserina (PS) na superfície da membrana plasmática no início do processo de morte celular por apoptose. Células HeLa cultivadas em monocamada semi-confluyente sobre lamínulas em placas de 24 cavidades foram infectadas com os vírus OROVwt ou OROVdelNSs (MOI=0,1) (Figura 9). Após 12 horas as células foram tratadas com anexina V conjugada com rodamina, e em seguida o experimento foi avaliado por IF para detecção de resíduos de fosfatidilserina. Foi observada marcação positiva para anexina V apenas nas células infectadas com o vírus OROVwt (Figura 9-C). As células infectadas com o vírus OROVdelNSs (Figura 9-F) não apresentaram marcação positiva para fosfatidilserina nem o controle negativo (Figura 9-I).

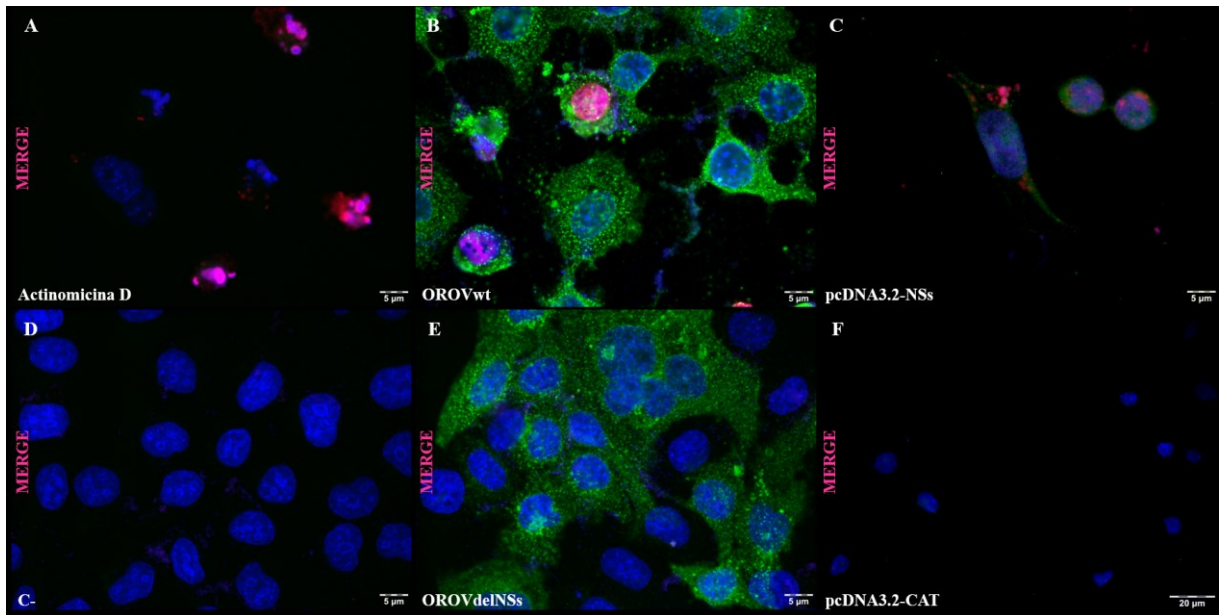
**Figura 9** - Marcação para fosfatidilserina com Anexina V em células HeLa infectadas com OROVwt, OROVdelNSs.



#### 4.3. Ativação da via intrínseca de apoptose pela proteína NSs de OROV

Após confirmar que OROV induz apoptose em diferentes linhagens de células humanas, avaliamos a necessidade da proteína NSs para o desencademaneto da morte celular. Inicialmente foi realizado ensaio de TUNEL em monocamadas semi-confluentes de células HeLa, usando actinomicina D como controle positivo, e infecções com os vírus OROVwt e OROVdelNSs (MOI=0,1), bem como transfecção com vetor pcDNA3.2-NSs e vetor vazio pcDNA3.2-CAT, além de um controle negativo células HeLa normais (Figura 10). Dentre as células infectadas, marcação positiva por TUNEL e forte efeito citopático foram vistos nas células tratadas com Actinomicina D (Figura 10-A) e inoculadas com OROVwt, mas não com OROVdelNSs (Figura 10-B e E) e foi observada marcação nas células super-expressando NSs (Figura 10-C). Nas células controles não houve sinal no ensaio de TUNEL e a monocamada permaneceu preservada (Figura 10-D e F).

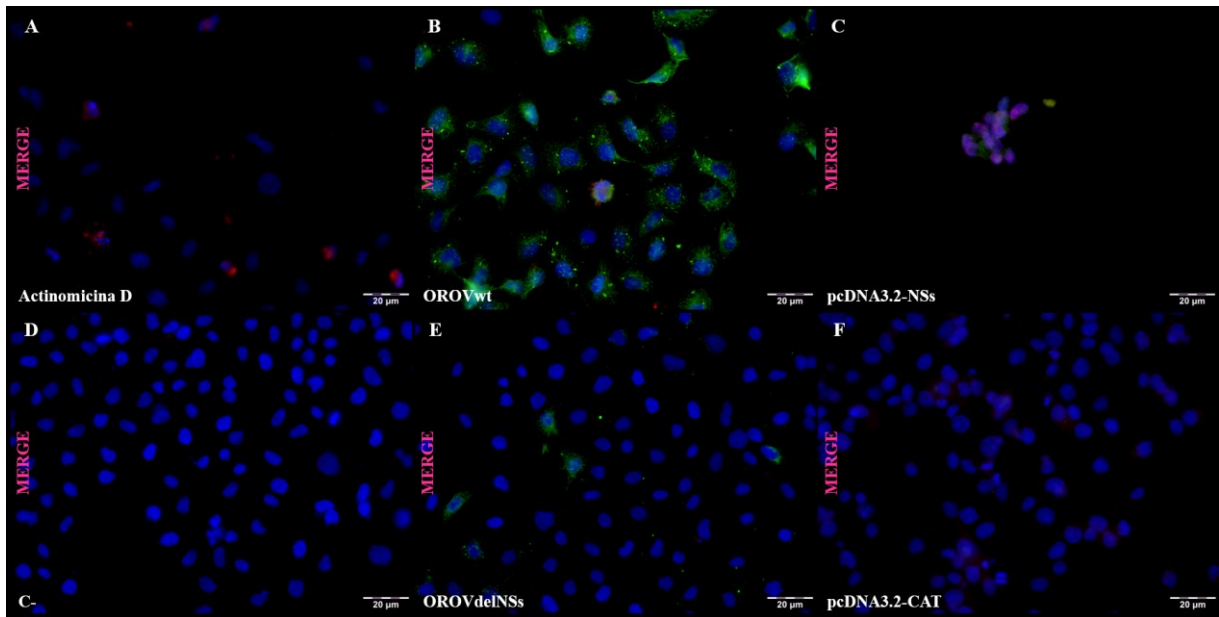
**Figura 10** - Imunofluorescência de células HeLa infectadas com OROVwt ou OROVdelNSs ou superexpressando a proteína NSs, para detecção de fragmentação nuclear pelo ensaio de TUNEL.



Painel com todas as imagens do experimento em APÊNDICE E.

A seguir, foi avaliada a necessidade da proteína para a atividade de caspase 3 em apoptose induzida por OROV em células HeLa. Células HeLa em lamínulas foram infectadas com OROVwt ou OROVdelNSs (MOI=1), ou transfectadas com vetor de expressão da proteína NSs pcDNA3.2-NSs, ou com o vetor controle pcDNA3.2-CAT. Células tratadas com Actinomicina D foram o controle positivo e células normais não infectadas e não-transfectadas foram controles negativos (Figura 11). Como era esperado, células infectadas por OROVwt e células super-expressando NSs (Figura 11-B e C) foram positivas para caspase 3 ativada e o efeito citopático, assim como células tratadas com Actinomicina D (Figura 11-A). O vírus OROVdelNSs não induziu ativação de caspase 3 (Figura 11-E), nem o vetor pcDNA3.2-CAT (Figura 11-F) e as células controle (Figura 11-D).

**Figura 11** - Imunofluorescência de células HeLa infectadas com OROVwt ou OROVdelNSs ou superexpressando a proteína NSs, para detecção de caspase 3 ativada.

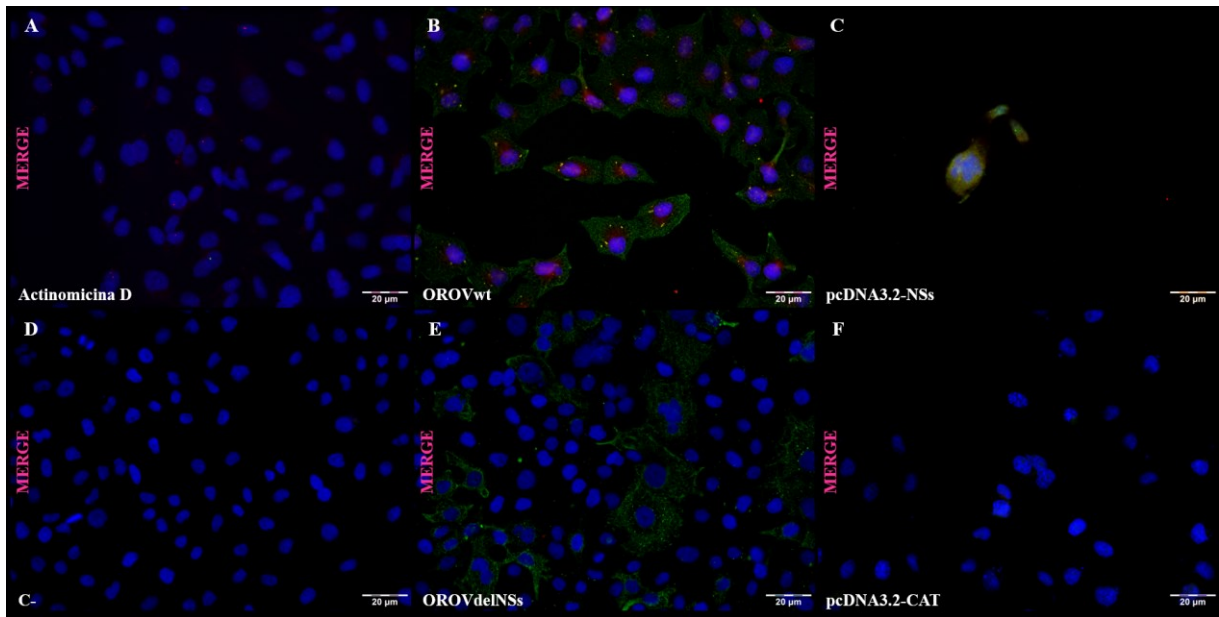


Painel com todas as imagens do experimento em APÊNDICE F.

Caspase 9, iniciadora da via intrínseca ou mitocondrial de apoptose, é ativada após extravasamento de citocromo c do espaço intermembranar da mitocôndria e montagem da estrutura do apoptossomo com a proteína APAF1. Para avaliar se proteína NSs de OROV promove a ativação de caspase 9, foi realizada IF indireta para detectar caspase 9 ativada. Células HeLa tratadas infectadas com OROVwt ou OROVdelNSs, ou transfectadas com o vetor de expressão pcDNA3.2-NSs foram avaliadas para detecção de caspase 9 ativada (Figura 12). Células infectadas com OROVwt e transfectadas com vetor pcDNA3.2-NSs foram positiva para caspase 9 ativada por IF (Figura 12-B e C), enquanto células normais (Figura 12-D), infectadas com o OROVdelNSs (Figura 12-E) ou transfectadas com vetor vazio pcDNA3.2-CAT (Figura 12-F) foram negativas.



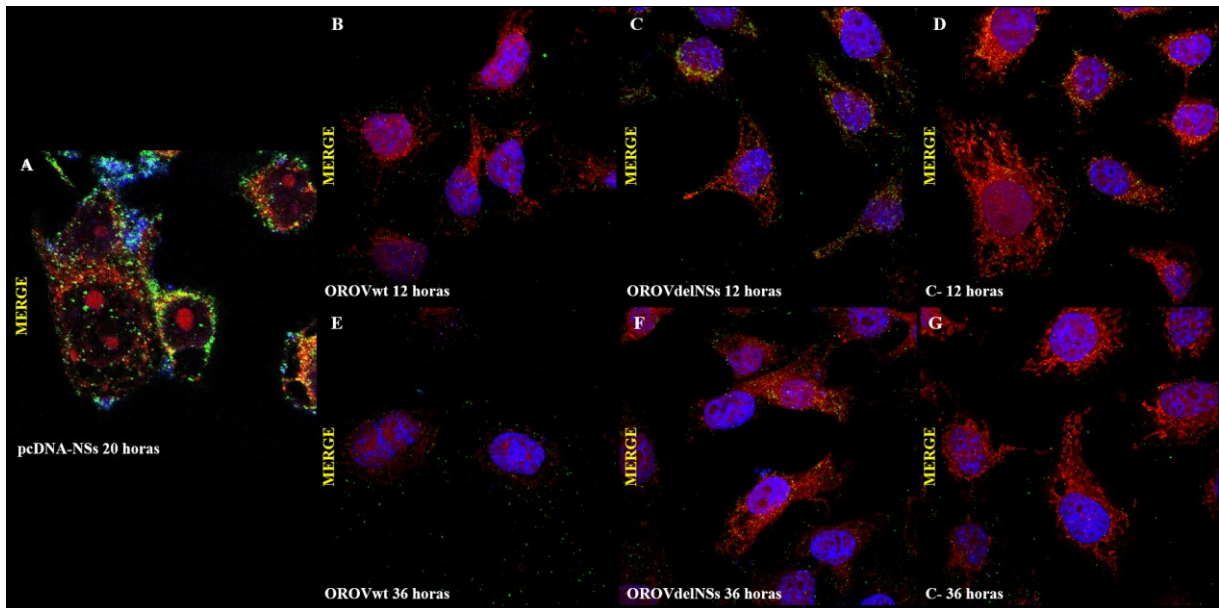
**Figura 12** - Imunofluorescência de células HeLa infectadas com OROVwt ou OROVdelNSs ou super-expressando NSs, para detecção de caspase 9 ativada.



Painel com todas as imagens do experimento em APÊNDICE G.

Citocromo C quando liberado do espaço intermembranar da mitocôndria para o citosol se liga a Apaf1 (*apoptotic protease activating factor-1*) causando sua oligomerização em uma estrutura chamada apoptossomo, que ativa caspases, culminando na morte celular por apoptose. Para avaliar a ocorrência de extravasamento do citocromo C de mitocôndrias foi feita IF de células HeLa infectadas com OROVwt ou OROVdelNSs, ou transfectadas com vetor pcDNA3.2/NSs (Figura 13). Células foram incubadas com o corante fluorescente MitoTracker Red (ThermoFisher), aqui utilizado para a marcar mitocôndrias. As células transfectadas com vetor pcDNA3.2-NSs (Figura 13-A) e infectadas como o vírus OROVwt (Figura 13-B e E) apresentaram marcante despolarização da membrana mitocondrial, indicada pela redução da marcação por MitoTracker, e o citocromo c foi visualizado disperso no citoplasma, sem colocalização com mitocôndrias. Nas células infectadas com o vírus OROVdelNSs (Figura 13-C e F) e nas células controle (Figura 13-D e G) foi possível observar integridade das mitocôndrias, que colocalizaram com a marcação para citocromo c. As imagens foram obtidas em microscópio Confocal Leica SP5 do Laboratório Multiusuário de Microscopia Confocal (LMMC - FMRP-USP).

**Figura 13** - Imunofluorescência para citocromo c em células HeLa infectadas com OROVwt ou OROVdelNSs, ou super-expressando NSs de OROV.

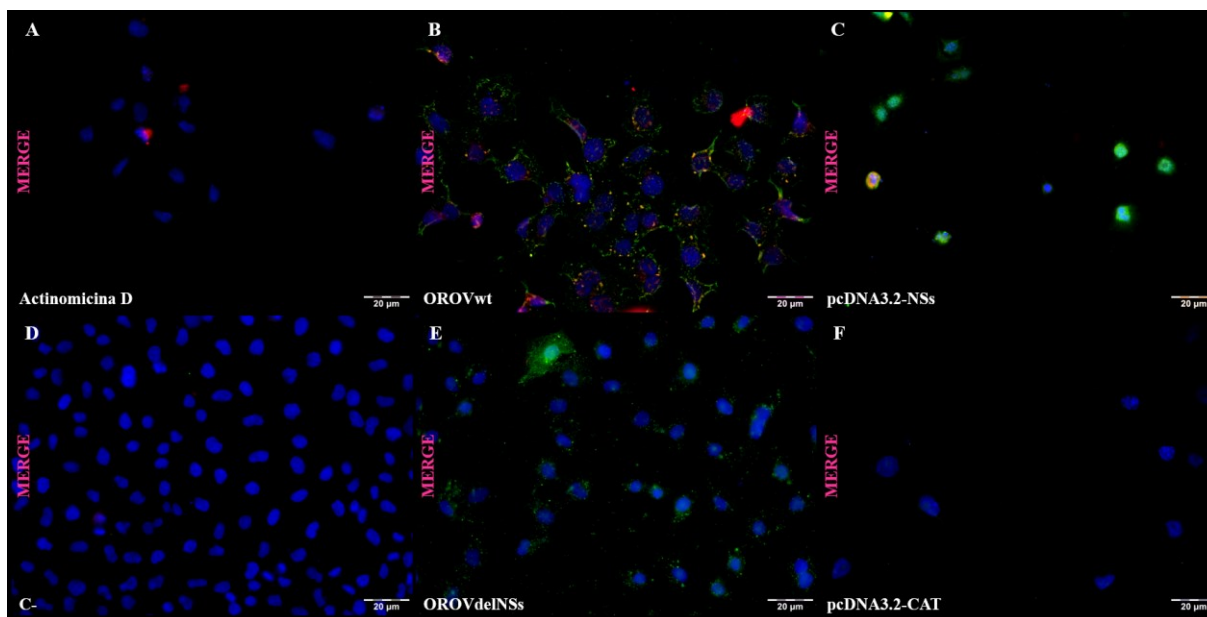


#### 4.4. Ativação da via extrínseca pela proteína NSs

Após confirmar o papel da proteína NSs de OROV em ativar elementos da via intrínseca ou mitocondrial de apoptose, investigamos se essa proteína promoveria a ativação da via extrínseca, ou via dos receptores de morte de apoptose.

Para isso, foi realizada IF indireta para detecção de caspase 8 ativada em células HeLa tratadas com actinomicina D, ou infectadas com OROVwt ou com OROVdelNSs, ou transfectadas com o vetor de expressão pcDNA3.2-NSs, ou com o vetor controle pcDNA3.2-CAT (Figura 14). As células tratadas com actinomicina D (Figura 14-A), infectadas com OROVwt (Figura 14-B) ou transfectadas com vetor pcDNA3.2-NSs (Figura 14-C) apresentaram marcação positiva para caspase 8 ativada. No entanto, células controle negativo (Figura 14-D), ou infectadas com o OROVdelNSs (Figura 14-E), ou ainda transfectadas com vetor pcDNA3.2-CAT (Figura 14-F) não se mostraram positivas e as monocamadas permaneceram preservadas.

**Figura 14** - Imunofluorescência para caspase 8 ativada em células HeLa infectadas com os vírus OROVwt ou OROVdelNSs, ou super-expressando NSs de OROV.



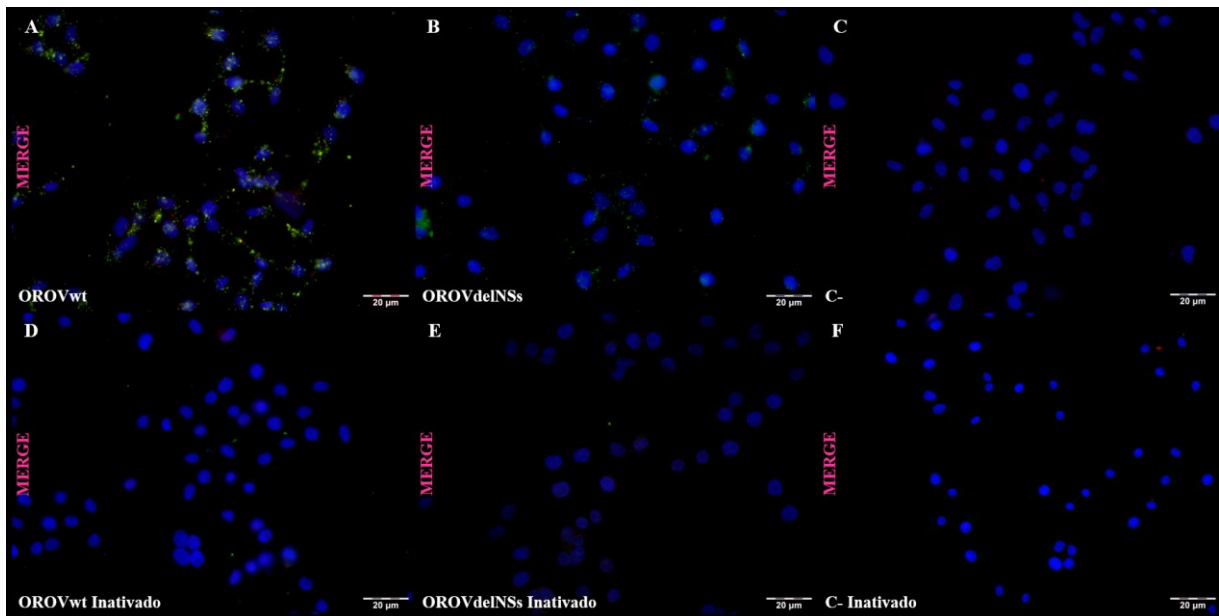
Painel com todas as imagens do experimento em APÊNDICE H.

#### 4.4.1. Ensaios de meio condicionado para avaliação da atividade parácrina na apoptose induzida por OROV

Ensaios de meio condicionado são feitos usando meio de cultivo removido de uma cultura de células previamente infectadas com um vírus, para verificar seu efeito em uma segunda cultura de células, para avaliar se produtos secretados no meio induziriam o efeito a ser observado. Nesses ensaios, o meio condicionado foi preparado a partir do sobrenadante de células infectadas com os vírus OROVwt e OROVdelNSs, e células controles não infectadas, em duplicatas de culturas feitas em cavidades de placas de 6 cavidades. Os sobrenadantes dessas culturas foram coletados 36 horas após a infecção, e em seguida expostos à luz UV para inativação de partículas virais. Uma alíquota foi mantida nas mesmas condições, porém protegida da luz UV. Em seguida, células HeLa preparadas em monocamadas semi-confluentes em placas de 24 cavidades com lamínulas foram tratadas com os sobrenadantes coletados, tanto inativados quanto não inativados por UV, durante 20 horas, e em seguida as lamínulas do experimento foram fixadas e submetidas à imunofluorescência para detecção de caspase 8 ativada (Figura 15). As células expostas ao sobrenadante da cultura de OROVwt (Figura 15-A) não inativado por UV foram positivas na marcação para caspase 8 ativada, de modo similar às células infectadas com OROVwt (Figura 14-B). As células tratadas com sobrenadante da

cultura de células infectadas com OROVdelNSs e sobrenadante de cultura de células não infectadas ambos, não inativados por UV não apresentaram ativação de caspase 8 (Figura 15-B e C). No entanto, células tratadas com os sobrenadantes que passaram pelo processo de inativação por UV, tanto procedentes de OROVwt quanto de OROVdelNSs, ou apenas de células também não apresentaram marcação para caspase 8 ativada (Figuras 15-D, E e F). Os dados sugerem que a ativação de caspase 8 na apoptose de células infectadas por OROV é independente da ação parácrina de fatores produzidos em células previamente infectadas por OROV.

**Figura 15** - Imunofluorescência para caspase 8 ativada em células HeLa após tratamento com meios condicionados obtidos de culturas prévias infectadas com OROVwt (a) ou OROVdelNSs (B), inativados (D e E) ou não por UV.

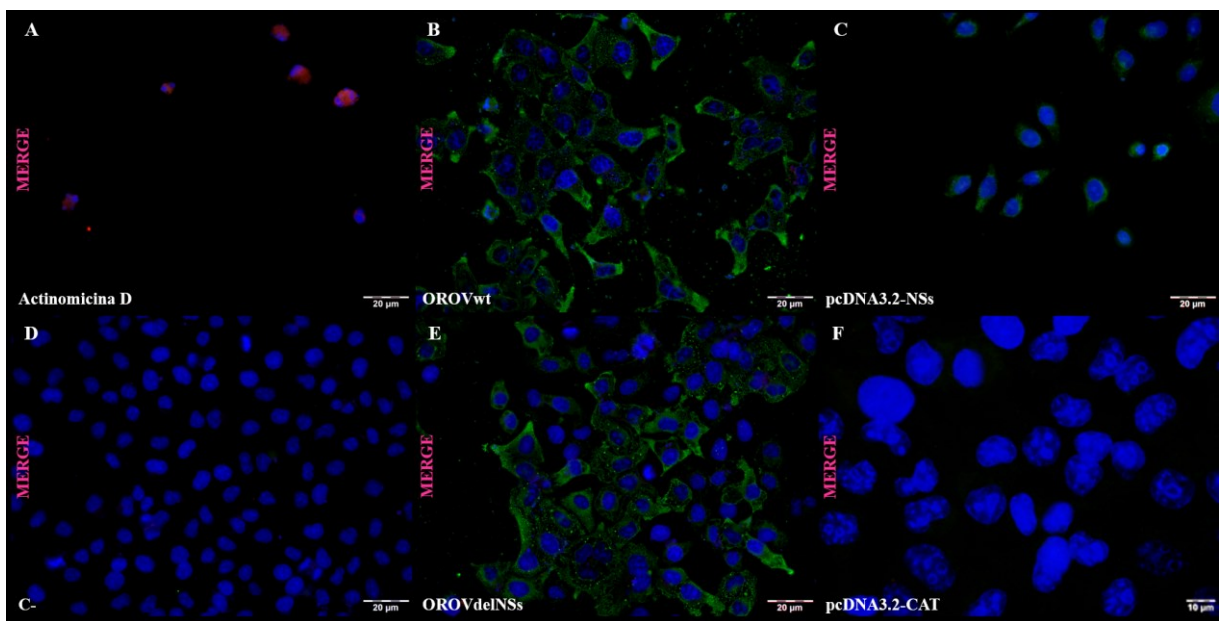


#### 4.5. Translocação de p53

p53 ou proteína supressora de tumor, é um importante fator pró-apoptótico, principalmente devido à sua capacidade de se ligar ao DNA em sequências específicas e promover a transcrição de genes que regulam a apoptose. Portanto, foi avaliado por IF o envolvimento de p53 na apoptose desencadeada pela proteína NSs de OROV. Células HeLa em monocamadas semi-confluentes em placas de 24 cavidades com lamínulas, foram tratadas com actinomicina D, ou infectadas com OROVwt ou OROVdelNSs, ou ainda transfectadas com pcDNA3.2-NSs ou com vetor controle pcDNA3.2-CAT (Figura 16). Células tratadas com actinomicina D mostraram sinais morfológicos de apoptose e foi observada intensa localização nuclear de p53, como era

esperado (Figura 16-A). Em células infectadas com OROVwt (Figura 16-B) ou células super-expressando a proteína NSs de OROV (Figura 16-C), não foi observada significativa translocação de p53 para o núcleo. O mesmo foi observado nos controles negativo (Figura 16-D), e em células infectadas com OROVdelNSs (Figura 16-E) e transfectadas com vetor vazio pcDNA3.2-CAT (Figura 16-F). Esses dados indicam que não há envolvimento de p53 na apoptose desencadeada pela proteína NSs de OROV.

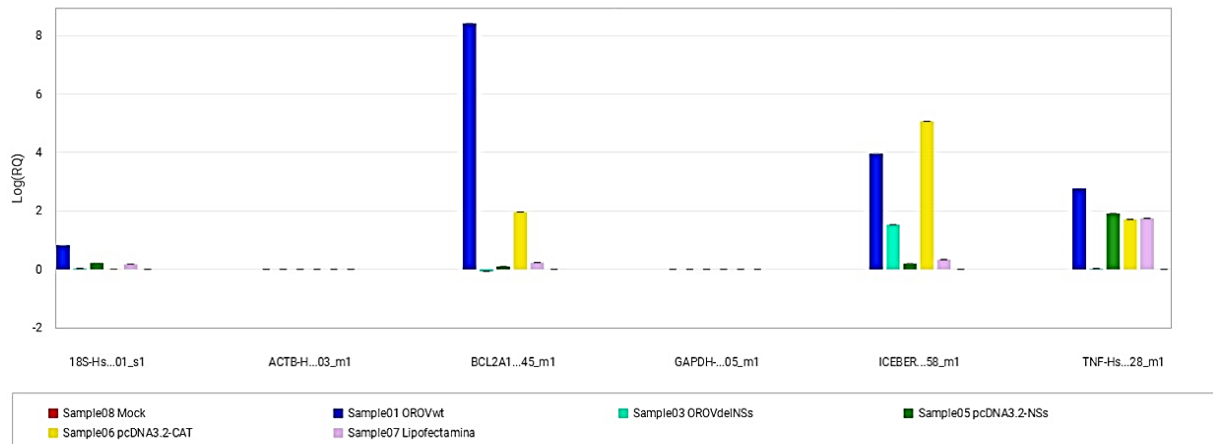
**Figura 16.** Imunofluorescência para de tecção de p53 em células HeLa infectadas por OROVwt ou OROVdelNSs, ou super-expressando NSs de OROV.



#### 4.6. PCR Array

Como estratégia para detectar possíveis alvos de NSs na indução de apoptose, foi realizado experimento de PCR *array* para avaliar alteração de expressão de um painel de 93 genes envolvidos com apoptose em células HeLa. Uma análise dos genes que sofreram regulação positiva ou negativa foi possível mediante comparação dos resultados em células infectadas com OROVwt com aqueles obtidos em células infectadas com OROVdelNSs e em células transfectadas com o vetor de expressão pcDNA3.2-NSs com aquelas transfectadas com o vetor vazio. (Figura 17). Um *hitmap* completo da análise feita em relação ao controle não infectado (*mock*), bem como com todos os controles do experimento encontra-se nos apêndices dessa Tese (APÊNDICE I).

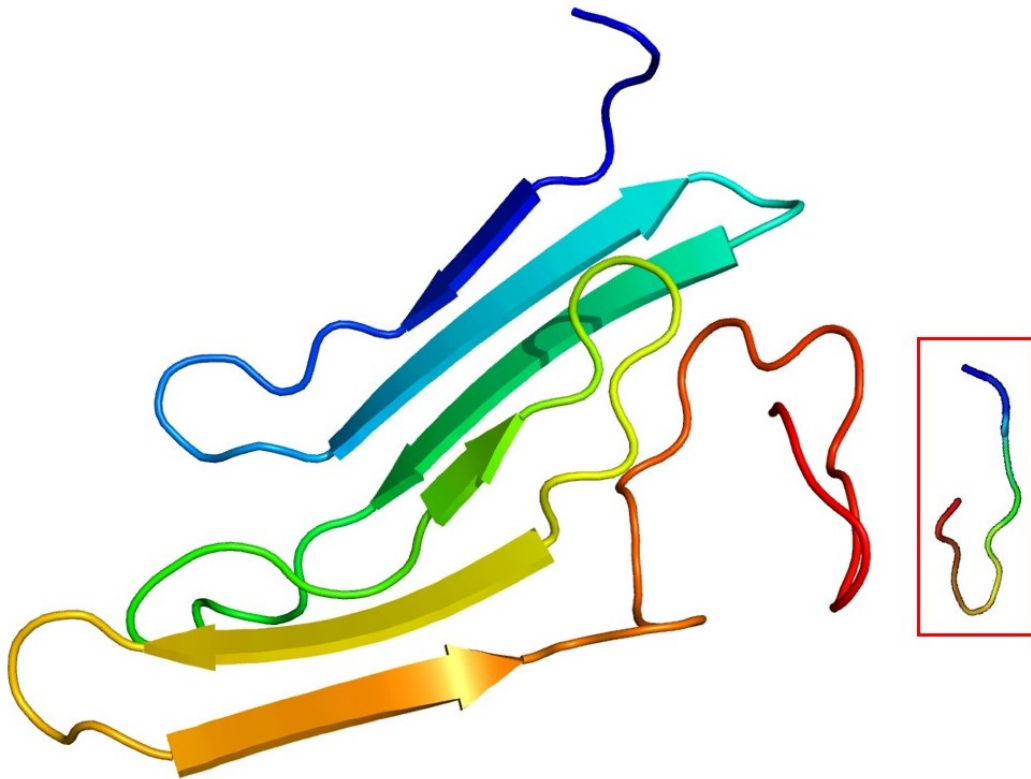
**Figura 17** – Genes cuja expressão foi mais alterada na presença da proteína NSs de OROV.



#### 4.7. Predição da estrutura da proteína NSs de OROV

A predição da estrutura da proteína NSs de OROV foi feita usando um conjunto de ferramentas disponíveis na plataforma Phyre2 para prever e analisar estrutura e função de proteínas a partir da sequência de aminoácidos deduzida de uma proteína. A plataforma Phyre2 utiliza métodos avançados de detecção de homologia remota para construir modelos 3D, prever sítios de ligação a ligantes e analisar o efeito de variações de aminoácidos na estrutura de proteína. Observou-se uma similaridade estrutural de cerca de 38% dos resíduos 79-91 (13 aminoácidos) da porção C-terminal da proteína NSs com receptor de TNF. A estrutura final predita está na figura 18.

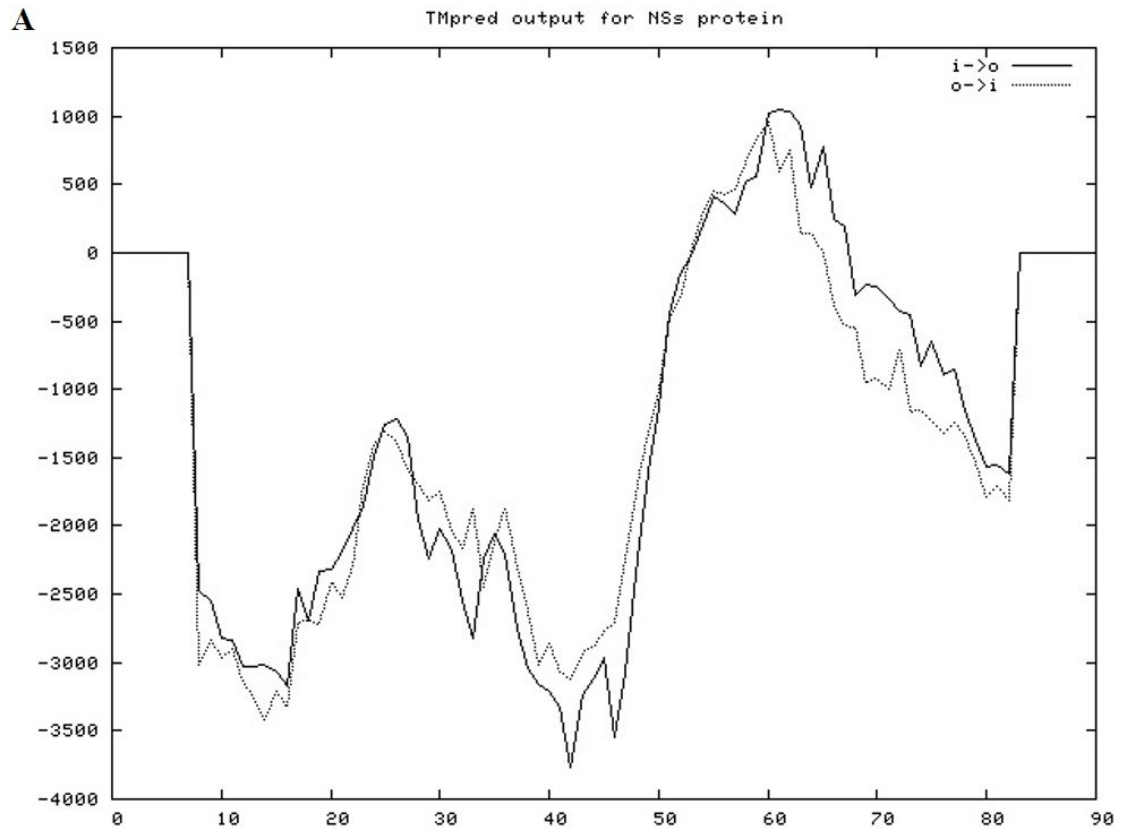
**Figura 18** - Modelo final predito da estrutura secundária da proteína NSs de OROV.



Retângulo vermelho indica região do receptor de TNF com similaridade.

A predição de domínios indica a existência de domínio transmembranar entre os aminoácidos 53 e 70 da proteína NSs, com a região C-terminal voltada para o meio extracelular (Figura 19).

**Figura 19** - Predição de domínios transmembrana na proteína NSs de OROV.



**B** Inside to outside helices : 1 found  
 from to score center  
 53 ( 53) 70 ( 70) 1045 62

Gráfico da estrutura predita de NSs de OROV (A). As posições da sequência entre parêntesis (B) demarcam a região central, com *score* de 1045, quando *score* acima de 500 é considerado significativo.



## 5. DISCUSSÃO

A proteína NSs de diversos elementos da ordem *Bunyavirales* tem despertado interesse, e vários resultados indicam sua importância no ciclo de replicação de alguns desses vírus (ELLIOTT et al., 2014). Por exemplo, estudos feitos com vírus Bunyanwera recombinante, que não expressava a proteína NSs, demonstraram que o vírus mutante apresentou menor replicação, com menores títulos de progênie em comparação ao vírus selvagem, além de formar placas de lise menores e, de maior importância, com virulência atenuada, resultando em atraso na mortalidade de animais infectados (BRIDGEN et al., 2001). Importantes resultados obtidos também com o vírus Bunyamwera recombinante mutante que não expressava proteína NSs, revelaram que essa proteína tem papel de neutralizar a ação de  $IFN\alpha/\beta$  em resposta à infecção (WEBER et al., 2002). Adicionalmente, a presença de proteína NSs inibiu a síntese de RNA viral medida por meio de sistema de mini-replicon (WEBER et al., 2001).

Já havíamos demonstrado cerca de uma década atrás, que OROV causava apoptose em células HeLa *in vitro* (ACRANI et al., 2010), e em células do sistema nervoso central *in vivo*, em infecção experimental de modelo murino (SANTOS et al., 2012). No presente estudo mostramos que a proteína NSs de OROV é um fator essencial na indução da apoptose. Esse resultado corrobora estudos anteriores, que mostraram que proteínas NSs de outros vírus, como La Crosse e Bunyamwera, também estão envolvidas no processo de morte celular por apoptose, mas de modos variáveis. Por exemplo, a NSs de Bunyamwera tem um efeito de atrasar a apoptose (KOHL et al., 2003), enquanto que a NSs de La Crosse desencadeia a apoptose (BLAKQORI et al., 2005) e tem similaridade na sequência primária de aminoácidos, além de efeito similar à proteína Reaper de *Drosophila* (COLON-RAMOS et al., 2003).

Acrani e colaboradores (2010) demonstraram que OROV selvagem da cepa BeAn19991 induz apoptose, mas não depende da apoptose para sua replicação, pois a produção de progênie não se alterou na presença do eficaz pan-inibidor de caspases Z-VAD. Esta foi uma observação interessante, que sugere que a indução de apoptose não-essencial à produção de progênie viral em infecção *in vitro*, pode ter papel importante na patogenicidade em infecções *in vivo*, o que é corroborado pelo achado de apoptose em células do SNC em modelo experimental (SANTOS et al., 2012).

Tendo documentado o efeito pro-apoptótico de NSs para células HeLa, investigamos a ocorrência do mesmo efeito em células de outras origens. Assim, preliminarmente, avaliamos a susceptibilidade de células epiteliais de córnea humana (HCE), glioblastoma da linhagem U-251, e neuroblastoma da linhagem SH-SY5Y à infecção por OROV e vimos que a

permissividade à produção de progênie viral foi variável, tanto em quantidade quanto em cinética de acúmulo, nas diferentes linhagens estudadas em comparação com células HeLa. Todavia, independentemente da permissividade a OROV, todas as linhagens de células humanas testadas apresentaram fragmentação nuclear típica da morte celular por apoptose. Essa observação amplia o efeito pró-apoptótico de OROV a várias linhagens celulares de origem tumoral, suscitando que deve ocorrer por um mecanismo independente da resistência natural que células malignas têm a sofrerem apoptose por interferência com mecanismos de controle de *check point*.

Há alguns anos foi observado no nosso laboratório, por Acrani et al (dados não publicados) que a super-expressão da proteína NSs de OROV por transfecção induzia fragmentação nuclear de células HeLa, levando ao descolamento das células e formação de corpos apoptóticos. No presente estudo, ficou claro que a indução de apoptose por OROV é função da proteína NSs, visto que o vírus que não expressa NSs OROVdelNSs não induziu a apoptose de células infectadas, como ficou demonstrado pela ausência de marcação de resíduos de fosfatidilserina por anexina V fluorescente, bem como de outros marcadores de apoptose que são fortemente positivos em células infectadas por OROVwt, como fragmentação do DNA nuclear por endonucleases, e ativação de caspase 3. Importammentemente, fragmentação nuclear e ativação de caspase 3 foram observados em células de diferentes linhagens transfectadas com plasmídeo de expressão com o gene de NSs de OROV, reforçando o papel de NSs como fator pró-apoptótico de OROV.

A ativação de caspases efetoras é decorrente da ativação de caspases ativadoras, como caspase 9 (via intrínseca) e caspase 8 (via extrínseca). Corroborando dados obtidos por Acrani (ACRANI et al., 2010) em células HeLa infectadas com OROV, o presente estudo mostrou que a expressão isolada de NSs em células HeLa induziu ativação de caspase 9, que não foi verificada na infecção por OROVdelNSs, deixando claro que o efeito isolado de NSs recapitula a apoptose induzida por infecção OROV, implicando a via mitocondrial de morte celular no seu mecanismo.

Os mecanismos de replicação e os efeitos celulares de diversos vírus frequentemente contam com importante envolvimento de mitocôndrias, que são usinas de produção de energia para o metabolismo da célula (ROJO et al., 1998, EL-BACHA; DA POIAN, 2013). Assim, é frequente que haja acúmulo de mitocôndrias nas fábricas virais, os chamados ‘corpúsculos de inclusão’, nos quais se concentram as atividades de replicação e montagem viral, que envolvem intenso trabalho enzimático de polimerases, helicases e proteases, além de intenso trabalho de tradução, consumindo grande parte da energia da célula. Exemplos de vírus que recrutam

abundantes mitocôndrias para seus sítios de replicação e montagem, são o vírus da febre suína africana (ROJO et al., 1998) e vírus de hepatite B, e esse trabalho de concentrar mitocôndrias em certas regiões depende de microtúbulos e dineína (KIN et al., 2007).

A dependência metabólica dos vírus da principal fonte de energia da célula frequentemente leva a danos à estrutura das mitocôndrias, não somente acarretando prejuízo energético para a célula, como também desencadeando estresse mitocondrial e disparando vias de sinalização que resultam em morte celular por apoptose.

A chamada via intrínseca de apoptose é desencadeada quando o estresse mitocondrial causa despolarização da membrana mitocondrial externa. Alguns vírus, como o Coxsackie B5 (GOMES et al., 2010), promovem despolarização de membranas mitocondriais, e alguns o fazem diretamente, pela abertura de canais ou poros na sua superfície, que podem ser formados por proteínas virais que atuam como viroporinas. O vírus HIV1, por exemplo, tem uma proteína chamada Vpr que promove a permeabilização da membrana mitocondrial interna por sua interação direta com a proteína ANT, e ativando-a para formar um poro de transição da permeabilidade (PTP) com os canais aniônicos dependentes de voltagem (VDAC) da membrana externa (DENIAUD et al., 2004). Essa alteração de permeabilidade leva ao extravasamento de moléculas pró-apoptóticas, como citocromo c e Smac/DIABLO, do espaço intermembranar para o citosol. O citocromo c é uma importante molécula do complexo III da cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, que transporta elétrons até o complexo da citocromo-oxidase onde eles são transferidos ao aceptor final  $O_2$  e são reduzidos na forma de  $H_2O$ . O extravasamento de citocromo c promove a formação do apoptossomo (JIANG; WANG, 2000).

OROV causa extravasamento de citocromo c do espaço intermembranar para o citosol durante infecção em células HeLa (ACRANI et al., 2010) e o presente estudo mostrou que a proteína NSs expressa isoladamente também causa esse efeito 24 horas após a transfecção. Em contrapartida, a infecção de células com o vírus OROVdelNSs não induziu extravasamento de citocromo c, que permaneceu co-localizado com mitocôndrias. Assim, ficou claro que a proteína NSs do vírus Oropouche promove a ativação da via intrínseca de apoptose, com extravasamento de citocromo c mitocondrial e ativação de caspase 9.

É sabido que as vias extrínseca e intrínseca da apoptose se conectam, mediante a ativação da proteína Bid, uma proteína pró-apoptótica da família Bcl2, composta por reguladores da apoptose pela via mitocondrial. O principal marcador intracelular da via extrínseca de apoptose é a ativação de caspase 8, que pode clivar e ativar a proteína Bid, cuja forma truncada tBid promove oligomerização de proteínas Bax e Bak, com surgimento de poros na membrana mitocondrial e consequente extravasamento de citocromo c. Normalmente o desencadeamento

da via extrínseca de apoptose se dá pela ativação de receptores de morte na superfície da membrana plasmática, com recrutamento da proteína FADD e formação de um complexo de morte que cliva e ativa caspase 8. Alguns vírus promovem ativação da via extrínseca da apoptose. Um exemplo importante deles é o vírus da febre hemorrágica da Crimeia e do Congo, da mesma ordem *Bunyavirales* à qual pertence OROV, cuja proteína NSs induz apoptose com ativação de ambas as vias intrínseca e extrínseca, e altera o potencial da membrana mitocondrial (BARNIWAL et al., 2015). Assim, resolvemos testar a presença de ativação de caspase 8 por NSs de OROV

Vimos que células HeLa infectadas com OROVwt, mas não com OROVdelNSs, e células transfectadas com vetor de expressão de NSs, apresentaram marcação positiva para caspase 8 ativada, mostrando claramente o envolvimento de elementos de ambas as vias na apoptose desencadeada pela proteína NSs de OROV.

Como a proteína NSs não é estrutural, ela não está presente nas partículas de OROV, mas poderia ser secretada de modo semelhante a outras proteínas virais, tal como NS1 de vírus da família *Flaviviridae*, (ALCON-LEPODER, 2005; MACDONALD et al., 2005). A secreção de proteínas virais para o meio extracelular poderia agir de modo parácrino, desencadeando apoptose pela via extrínseca em uma outra célula não infectada próxima. O resultado dos ensaios de meio condicionado feitos no presente estudo indicaram que o sobrenadante de uma cultura de HeLa infectada com OROV e submetido à inativação por UV antes de ser transferido para uma cultura fresca de HeLa não causou apoptose. Contrariamente, quando o meio da primeira cultura não foi inativado por UV, e portanto continha OROV viável, houve o desencadeamento de apoptose, como era de se esperar. Essa observação indica que a ativação de caspase 8 ocorre nas próprias células infectadas por OROV ou super-expressando NSs, mas não devido à sua presença no ambiente extracelular, por uma atividade parácrina.

Alguns vírus promovem alterações no potencial de membrana mitocondrial pela modulação da atividade de proteínas que regulam o ciclo celular. A proteína p53 é um importante regulador do ciclo celular em resposta a danos no DNA, ou injúrias citotóxicas (VOGELSTEIN; LANE; LEVINE, 2000), e alguns vírus modulam a apoptose por regulação de p53. Um exemplo é o vírus influenza, que controla a apoptose na fase inicial via regulação da via PI3k-Akt, e na fase final da replicação viral induz apoptose por p53 (ZHIRNOV; KLENK, 2007). Em estudo anterior do nosso grupo, mostramos que o vírus Cocksackievirus B5 induz apoptose ubiquitinação e degradação pelo proteassoma do regulador negativo de p53, a oncoproteína mdm2 (GOMES, et al., 2010), com subsequente ativação de p53. Tendo isso em

mente, avaliamos se a proteína p53 estaria envolvida na apoptose promovida pela proteína NSs de OROV, e os resultados mostraram que não ocorre alteração na distribuição de p53.

Os resultados do presente estudo mostram que NSs de OROV induz apoptose, com envolvimento de elementos das vias intrínseca e extrínseca, sugerindo a ativação de ambas as vias de apoptose.

Vírus modulam a expressão de genes envolvidos em vias metabólicas celulares para seu próprio benefício, promovendo aumento ou diminuição da sua expressão, como é o caso de paramyxovirus, que iduzem apoptose pela ativação do fator de transcrição regulador de interferon-3 (IRF-3) que, uma vez ativado, regula a transcrição de genes de interferon  $\alpha/\beta$ , quimiocina RANTES, e vários outros genes que inibem infecção viral (LIN et al., 1999). Outros vírus induzem a expressão de proteínas anti-apoptóticas, como é o caso de papilomavirus humano, cuja proteína proto-oncogênica E6 induz a expressão de proteínas IAP anti-apoptóticas como mecanismo de persistência da infecção (FUENTES-GONZÁLES, 2013). Tendo isso em mente, realizamos experimentos de PCR em tempo real para a detecção de um painel de 93 genes-alvo envolvidos em morte celular por apoptose. Os resultados mostraram regulação positiva e negativa da transcrição tanto de genes pró- quanto anti-apoptóticos, mas um gene em especial nos chamou atenção, o de TNF, pois seus transcritos foram cerca de  $2,8 \log_{10}$  (cerca de 630 vezes) mais abundantes na presença de NSs do que no *mock*.

Células dos mais variados tipos expressam receptores de TNF em sua superfície, cujo engajamento por TNF pode ativar vias de transdução de sinal com efeitos pleiotrópicos, inclusive apoptose, atividade antiviral, e ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B (HSU; XIONG; GOEDDEL, 1995). O TNF é uma das citocinas produzidas em resposta a infecções por vírus que medeiam a resposta inflamatória no local da infecção. TNF é relacionado com diversas funções de defesa do hospedeiro, por sua interação com várias células, imunes ou não (BARBER, 2001). De especial importância é o fato que apoptose pode ser induzida quando receptores de morte, como Fas, da família do receptor de TNF, são acionados na membrana plasmática por ligação direta de faz-ligante, TNF, ou ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF (TRAIL). Alguns vírus modulam a apoptose induzida por TNF, como é o caso do vírus da hepatite C, cuja proteína do cerne desempenha função supressora da apoptose induzida por TNF (RAY et al., 1998; KIN; RAY, 2014).

Curiosamente, a predição da estrutura da proteína NSs de OROV revela uma estrutura secundária definida por uma sequência de treze aminoácidos na região C terminal, com similaridade ao receptor de TNF. Além disso, a predição estrutural indica que há uma região transmembranar em NSs, entre os aminoácidos 50 e 70, que poderia resultar na presença da

proteína em membranas, inclusive membrana plasmática, que poderia ter atividade semelhante a receptores do tipo do receptor de TNF. Isso poderia explicar a ocorrência de ativação da via extrínseca de apoptose, desencadeada por TNF, que poderia inclusive recrutar subsequentemente a via intrínseca por meio da proteína Bid, da família de proteínas reguladoras Bcl2 (CAMPBELL et al., 2008).

BCL2A1 é uma proteína da família Bcl2 que possui atividade anti-apoptótica pelo sequestro de proteínas pró-apoptóticas da família Bcl2 (VOGLER, 2012). O aumento da quantidade de transcritos do gene BCL2A1 na infecção de HeLa por OROV poderia ser explicado pelo fato de células HeLa serem tumorais, e esse gene é regulador anti-apoptótico, expresso numa ampla variedade de células de origem tumoral (VOGLER, 2012). OROV poderia levar à superexpressão de BCL2A1 para inicialmente impedir a indução precoce de apoptose. Na presença de TNF aumentado, BCL2A1 poderia equilibrar sua ação pró-apoptótica.

A caspase 12 humana é desprovida de atividade enzimática por falta de resíduos catalíticos. Há uma forma truncada de caspase 12 que se assemelha às CARD17 CARD-somente proteínas (também conhecido como INCA), CARD18 (também conhecido como ICEBERG) e CARD16 (também conhecido como COP ou pseudo-ICE) (MARTINON; TSCHOPP, 2007). Essas proteínas possuem o domínio CARD, de recrutamento de caspases, o que poderia explicar seu envolvimento na apoptose promovida pela presença da proteína NSs de OROV, como sugerido pelos resultados do PCR *array*.

O presente estudo mostrou que OROV induz apoptose de diversas linhagens celulares, e que este efeito é mediado pela proteína NSs. A apoptose induzida por OROV ocorre com participação de elementos das vias intrínseca, mitocondrial, porém também com ativação de caspase 8. Ainda não temos elementos para propor um mecanismo de ação de NSs, mas os dados obtidos no ensaio de PCR *array* permitiram selecionar alguns alvos promissores, que estão em vias de validação por experimentos de silenciamento.

## 6. CONCLUSÕES

O presente estudo demonstrou que a proteína não-estrutural NSs de OROV é fator essencial para o desencadeamento apoptose *in vitro*.

Confirmando achados anteriores do laboratório, a proteína NSs de OROV induz apoptose pela via intrínseca, com extravasamento de citocromo c de mitocôndrias e ativação de caspases 9 e 3. Porém, há também a presença de caspase 8 ativada, um forte indício de envolvimento da via extrínseca de apoptose.

O mecanismo da apoptose induzida por NSs de OROV ainda é desconhecido, mas dados preliminares sugerem a participação de NSs na mediação autócrina da ativação de receptor de morte.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACRANI, G. O. Apoptose em infecção pelo vírus Oropouche. Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos, Universidade de São Paulo, 2009. p 96-97.

ACRANI GO, GOMES R, PROENÇA-MÓDENA JL, DA SILVA AF, CARMINATI PO, SILVA ML, SANTOS RI, ARRUDA E. Apoptosis induced by Oropouche vírus infection in HeLa cells is dependente on vírus protein expression. *Virus Res.* 2010, 149:56-63.

ALBERTS, B; JOHNSON, A; LEWIS, J; MORGAN, D; RAFF, M; ROBERTS, K; WALTER, P. *Molecular biology of the cell* (6<sup>th</sup> Ed). Garland Science. New York and Abingdon, UK, 2014.

ALCON-LEPODER, S; DROUET, MT; ROUX, P; FRENKIEL, MP, ARBORIO, M; DURAND-SCHNEIDER, AM; MAURICE, M; LE BLANC, I; GRUENBERG, J; FLAMAND, M. The Secreted Form of Dengue Virus Nonstructural Protein NS1 Is Endocytosed by Hepatocytes and Accumulates in Late Endosomes: Implications for Viral Infectivity. *Journal of Virology*, Sept 2005, 79(17):11403–11411.

ANDERSON CR, SPENCE L, DOWNS WG, AITKEN TH. Oropouche virus: a new human disease agent from Trinidad, West Indies. *Am J Trop Med Hyg*, 1961, 10:574-578.

ANDREE, HAM; REUTELINGSPERGERG, CPM; HAUPTMANNLJ, R; HEMKER, HC; HERMENS, WT; WILLEMS, GM. Binding of Vascular Anticoagulant  $\alpha$  (VAC $\alpha$ ) to Planar Phospholipid Bilayers. *The Journal Of Biological Chemistry*, 1990, 265(9):4923-4928.

AZEVEDO, RS; NUNES, MR; CHIANG, JO; BENSABATH, G; VASCONCELOS, HB; PINTO, AY; MARTINS, LC; MONTEIRO, HA; RODRIGUES, SG e VASCONCELOS, PF. Reemergence of Oropouche fever, northern Brazil. *Emerg Infect Dis*, 2007, 13(6):912-915.

BARBER, GN. Host defense, viruses and apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 2001, 8: 113-126.

BARNWAL, B; KARLBERG, H; MIRAZIMI, A; TAN, Yee-Joo. The Non-structural Protein of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus Disrupts the Mitochondrial Membrane Potential and Induces Apoptosis. *J Biol Chem*, 2016, 291(2):582-592.

BASTOS MS, FIGUEIREDO LTM, NAVECA FG, MONTE RL, LESSA N, FIGUEIREDO RMP, GIMAQUE JBL, JOÃO GP, RAMASAWMY R, MOURÃO MPG. Short Report: Identification of Oropouche orthobunyavirus in the cerebrospinal fluid of three patients in the Amazonas, Brazil. *Am J Trop Med Hyg*, 2012, 86:732-735.

BLAKQORI, G; WEBER, F. Efficient cDNA-Based Rescue of La Crosse Bunyaviruses Expressing or Lacking the Nonstructural Protein NSs. *Journal of Virology*, 2005, 79(16):10420–10428.

BOATRRIGHT, KM; RENATUS M; SCOTT FL; SPERANDIO S; SHIN H; PEDERSEN IM; RICCI, Jean-Ehrland; EDRIS WA; SUTHERLIN DP; GREEN DR; SALVESEN GS. A Unified Model for Apical Caspase Activation. *Molecular Cell*, 2003, 11:529–541.



BRILL, A.; TORCHINSKY, A.; CARP, H.; TODER, V. The Role of Apoptosis in Normal and Abnormal Embryonic Development. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 1999, 16(10):512-519.

BRIDGEN, A; WEBER, F; FAZAKERLEY, JK; ELLIOTT, RM. Bunyamwera bunyavirus nonstructural protein NSs is a nonessential gene product that contributes to viral pathogenesis. *PNAS*, 2001, 98(2):664–669.

CAMPBELL, MT; DAGHER, P; HILE, KL; ZHANG, H; MELDRUM, DR; RINK, RC; MELDRUM, KK. Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Induces Intrinsic Apoptotic Signaling During Renal Obstruction Through Truncated Bid Activation. *J Urol*, 2008, 180(6):2694–2700.

COLON-RAMOS, DA; IRUSTA, PM; GAN, EC; OLSON, MR; SONG, J; MORIMOTO, RI; ELLIOTT, RM; LOMBARD, M; HOLLINGSWORTH, R; HARDWICK, JM; SMITH, GK; KORNBLUTH, S. Inhibition of Translation and Induction of Apoptosis by Bunyaviral Nonstructural Proteins Bearing Sequence Similarity to Reaper. *Molecular Biology of the Cell*, 2003, 14:4162–4172.

DENIAUD, A; BRENNER, C; KROEMER, G. Mitochondrial membrane permeabilization by HIV-1 Vpr. *Mitochondrion*, 2004, 4:223–233.

DOWNS, WG. The rockefeller foundation virus program: 1951-1971 with update to 1981. *Ann. Rev. Med.* 1982. 33:1-29.

EL-BACHA, T; DA POIAN, AT. Virus-induced changes in mitochondrial bioenergetics as potential targets for therapy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2013, 45:41–46.

EL-DEIRY, WS; KERN, SE; PIETENPOL, JA; KINZLER, KW; VOLGESTEIN, B. Definition of a consensus binding site for p53. *Nature Genetics*, 1992, 1:45-49.

ELLIOTT, RM. Molecular biology of the Bunyaviridae. *Journal of General Virology*, 1990, 71:501-522.

ELLIOTT, R. M. Orthobunyaviruses: recent genetic and structural insights *Nature Reviews-Microbiology*. 2014, 12:673-685.

ELLIOTT, RM; SCHMALJOHN, CS. Bunyaviridae. *Fields Virology*, Sixth Edition. LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, Philadelphia, 2013, 1(42):1244-1282.

ENGELAND, MV; NIELAND, LJW; RAMAEKERS, FCS; SCHUTTE, B; REUTELINGSPERGER, CPM. Annexin V-Affinity Assay: A Review on an Apoptosis Detection System Based on Phosphatidylserine Exposure. *Cytometry*, 1998, 31:1–9.

EVERETT, H; MCFADDEN, G. Apoptosis: an innate immune response to virus infection. *Trends Microbiol.* 1999 7(4):160-5.

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

FISCHER, U; JANICKE, RU; SCHULZE-OSTHOFF, K. Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ*, 2003, 10:76–100.

FUENTES-GONZÁLEZ, AM; CONTRERAS-PAREDES, A; MANZO-MERINO, J; LIZANO, M. The modulation of apoptosis by oncogenic viruses. *Virology Journal*, 2013, 10:182.

GALLUZZI, L; BRENNER, C; MORSELLI, E; TOUAT, Z; KROEMER, G. Viral Control of Mitochondrial Apoptosis. *PLoS Pathogens*, May 2008, 4(5):1-16.

GOMES, R; GUERRA-SÁ, R; ARRUDA, E. Coxsackievirus B5 induced apoptosis of HeLa cells: Effects on p53 and SUMO. *Virology*, 2010, 396:256–263

GUU, TSY; ZHENG, W; TAO, YJ. Bunyavirus: Structure and replication. *Adv Exp Med Biol*, 2012, 726:245-266.

HAY, S; KANNOURAKIS, G. A time to kill: viral manipulation of the cell death program. *J Gen Virol*. 2002 Jul; 83(7):1547-1564.

HSU, H; XIONG, J; GOEDDEL, DV. The TNF Receptor I-Associated Protein TRADD Signals Cell Death and NF-KB Activation. *Cell*, May 19, 1995, 91:495-504.

ICHIM, G; TAIT, SWG. A fate worse than death: apoptosis as an oncogenic process. *Nature Reviews Cancer*, 2016, 16: 539–548.

JIANG, X; WANG, X. Cytochrome c Promotes Caspase-9 Activation by Inducing Nucleotide Binding to Apaf-1. *The Journal of Biological Chemistry*, October 6, 2000, 275(40):31199–31203.

KIM, S; KIM, HY; LEE, S; KIM, SW; SOHN, S; KIM, K; CHO, H. Hepatitis B Virus X Protein Induces Perinuclear Mitochondrial Clustering in Microtubule and Dynein-Dependent Manners. *Journal of Virology*, 2007, 81(4):1714–1726.

KIM, H; RAY, R. Evasion of TNF- $\alpha$ -Mediated Apoptosis by Hepatitis C Virus. *Methods in Molecular Biology*, 2014, 1155:125-132.

KOHL, A; CLAYTON, RF; WEBER, F; BRIDGEN, A; RANDALL, RE; ELLIOTT, RM. Bunyamwera Virus Nonstructural Protein NSs Counteracts Interferon Regulatory Factor 3-Mediated Induction of Early Cell Death. *Journal of Virology*, 2003, 77(14):7999–8008.

KOYAMA, AH; ARAKAWA, T; ADACHI, A. Acceleration of virus-induced apoptosis by tumor necrosis factor. *FEBS Letters*, 1998, 426:179-182.

LEDUC, JW; HOCH, AL; PINHEIRO, FP, TRAVASSOS DA ROSA, APA. Epidemic Oropouche virus disease in northern Brazil. *Bull Pan Am Health Organ*, 1981, 15(2).

LEDUC, JW; PINHEIRO, FP. Oropouche fever. In: Monath, TP (Ed). *The arboviruses: Epidemiology and Ecology*. Vol 4:1-14, CRC Press, Boca Raton, 1989.

LIN, R; HEYLBROECK, C; GENIN, P; PITHA, PM; HISCOTT, J. Essential Role of Interferon Regulatory Factor 3 in Direct Activation of RANTES Chemokine Transcription. *MOLECULAR AND CELLULAR BIOLOGY*, 19:2, p. 959–966, 1999.

LUNA, LKS; RODRIGUES, AH; SANTOS, RI; SESTI-COSTA, R; CRIADO, MF; MARTINS, RB; SILVA, ML; DELCARO, LS; PROENÇA-MODENA, JL; FIGUEIREDO, LT; ACRANI, GO; ARRUDA, E. Oropouche virus is detected in peripheral blood leukocytes from patients. *Journal of Medical Virology*, 2017 Jun; 89(6):1108-1111.

MACDONALD, J; TONRY, J; HALL, RA; WILLIAMS, B; PALACIOS, G; ASHOK, MS; JABADO, O; CLARK, D; TESH, RD; BRIESE, T; LIPKIN, WI. NS1 Protein Secretion during the Acute Phase of West Nile Virus Infection. *JOURNAL OF VIROLOGY*, Nov. 2005, 79(22):13924–13933.

MARTINON, F; TSCHOPP, J. Inflammatory caspases and inflammasomes: master switches of inflammation. *Cell Death and Differentiation*, 2007, 14:10–22.

MOURÃO, MP; BASTOS, MS; GIMAQUE, JB; MOTA, BR; SOUZA, GS; GRIMMER, GH; GALUSSO, ES; ARRUDA, E; FIGUEIREDO, LT. Oropouche fever outbreak, Manaus, Brazil, 2007-2008. *Emerg Infect Dis*. 2009 Dec; 15(12):2063-2064.

NICHOL, S. T. 2001. Bunyaviruses, p. 1603–1633. In B. N. Fields, D. M. Knipe, P. M. Howley, and D. E. Griffin (ed.), *Fields virology*, 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.

NUNES, MRT; MARTINS, LC; RODRIGUES, SG; CHIANG, JO; AZEVEDO, RSS; TRAVASSOS DA ROSA, APA; Vasconcelos, PFC. Oropouche virus isolation, southeast Brazil. *Emerg Infect Dis*, 2005, 11(10):1610-1613.

O'BRIEN, V. Viruses and apoptosis. *Journal of General Virology* (1998), 79, 1833–1845.

PEKOSZ, A; PHILLIPS, J; PLEASURE, D; MERRY, D; 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 Of Virology*, 1996, 70(8):5329-5335.

PINHEIRO, FP; PINHEIRO, M; BENSABATH, G; CAUSEY, OR; SHOPE, RE. Epidemia de vírus Oropouche em Belém. *Revista do Serviço Especial de Saúde Pública*, 1962, 12:15–23.

PINHEIRO, FP; TRAVASSOS DA ROSA, AP; TRAVASSOS DA ROSA, JF; ISHAK, R; FREITAS, RB; GOMES, ML; LEDUC, JW; OLIVA, OFP. Oropouche Virus. I. A Review of Clinical, Epidemiological, and Ecological Findings. *Am J Trop Med Hyg*, 1981, 30:149-60.

PINHEIRO, FP; HOCH, AL; GOMES, ML; ROBERTS, DR. Oropouche vírus. IV. Laboratory transmission by *Culicoides paraenses*. *The Am J of Trop Med and Hyg*, 1981, 30(1)172-176.

PINHEIRO, FP; ROCHA, AG; FREITAS, RB; OHANA, BA; TRAVASSOS DA ROSA, AP; ROGERIO, JS; LINHARES, AC. Meningitis associated with Oropouche virus infection. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 1982, 24:246-251.

PINHEIRO, FP; TRAVASSOS DA ROSA, APA; VASCONCELOS, PFC. Oropouche fever. In: Feigin RD, ed Textbook of Pediatric Infectious Diseases, 5th edn. Philadelphia: Saunders; 2004, 2418-2423.

RAY, RB; MEYER, K; STEELE, R; SHRIVASTAVA, A; AGGARWAL, BB; RAY, R. Inhibition of Tumor Necrosis Factor (TNF- $\alpha$ )-mediated Apoptosis by Hepatitis C Virus Core Protein. The J of Biol Chemistry, 1998 Jan, 273(4):2256–2259.

RODRIGUES, AH; SANTOS, RI; ARISI, GM; BERNARDES, ES; SILVA, ML; ROSSI, MA; LOPES, MB; ARRUDA, E. Oropouche virus experimental infection in the Golden Hamster (*Mesocricetus auratus*). Virus Research, 2011, 155:35-41.

ROJO, G; CHAMORRO, M; SALAS, ML; VINUELA, E; CUEZVA, JM; SALAS, J. Migration of Mitochondria to Viral Assembly Sites in African Swine Fever Virus-Infected Cells. Journal of Virology, 1998, 72(9):7583–7588.

SAITO, K; MEYER, K; WARNER, R; BASU, A; RAY, RB; RAY, R. Hepatitis C Virus Core Protein Inhibits Tumor Necrosis Factor Alpha-Mediated Apoptosis by a Protective Effect Involving Cellular FLICE Inhibitory Protein. Journal of Virology, 2006, 80(9):4372–4379.

SANTOS, RI; RODRIGUES, AH; SILVA, ML; MORTARA, RA; ROSSI, MA; JAMUR, MC; OLIVER, CE; ARRUDA, E. Oropouche virus entry into HeLa cells involves clathrin and requires endosomal acidification. Virus Res, 2008, 138(1-2):139-143.

SANTOS, RI; ALMEIDA, MF; PAULA, FE; RODRIGUES, AH; SARANZO, AM; PAULA, AE; SILVA, ML; CORREA, VM; ACRANI, GO; NEDER, L; ARRUDA, E. Experimental infection of suckling mice by subcutaneous inoculation with Oropouche virus. Virus Research, 2012, 170:25-33.

SANTOS, RI; BUENO-JÚNIOR, LS; RUGGIERO, RN; ALMEIDA, MF; SILVA, ML; PAULA, FE; CORREA, VM; ARRUDA, E. Spread of Oropouche virus into the central nervous system in mouse. Viruses, 2014 Oct, 6(10):3827-3836.

SCHMALJOHN, CS; NICHOL, ST. Bunyaviridae. In: Knipe DM et al (Eds), Fields Virology (5<sup>th</sup> Ed), Lipincott-Williams and Wilkins, Philadelphia, 2006. Vol 2. pp. 1741-1789.

SHI, Y. Caspase activation, inhibition, and reactivation: A mechanistic view. Protein Science 2004, 13:1979–1987.

SINGH, PK; DOLEY, J; KUMAR, GR; SAHOO, AP; TIWARI, AK. Oncolytic viruses & their specific targeting to tumour cells. Indian J Med Res, October 2012, 136:571-584.

ROCKEFELLER FOUNDATION. The Rockefeller Foundation Annual Report For 1962, 49-56.

The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis Kelley LA et al. Nature Protocols, 2015, 10:845-858. Disponível em: <<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/help.cgi?id=help/faq>>.

THORNBERRY, NA; LAZEBNIK, Y. Caspase: enemies within. *Science*, 1998, 281(5381):1312-6.

TILSTON-LUNEL, NL; ACRANI, GO; RANDALL, RE; ELLIOTT, RM. Generation of recombinant Oropouche viruses lacking the Nonstructural protein NSm or NSs. *Journal of Virology*. 2016, 90:2616-2627.

TSUJIMOTO Y. Bcl-2 family of proteins: life-or-death switch in mitochondria. *Biosci Rep*. 2002 Feb, 22(1):47-58.

VASCONCELOS, PFC; TRAVASSOS DA ROSA, JFS; GUERIREIRO, SC; DEGALLIER, N; TRAVASSOS DA ROSA, ES; TRAVASSOS DA ROSA, PA. Primeiro registro de epidemias causadas pelo vírus Oropouche nos estados do Maranhão e Goiás, Brasil. *Ver. Inst. Med. Trop. São Paulo* 31(4): 271-278, 1989.

VASCONCELOS, HB; NUNES, MRT; CASSEB, LMN; CARVALHO, VL; SILVA, EVP; SILVA, M; CASSEB, SMM; VASCONCELOS, PFC. Molecular Epidemiology of Oropouche Virus, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 2011 May, 17(5):800-806.

VOGELSTEIN, B; LANE, D; LEVINE, AJ. Surfing the p53 network. *NATURE*, v. 408, p. 307-310, 2000.

VOGLER, M. BCL2A1: the underdog in the BCL2 family. *Cell Death and Differentiation*, 19: 67-74, 2012.

ZHIRNOV, OP; KLENK, HD. Control of apoptosis in influenza virus-infected cells by up-regulation of Akt and p53 signaling. *Apoptosis* (2007) 12:1419–1432.

WALTER CT, BARR JN. Recent advances in the molecular and cellular biology of bunyaviruses. *J General Virol*. 2011, 92:2467-2484.

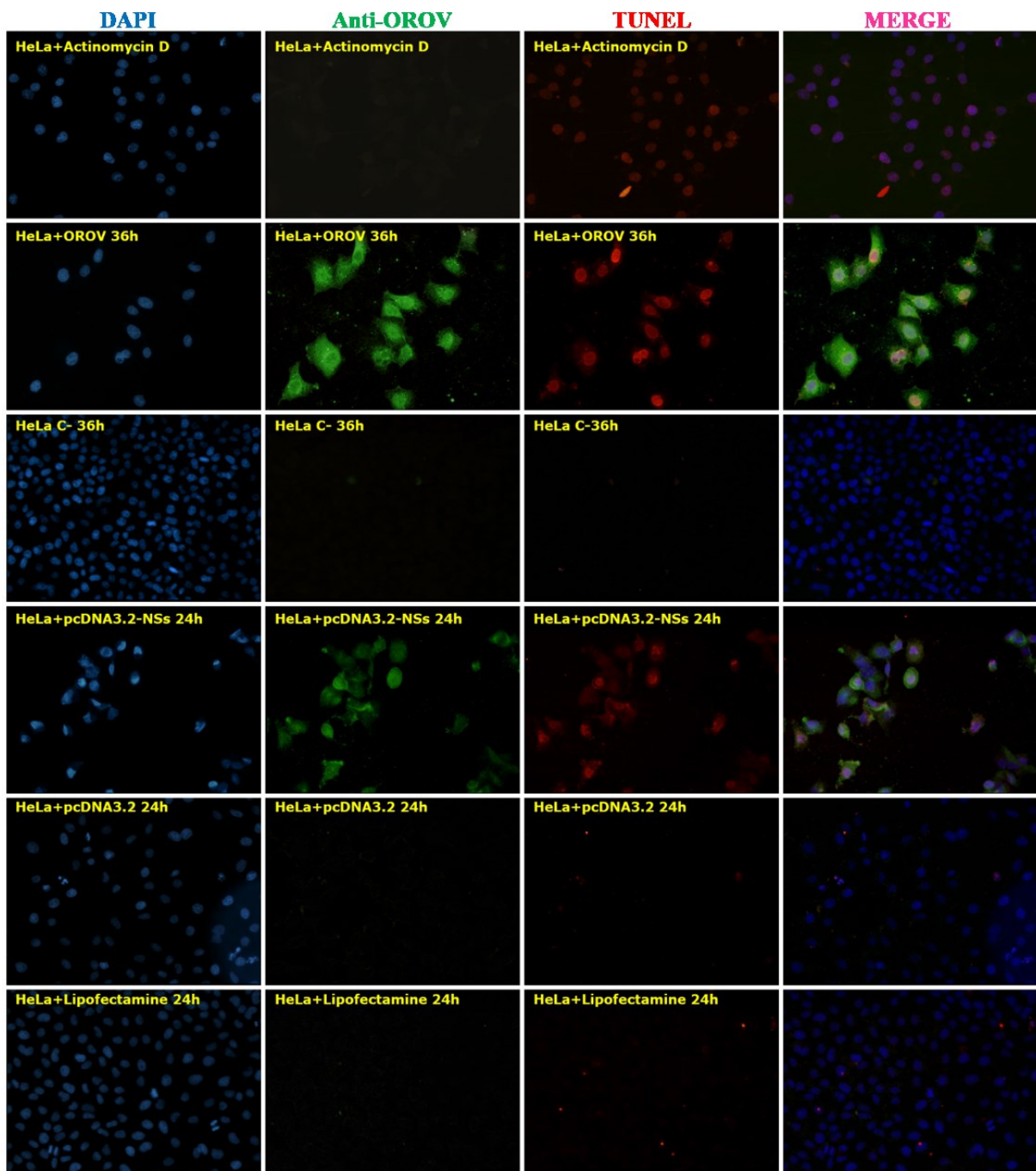
WEBER, F; DUNN, EF; BRIDGEN, A; ELLIOTT, RM. The Bunyamwera Virus Nonstructural Protein NSs Inhibits Viral RNA Synthesis in a Minireplicon System. *Virology* 281, 67-74, 2001.

WEBER, F; BRIDGEN, A; FAZAKERLEY, JK; STREITENFELD, H; KESSLER, N; RANDALL, RE; ELLIOTT, RM. Bunyamwera Bunyavirus Nonstructural Protein nss Counteracts the Induction of Alpha/Beta Interferon. *JOURNAL OF VIROLOGY*, 76:16, p. 7949–7955, 2002.

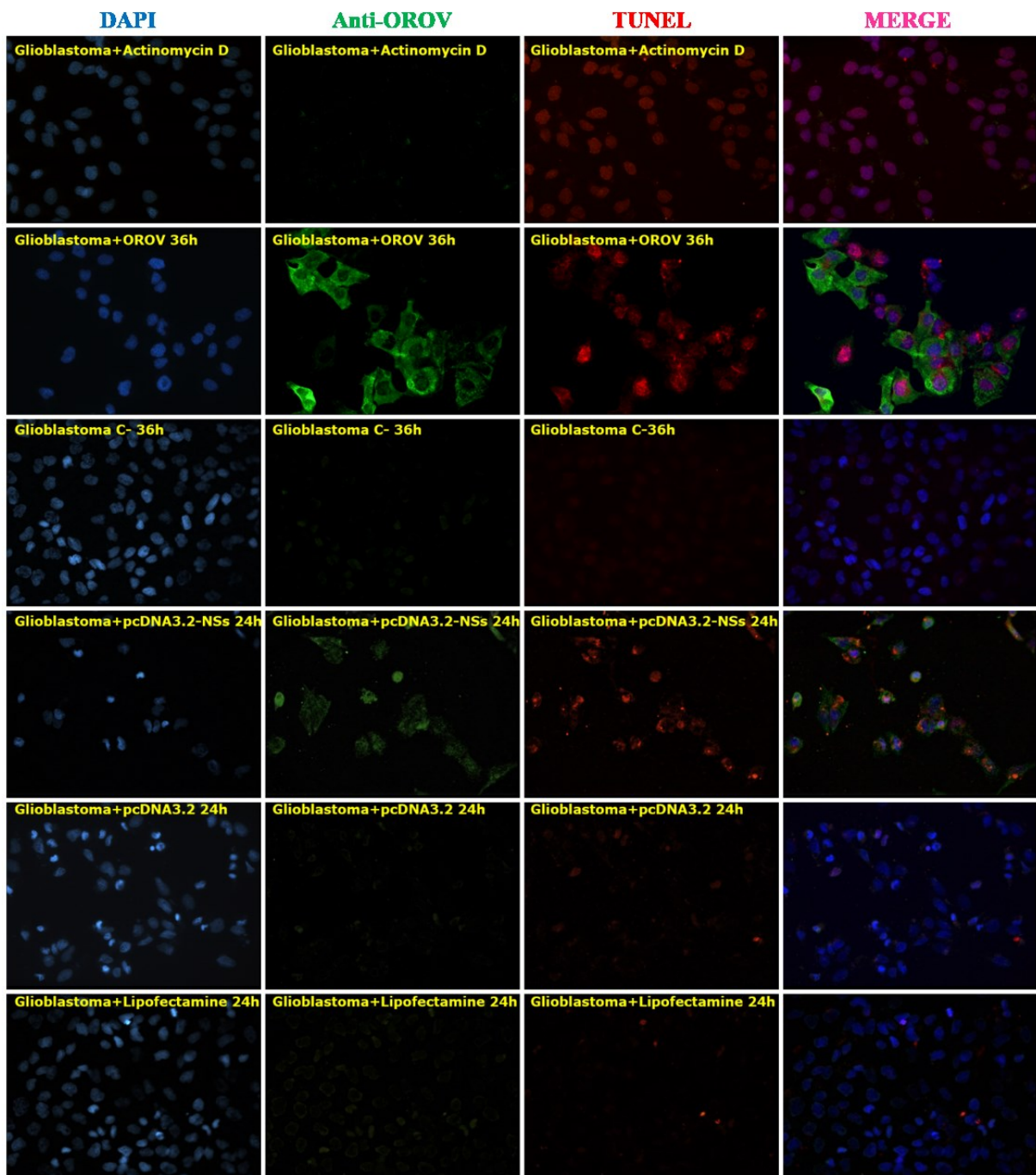
WU, M; DING, Han-Fei; David; Fisher. Apoptosis: Molecular Mechanisms. *Encyclopedia of Life Sciences*, 2001, 1-8.

## 8. APÊNDICES

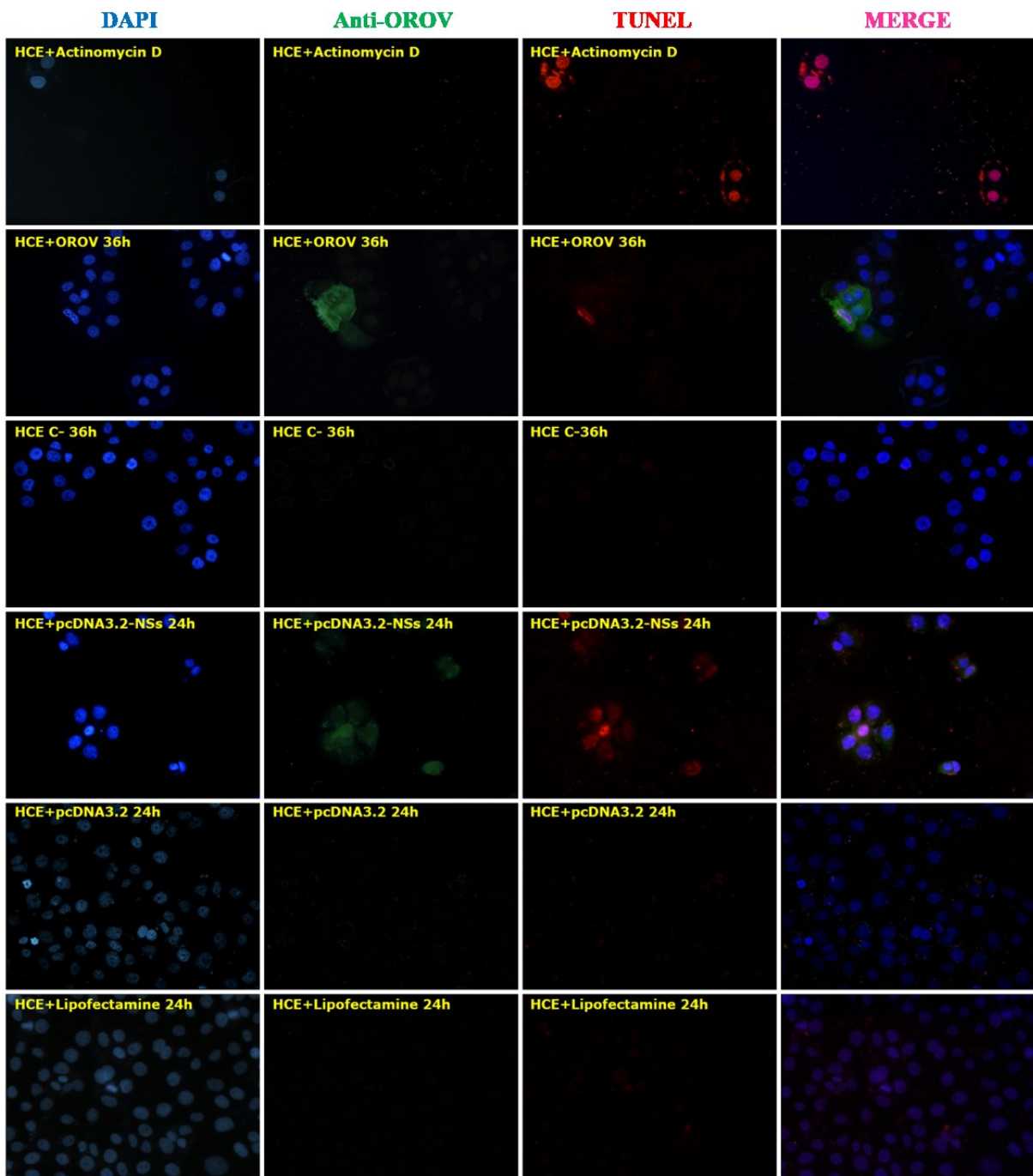
### APÊNDICE A - PAINEL COMPLETO DO ENSAIO DE TUNEL EM CÉLULAS HeLa



## APÊNDICE B - Painel completo do ensaio de TUNEL em células Glioblastoma U-251

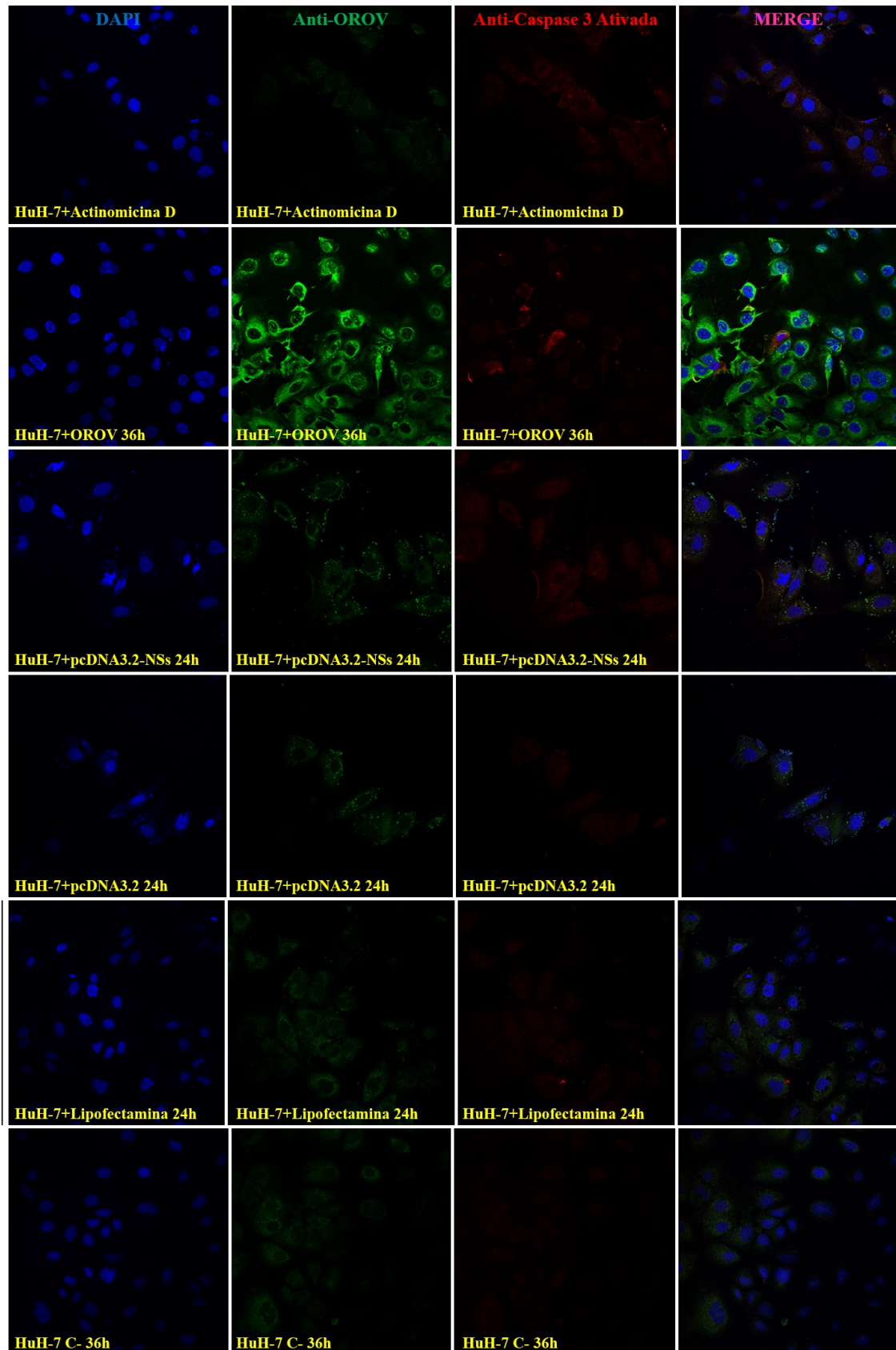


## APÊNDICE C - Painel completo do ensaio de TUNEL em células HCE

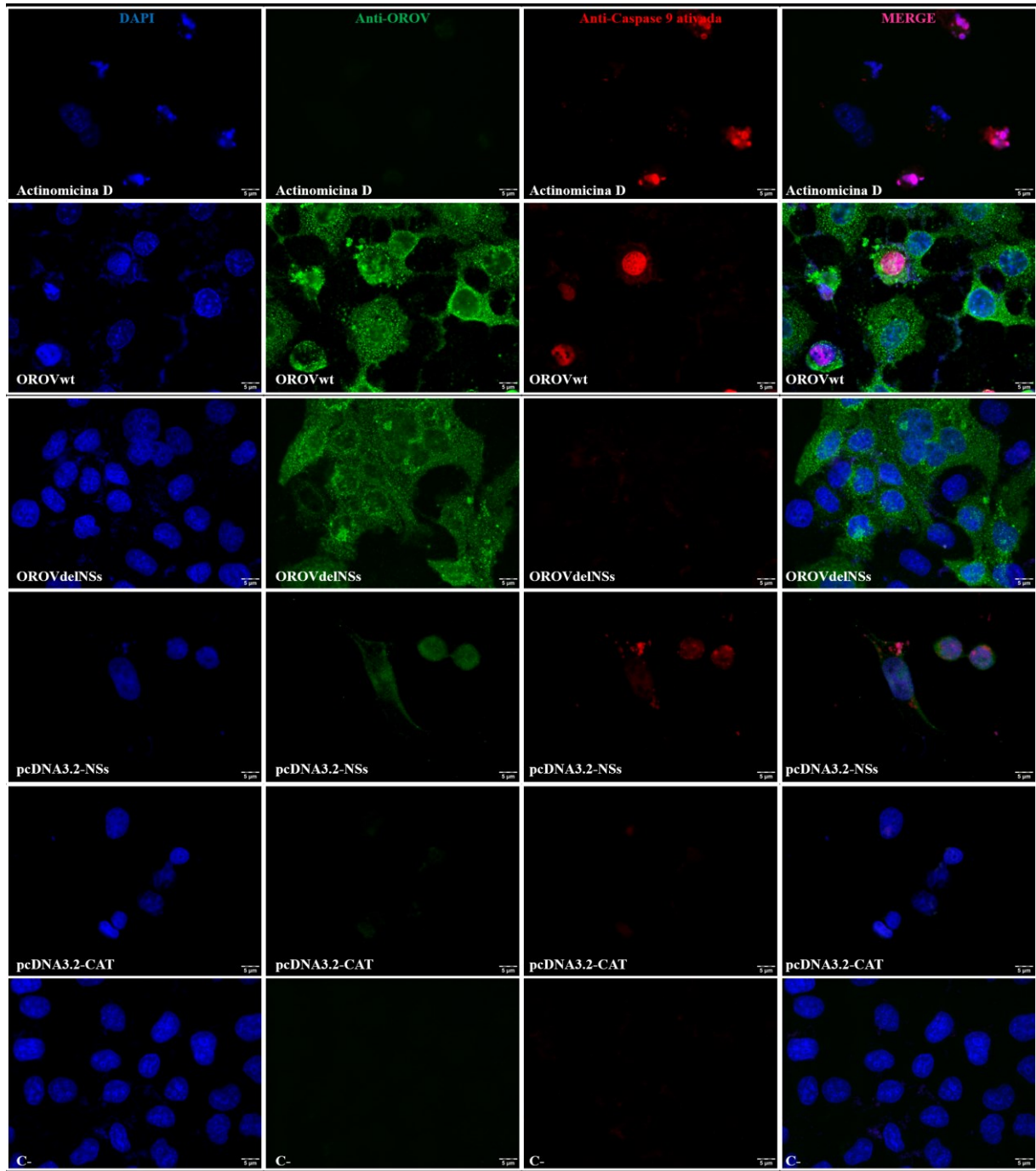




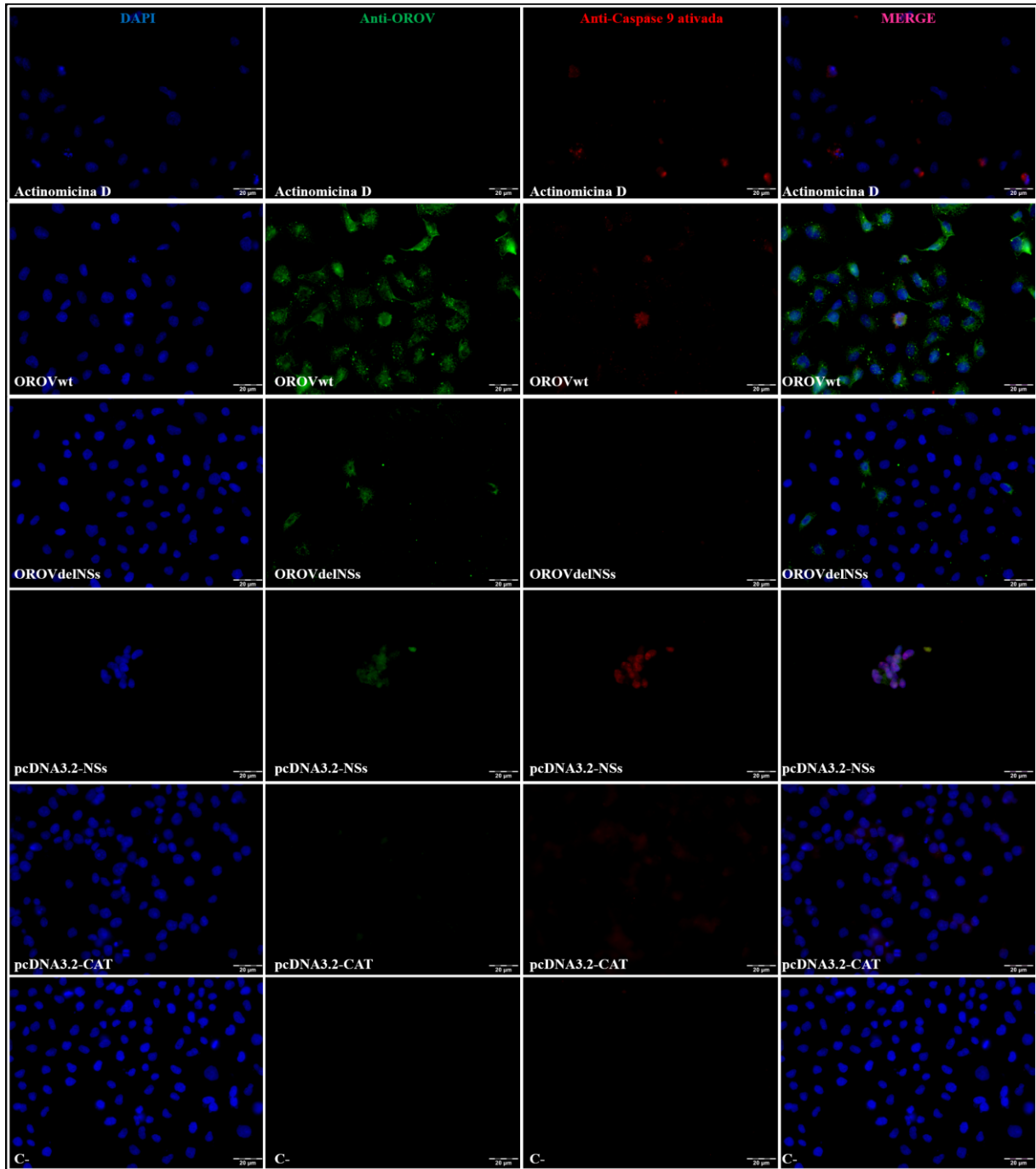
APÊNDICE D - Painel completo do ensaio de detecção de Caspase 3 ativada em células HuH7



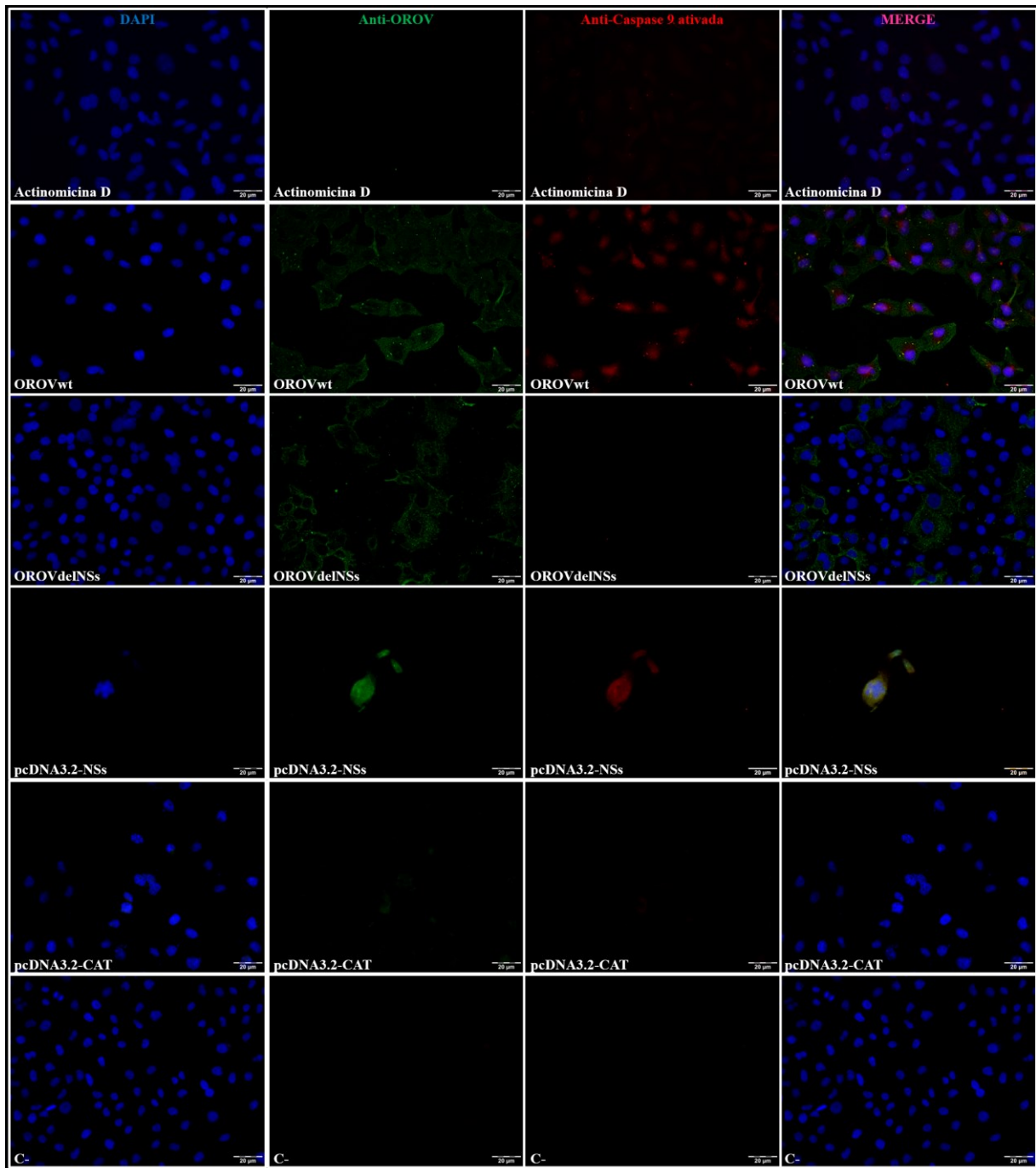
APÊNDICE E - Painel completo do ensaio de TUNEL em células HeLa com controle OROVdelNSs



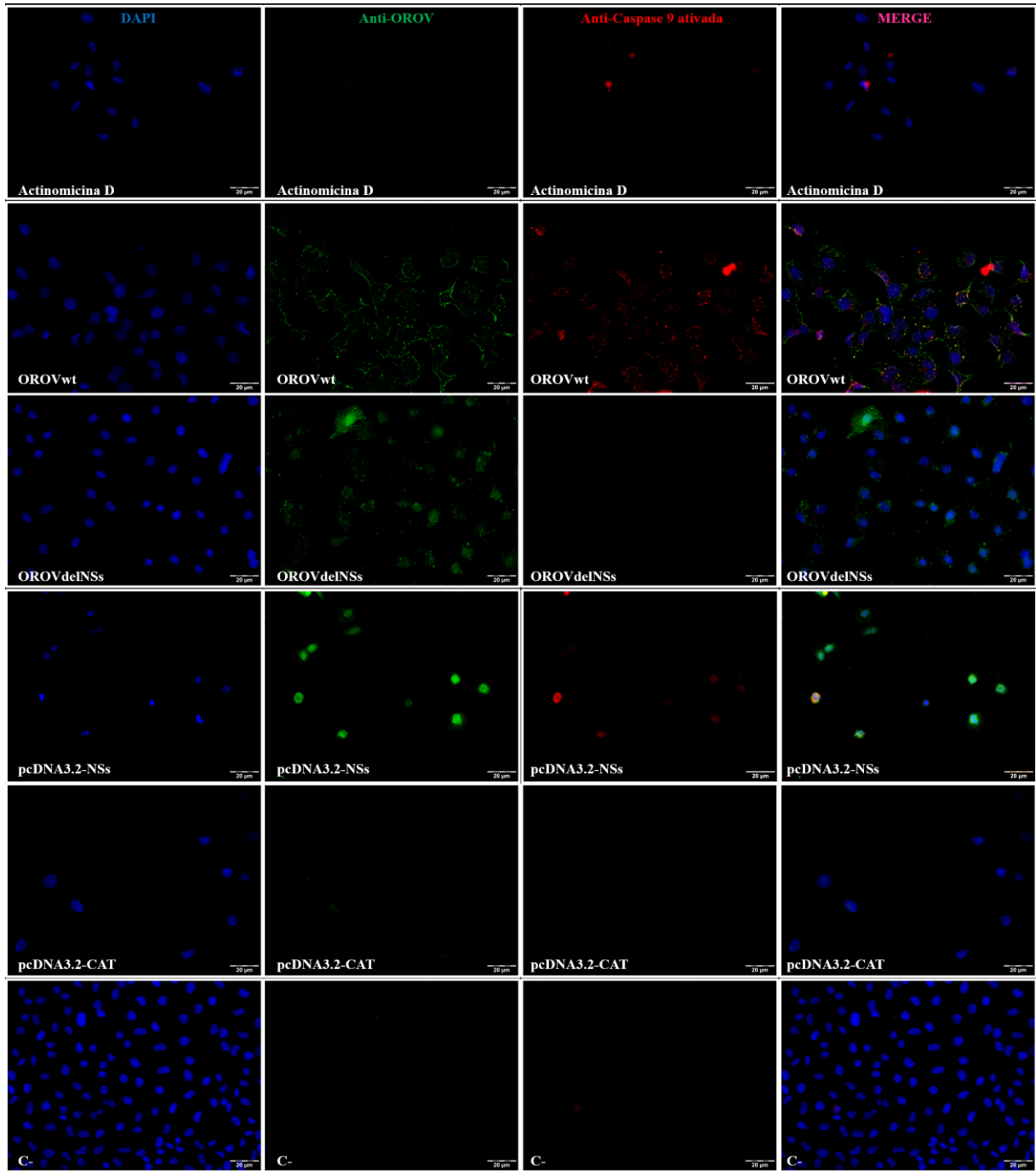
APÊNDICE F – Painel completo do ensaio para detecção de Caspase 3 ativada em células HeLa com controle OROVdelNSs



APÊNDICE G - Painel completo do ensaio para detecção de Caspase 9 ativada em células HeLa com controle OROVdelINSs



APÊNDICE H – Painel completo do ensaio para detecção de Caspase 8 ativada em células Hela com controle OROVdelNSs



APÊNDICE I - HeatMap do ensaio de PCR Array com todos os 93 genes analisados

