

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Dissertação de Mestrado em Microbiologia

**INTERAÇÃO DE *ACANTHAMOEBA POLYPHAGA*
MIMIVIRUS COM O SISTEMA INTERFERON HUMANO
EM CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE
PERIFÉRICO (PBMC)**

Lorena Christine Ferreira da Silva

Belo Horizonte
2013

Lorena Christine Ferreira da Silva

**INTERAÇÃO DE ACANTHAMOEBA POLYPHAGA
MIMIVIRUS COM O SISTEMA INTERFERON HUMANO
EM CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE
PERIFÉRICO (PBMC)**

*Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós Graduação em
Microbiologia da Universidade Federal
de Minas Gerais, como requisito parcial
para a obtenção do título de Mestre em
Microbiologia.*

Orientador: *Jônatas Santos Abrahão*

Co-Orientador: *Gabriel Magno Almeida*

**Belo Horizonte
2013**

Silva, Lorena Christine Ferreira da.

Interação de acanthamoeba polyphaga mimivírus com o sistema interferon humano em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) [manuscrito] / Lorena Christine Ferreira da Silva. - 2013.

82 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Jônatas Santos Abrahão. Co-orientador: Gabriel Magno Almeida.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas.

1. Acanthamoeba polyphaga mimivírus - Teses. 2. Interferon - Teses. 3. Células mononucleares do sangue periférico. 4. Microbiologia - Teses. I. Abrahão, Jônatas Santos. II. Almeida, Gabriel Magno. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 576.8

À minha família e amigos...

*“... Há certas horas que só queremos a mão no ombro, o abraço
apertado ou mesmo o estar ali, quietinho, ao lado...*

Sem nada dizer...

Alguém que ria de nossas piadas sem graça...

Que ache nossas tristezas as maiores do mundo...

*E que apesar de todas essas mentiras úteis, nos seja de uma sinceridade
inquestionável...”*

William Shakespeare

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me guiado durante esta nova caminhada. Por estar sempre comigo, me dando força, calma, paciência e sabedoria para seguir em frente, superar os obstáculos e as dificuldades, me iluminando em direção a mais esta conquista.

Aos meus pais e meu irmão, pela força, paciência e amor incondicional. Por terem suportado meu stress, pela ajuda financeira, pela palavra amiga nos momentos que mais precisei, por sempre terem acreditado em mim, por serem os que mais torceram por esta vitória.

Ao professor Dr. Jônatas Abrahão, obrigada pela brilhante orientação desde a Especialização. Obrigada por todo conhecimento e crescimento que me proporcionou. Sempre paciente, amigo e tão presente no dia-a-dia dos alunos. Uma grande inspiração para todos nós.

Ao meu co-orientador, Gabriel Magno. Obrigada por ser tão empolgado com esse projeto. Obrigada por ter tanta paciência em me ajudar na bancada. Valeu por cada primer e curva-padrão que me emprestou. Sem contar a ajuda sensacional com os westerns e todo o processo de composição do paper. Você é outra grande inspiração.

Aos membros da banca, por terem aceitado fazer parte e contribuírem para o enriquecimento do trabalho.

À minha família querida, que sempre esteve comigo. Tias, tios, primos... Obrigada por me fortalecerem com suas orações e apoio.

Aos amigos do Laboratório de Vírus. Tantas personalidades diferentes, as vezes nos desentendemos, mas no fim, acaba sendo bom demais estar com vocês todos os dias!! Tenho um carinho especial por cada um. Sem citar nomes, mas cada um sabe quão especial é pra mim.

Aos amigos de fora, que tornam tudo mais leve. Amo vocês!!!

Aos demais professores do Laboratório de Vírus, por se prestarem a nos ensinar de forma tão generosa e por terem tanta garra para colocar o Laboratório sempre pra frente.

À todos os funcionários da UFMG.

“A amizade duplica as alegrias e divide as tristezas.”

Francis Bacon

"Todo o futuro da nossa espécie, todo o governo das sociedades, toda a prosperidade moral e material das nações dependem da ciência, como a vida do homem depende do ar. Ora, a ciência é toda observação, toda exatidão, toda verificação experimental. Perceber os fenômenos, discernir as relações, comparar as analogias e as dessemelhanças, classificar as realidades, e induzir as leis, eis a ciência; eis, portanto, o alvo que a educação deve ter em mira. Espertar na inteligência nascente as faculdades cujo concurso se requer nesses processos de descobrir e assimilar a verdade, é o a que devem tender os programas e os métodos de ensino."

Rui Barbosa

RESUMO

Acanthamoeba polyphaga mimivirus (APMV) é um vírus gigante de DNA, descoberto em 2003, pertencente a família Mimiviridae e que apresenta elevada complexidade estrutural e genômica. Embora amebas de vida livre sejam consideradas hospedeiros de APMV, estudos recentes têm demonstrado que o vírus é capaz de multiplicar em fagócitos e acredita-se que pode ser um agente patogênico causador de pneumonia em humanos. No presente estudo, foi investigado como alguns componentes do sistema interferon humano são estimulados por APMV em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e como a multiplicação do vírus é afetada pelo tratamento com IFN do tipo I. Os resultados demonstraram que APMV é capaz de se replicar em PBMC humanas totais, induzindo IFN do tipo I nestas células, mas inibindo genes estimulados por IFN (ISG) por um mecanismo independente da presença de viroceptores e desfosforilação de STAT. Foi visto também que APMV é resistente à ação antiviral do IFN alfa2 (IFNA2) mas é sensível à ação antiviral de IFN beta (IFNB1). Os resultados obtidos confirmam estudos anteriores, os quais demonstraram que há infecção produtiva de fagócitos profissionais com APMV, e mais, mostram que este vírus é reconhecido pelo sistema imunitário dos vertebrados e é capaz de inibi-lo. Assim, foram fornecidos os primeiros dados sobre interação do sistema IFN e APMV e levantadas novas questões evolutivas e relevantes sobre a relação entre APMV e hospedeiros vertebrados.

Palavras chave: Acanthamoeba polyphaga mimivirus. Interferons. PBMC.

ABSTRACT

Acanthamoeba polyphaga mimivirus (APMV) is a giant, double-stranded virus of the Mimiviridae family that was discovered in 2003. This virus presents high structural and genetic complexity. Although free-living amoebas are hosts for the APMV, recent studies have shown that this virus is able to replicate in phagocytes and it is believed that might be a human pathogen that causes pneumonia. In the present study, were investigated how some components of the interferon (IFN) system are stimulated by APMV in human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and how APMV replication is affected by IFN treatment. The results demonstrated that APMV is able to replicate in human total PBMC, inducing type I Interferons (IFN) in these cells but inhibiting interferon stimulated genes (ISG) induction by viroceptor and STAT dephosphorylation independent mechanisms. Were also showed that APMV is resistant to the antiviral action of interferon-alpha2 (IFNA2) but is sensitive to the antiviral action of interferon-beta (IFNB1). The results confirm those obtained in previous studies, which demonstrated the productive infection of professional phagocytes with APMV, and expands them by showing that this virus is recognized by the immune system of vertebrates and inhibits it. Thus, were provided the first data regarding APMV and the IFN system interaction and raised new and relevant evolutionary questions about the relationship between APMV and vertebrate hosts.

Key words: Acanthamoeba polyphaga mimivirus. Interferons. PBMC.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<i>Figura 01: Morfologia de APMV.</i>	3
<i>Figura 02: Estrutura de APMV.</i>	7
<i>Figura 03: Ciclo de multiplicação de APMV em A. polyphaga.</i>	10
<i>Figura 04: Multiplicação de APMV em macrófagos.</i>	13
<i>Figura 05: Exemplo de via de indução de IFN após reconhecimento de um PAMP viral.</i>	20
<i>Figura 06: Ativação de ISG por IFN.</i>	22
<i>Figura 07: IFN x Vírus.</i>	25
<i>Figura 08: Interação entre PRR celulares, vias de indução de IFN e proteínas codificadas pelo VACV.</i>	27
<i>Figura 09: VACV x IFN.</i>	29
<i>Figura 10: Multiplicação de APMV em PBMC humanas.</i>	47
<i>Figura 11: Multiplicação de APMV em linhagens contínuas.</i>	48
<i>Figura 12: Indução de IFN do tipo I em PBMC humanas infectadas com APMV</i>	49
<i>Figura 13: Perfil de expressão de mRNA de MX1 e IFI6 em PBMC humanas infectadas com APMV infeccioso ou inativado por luz U.V.</i>	51
<i>Figura 14: Atividade antiviral de IFN do tipo I contra APMV.</i>	53
<i>Figura 15: APMV não contém viroceptores contra IFNA2 e IFNB1.</i>	55
<i>Figura 16: Infecção de PBMC humanas por APMV não altera a fosforilação de STAT1 por IFN do tipo I.</i>	56
<i>Figura 17: Fosforilação de STAT1 e 2 ocorre de maneira dose-dependente de IFN do tipo I em PBMC infectadas com APMV.</i>	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Sequências dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR em tempo real.

44

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

APEUV – Apeu virus

APMV - Acanthamoeba polyphaga mimivirus

EMCV - Encephalomyocarditis virus

IFI6 - proteína induzida por IFN alfa, 6

IFN - interferon

IFNA2 – interferon alfa 2

IFNAR - receptor de interferons do tipo I

IFNB1 – interferon beta

IRF – fator regulador de interferon

ISG - gene de estimulado por interferons

ISGF3 - fator genético 3 estimulador de interferon

ISRE – elemento responsivo estimulado por interferons

m.o.i.- multiplicidade de infecção

mRNA – RNA mensageiros

MX1 – homólogo humano para o gene de resistência a mixovírus 1 murino

NCPLV - vírus gigantes núcleo-citoplasmáticos de DNA

PAMP – padrões moleculares associados a patógenos

PBMC - células mononucleares do sangue periférico

PCR – reação em cadeia da polimerase

PIVMH - Parainfluenza virus 1 Mill Hill

PKR – proteína quinase dependente de RNA dupla fita

PRR – receptor que reconhece padrões moleculares

SI – sistema interferon

STAT – transdutor de sinal e ativador de transcrição

TGH – transferência gênica horizontal

TLR - receptor toll-like

VACV-WR – Vaccinia virus amostra Western Reserve

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	01
1.1 Vírus gigantes núcleo-citoplasmáticos de DNA (NCPLV)	01
1.2 Família <i>Mimiviridae</i> e outros vírus gigantes	02
1.3 Amebas de vida livre	05
1.4 Estrutura	06
1.5 Genoma	08
1.6 Ciclo de multiplicação	10
1.7 Importância clínica de APMV	13
1.8 Interferons	15
1.9 Interferons do Tipo I: IFN alfa e IFN beta	17
1.10 Interferons do tipo I e atividade antiviral	19
1.11 Mecanismos de evasão	24
II. JUSTIFICATIVA	30
III. OBJETIVOS	31
3.1 Objetivo geral	31
3.2 Objetivos específicos	31
IV. MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1 Materiais	32
4.1.1 Sistemas celulares	32
4.1.1.1 Amebas	32
4.1.1.2 PBMC humanas	33
4.1.1.3 Células Vero	33

4.1.1.4 Células Raw 264.7	34
4.1.1.5 Células Jurkat, clone E6-1	34
4.1.1.6 Células U937	35
4.1.2 Vírus	35
4.1.2.1 APMV	35
4.1.2.2 <i>Encephalomyocarditis virus</i>	36
4.1.2.3 <i>Vaccinia virus</i> amostra Western Reserve	36
4.1.2.4 <i>Parainfluenza virus 1 Mill Hill</i>	36
4.1.2.5 <i>Apeu virus</i>	37
4.1.3 Interferons	37
4.2 Métodos	37
4.2.1 Multiplicação de APMV (La Scola <i>et al.</i> , 2003)	37
4.2.2 Purificação de APMV (La Scola <i>et al.</i> , 2003)	38
4.2.3 Curva de ciclo único em diferentes linhagens celulares	38
4.2.4 Ensaios de infectividade viral em PBMC humanas	39
4.2.5 Indução de mRNA de IFN do tipo I e ISG em PBMC humanas infectadas com APMV	39
4.2.6 Quantificação de proteínas de IFN do tipo I em sobrenadantes de PBMC humanas infectadas com APMV	40
4.2.7 Curva de ciclo único de APMV em PBMC humanas previamente tratadas com IFN do tipo I	40
4.2.8 Sensibilidade dose-resposta de APMV a IFN do tipo I	41
4.2.9 Pesquisa de viroceptores em sobrenadantes de PBMC humanas infectadas com APMV.	41
4.2.10 Fosforilação de STAT1 e 2 em PBMC humanas infectadas com APMV	42
4.2.11 Fosforilação dose-dependente de STAT1 e 2 em PBMC humanas infectadas com APMV	43

4.2.12 Extração de RNA total celular e transcrição reversa	43
4.2.13 PCR em tempo real	44
4.2.14 Titulação de APMV (La Scola et al., 2003)	45
4.2.15 Titulação de APEUV e VACV-WR	45
V. RESULTADOS	46
5.1 APMV é capaz de se multiplicar em PBMC humanas	46
5.2 Multiplicação de APMV em diferentes linhagens celulares	47
5.3 APMV induz a expressão de mRNA de <i>IFNA2</i> e <i>IFNB1</i> em PBMC humanas infectadas por 18 horas	48
5.4 APMV infeccioso não induz a expressão de mRNA de ISG em PBMC humanas, enquanto APMV inativado por luz U.V. induz	50
5.5 APMV é sensível à ação antiviral de <i>IFNB1</i> , mas resiste ao tratamento com <i>IFNA2</i> em PBMC humanas	52
5.6 APMV não contém viroceptores solúveis contra <i>IFNA2</i> e <i>IFNB1</i>	53
5.7 A inibição da expressão de ISG por APMV não é mediada pelo bloqueio da fosforilação de <i>STAT1</i> e <i>2</i>	55
VI. DISCUSSÃO	58
VII. CONCLUSÕES	63
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
IX. ANEXOS	78