

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

CARLA DO AMARAL PINTO

**CARACTERIZAÇÃO DOS
ORTHOBUNYAVIRUS DO GRUPO C:
INDUÇÃO DE GENES ESTIMULADOS
POR INTERFERONS PELO VÍRUS
CARAPARU *IN VITRO* E
SEQUENCIAMENTO PARCIAL DO VÍRUS
APEU**

**Orientador: Prof. Paulo César Peregrino Ferreira
Co-orientadora: Profa. Erna Geessien Kroon**

**Belo Horizonte
Fevereiro – 2011**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA**

CARLA DO AMARAL PINTO

**CARACTERIZAÇÃO DOS
ORTHOBUNYAVIRUS DO GRUPO C:
INDUÇÃO DE GENES ESTIMULADOS
POR INTERFERONS PELO VÍRUS
CARAPARU *IN VITRO* E
SEQUENCIAMENTO PARCIAL DO VÍRUS
APEU**

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de pósgraduação em Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Microbiologia, área de concentração: Virologia.

**Orientador: Prof. Paulo César Peregrino Ferreira
Co-orientadora: Profa. Erna Geessien Kroon**

**Belo Horizonte
Fevereiro-2011**

SUMÁRIO

| | |
|--|--------------------------------------|
| RESUMO..... | 5 |
| ABSTRACT | 5 |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | Erro! Indicador não definido. |
| LISTA DE FIGURAS E TABELAS | Erro! Indicador não definido. |
| I – INTRODUÇÃO | Erro! Indicador não definido. |
| 1.1 – Arbovírus | Erro! Indicador não definido. |
| 1.1.1 – Histórico e definições | Erro! Indicador não definido. |
| 1.1.2 – Arboviroses | Erro! Indicador não definido. |
| 1.1.3 – Ecologia | Erro! Indicador não definido. |
| 1.1.4 - Epidemiologia e emergência dos arbovírus | Erro! Indicador não definido. |
| 1.2 - A família Bunyaviridae | Erro! Indicador não definido. |
| 1.2.1 - Estrutura e genoma dos vírus | Erro! Indicador não definido. |
| 1.2.2 - Multiplicação Viral | Erro! Indicador não definido. |
| 1.3 - Gênero Orthobunyavirus | Erro! Indicador não definido. |
| 1.3.1 - <i>Orthobunyavirus</i> do grupo C | Erro! Indicador não definido. |
| 1.3.2 – Caraparu e Apeu | Erro! Indicador não definido. |
| 1.4 – Interferons..... | Erro! Indicador não definido. |
| 1.4.1 - IFNs dos tipos I, II e III | Erro! Indicador não definido. |
| 1.4.2 - Vias de Sinalização..... | Erro! Indicador não definido. |
| 1.4.3 - Os IFNs e os bunyavirus..... | Erro! Indicador não definido. |
| II - RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA..... | Erro! Indicador não definido. |
| III - OBJETIVOS | Erro! Indicador não definido. |
| 3.1 - Objetivo geral: | Erro! Indicador não definido. |
| 3.2 - Objetivos específicos:..... | Erro! Indicador não definido. |
| 3.2.1 - Avaliação da resposta de IFNs tipo I e tipo III frente ao CARV:..... | Erro! Indicador não definido. |
| 3.2.1.1 - Atividade antiviral dos IFNs contra o CARV : | Erro! Indicador não definido. |
| 3.2.1.2 – Indução da expressão de IFNs e ISGs pelo CARV | Erro! Indicador não definido. |
| 3.2.2- Caracterização molecular do APEUV: | Erro! Indicador não definido. |
| IV - MATERIAIS E MÉTODOS | Erro! Indicador não definido. |
| 4.1 – Células..... | Erro! Indicador não definido. |
| 4.1.1 – Células Vero..... | Erro! Indicador não definido. |
| 4.1.2 – Células A549..... | Erro! Indicador não definido. |
| 4.1.3 – Células 293T | Erro! Indicador não definido. |
| 4.1.4 - Meios de cultivo | Erro! Indicador não definido. |
| 4.2 - Amostras virais | Erro! Indicador não definido. |
| 4.2.1 - Origem | Erro! Indicador não definido. |
| 4.2.2 - Produção dos estoques virais | Erro! Indicador não definido. |
| 4.3 - Titulação dos estoques virais | Erro! Indicador não definido. |
| 4.3.1 - Titulação do vírus pelo método de Dulbecco | Erro! Indicador não definido. |

| | |
|---|--------------------------------------|
| 4.3.2 – Titulação do vírus pelo método de TCID50 | Erro! Indicador não definido. |
| 4.4 - Interferons | Erro! Indicador não definido. |
| 4.4.1- Produção dos IFN- λ 1 e IFN- λ 2 humano recombinante ... | Erro! Indicador não definido. |
| 4.4.2 – Titulação dos IFN- λ 1 e IFN- λ 2 humanos recombinantes | Erro! Indicador não definido. |
| 4.5 - Avaliação da atividade antiviral dos IFN frente ao CARV em células Vero | Erro! Indicador não definido. |
| 4.6 – Avaliação da expressão dos genes estimulados por IFN (ISG) e dos IFNs em células A549 após infecção pelo CARV..... | Erro! Indicador não definido. |
| 4.6.1 – Extração de RNA total celular | Erro! Indicador não definido. |
| 4.6.2 – Reação de transcrição reversa..... | Erro! Indicador não definido. |
| 4.6.3 – Reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real | Erro! Indicador não definido. |
| 4.7- Sequenciamento do segmento S do APEUV. | Erro! Indicador não definido. |
| 4.7.1 - Extração do RNA viral do vírus Apeu..... | Erro! Indicador não definido. |
| 4.7.2 - Amplificação do segmento genômico..... | Erro! Indicador não definido. |
| 4.7.3 - Condições das amplificações..... | Erro! Indicador não definido. |
| 4.7.4 - Ligação dos produtos de PCR ao vetor pGEM-T .. | Erro! Indicador não definido. |
| 4.7.5 - Transformação bacteriana por choque térmico..... | Erro! Indicador não definido. |
| 4.7.6 - Triagem das col nias por PCR | Erro! Indicador não definido. |
| 4.7.7 - Obtenção do plasmídeo para sequenciamento..... | Erro! Indicador não definido. |
| 4.7.8 – Sequenciamento | Erro! Indicador não definido. |
| 4.7.9 - Análise das seq ncias | Erro! Indicador não definido. |
| V - RESULTADOS | Erro! Indicador não definido. |
| 5.1 – Caracterização Biológica do CARV | Erro! Indicador não definido. |
| 5.1.1 – Preparo dos estoques virais | Erro! Indicador não definido. |
| 5.1.2 - Produção dos IFN- λ 1 e IFN- λ 2..... | Erro! Indicador não definido. |
| 5.1.3 - Avaliação da atividade antiviral dos IFNs frente ao CARV em células Vero..... | Erro! Indicador não definido. |
| 5.1.3.1 – Atividade antiviral dos IFNs tipo I e tipo III frente ao CARV em células Vero | Erro! Indicador não definido. |
| 5.1.3.2 – Avaliação do efeito cumulativo na atividade antiviral dos IFNs do tipo I e tipo III em células VERO infectadas com CARV | Erro! Indicador não definido. |
| 5.1.4 - Avaliação da expressão de ISGs e dos IFNs do tipo I e III por PCR em tempo real (qPCR) | Erro! Indicador não definido. |
| 5.2 – Sequenciamento parcial segmento S do APEUV | Erro! Indicador não definido. |
| VI DISCUSSÃO E CONCLUSÕES | Erro! Indicador não definido. |
| VII REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | Erro! Indicador não definido. |
| VIII ANEXOS | Erro! Indicador não definido. |
| 8.1 – Produção bibliográfica | Erro! Indicador não definido. |
| 8.2 – Eventos..... | Erro! Indicador não definido. |

8.3 – Apresentação de trabalhos **Erro! Indicador não definido.**

RESUMO

Os *Orthobunyavirus* do grupo C estudados, Caraparu (CARV) e Apeu (APEUV), foram isolados na Amazônia brasileira na década de 50. A doença em humanos é caracterizada por febre alta, mialgia e fotofobia, com 4-5 dias de duração. Apesar de serem patogênicos para os seres humanos, terem sido isolados a mais de meio século e apresentarem potencial para infecção emergente, estudos relacionados aos vírus do grupo C são ainda escassos e suas características biológicas e moleculares são ainda pouco conhecidas. Os interferons representam uma família de citocinas, componentes do sistema imune inato, sendo a primeira linha de defesa contra uma infecção viral. Os estudos da relação entre os interferons e os arbovírus do grupo C podem trazer informações sobre a resposta imune inata estimulada por esses vírus. Células infectadas sintetizam e secretam interferons dos tipos I e III, que sinalizam as células vizinhas para expressarem proteínas antivirais (ISGs) na tentativa de conter a multiplicação e evitar a dispersão do agente viral. No presente trabalho, foi dada continuidade à caracterização biológica do CARV e à caracterização molecular do APEUV, sendo algumas importantes características desses vírus elucidadas. O CARV apresentou sensibilidade *in vitro* aos IFNs dos tipos I e III nas células Vero. A inibição promovida pelo IFN do tipo I utilizado (IFN β) se mostrou mais pronunciada que a inibição promovida pelo IFN do tipo III (IFN λ 2). Os resultados do tratamento simultâneo com os dois tipos de IFNs demonstraram não haver uma potencialização do efeito de um dos tipos de IFN pela presença do outro tipo. Os resultados obtidos demonstraram a capacidade do CARV de induzir a expressão de dois ISGs, MxA e IRF7, e dos IFN β , IFN λ 1 e IFN λ 2/3 em células humanas A549 infectadas. Dessa forma, pôde-se concluir que, além do CARV ser sensível aos IFNs dos tipos I e III *in vitro*, o vírus tem capacidade de induzir a expressão de IFNs e ISGs após a infecção das células A549. Assim, foi possível inferir que o sistema de IFN tem papel importante na resposta imune inata contra esse vírus. Como parte da caracterização molecular do APEUV, o sequenciamento parcial do segmento S da amostra original do vírus Apeu (BeAn 848) não clonada e dos clones 2, 3, 6 e 11 e sua comparação com a sequência obtida por Magalhães em 2007, demonstraram a homogeneidade da amostra viral Apeu (BeAn 848) testada.

ABSTRACT

Group C Orthobunyaviruses - Caraparu virus (CARV) and Apeu virus (APEUV) – were isolated in Brazilian Amazonia during the 1950's. These viruses could affect human being causing a disease characterized by high fever, muscular pain and photophobia during 4-5 days. Although group C viruses show a potential to emerge as human pathogens, studies with this viral family, especially involving this serogroup, are very rare and its biological and molecular characteristics are even less known. The interferons (IFNs) are a cytokine family important in the innate immune system regulation. IFNs play an essential role as first line defense against viral infections. The study of their interaction with these viruses can bring information about the innate immunity stimulated by them. Cells infected by viruses, synthesize and release type I and type III IFNs which signalize their neighbor cells to express antiviral proteins to moderate viral multiplication and their spreading. In this study, we have evaluated biological characteristics of CARV and molecular characteristics of APEUV, and we have shown some important aspects of them. CARV presented, *in vitro*, sensibility to type I and type III IFNs in Vero cells. The inhibition promoted by type I IFN (β IFN) was greater than the inhibition promoted by type III (λ IFN). The associated use of type I and type III IFNs shows that there is no enhancement of one IFN type activity by the presence of a different IFN type. It was shown that CARV is able to induce ISGs expression, MxA and IRF7, and IFN- β , λ 1 and λ 2/3 in infected A549 cells. Thus, we could conclude that, CARV presents *in vitro* sensibility to type I and type III IFNs, and it is able to induce IFN and ISGs expression in infected A549 cells. Thus, we can deduce that the IFN system has an important role in the innate immunity developed against this virus. As part of molecular characterization of APEUV, partial nucleotide sequences of the S segment from 4 plaque-purified APEUV clones and from the non-cloned APEUV (original virus stock) were obtained and compared to the sequence APEUV-CL5 (MAGALHÃES, 2008) revealing that all of the sequences were identical. These results suggest that the sample of APEUV used in this work is homogeneous and that this S segment variant is representative of the original virus population.