

I. INTRODUÇÃO

1.1 Vírus gigantes núcleo-citoplasmáticos de DNA

Os vírus são organismos parasitas intracelulares obrigatórios, tradicionalmente conhecidos por apresentarem pequenas dimensões e pequenos genomas codificadores de algumas poucas dezenas de proteínas. No entanto, um grupo muito especial de vírus, denominado genericamente de vírus gigantes núcleo-citoplasmáticos de DNA (NCPLV), contêm representantes com genomas de DNA dupla fita especialmente extensos, com capacidade de codificação de centenas de proteínas. Dentre as famílias de vírus incluídas neste grupo, tem-se: *Poxviridae*, *Phycodnaviridae*, *Iridoviridae*, *Asfarviridae* e *Mimiviridae* (ETTEN, LANE e DUNIGAN, 2010; YUTIN *et al.*, 2009).

Os vírus deste grupo são capazes de infectar animais, plantas ou eucariotos unicelulares. Eles demonstram relativa independência diante do sistema de transcrição de seus hospedeiros, pois são capazes de sintetizar, autonomamente, várias proteínas necessárias ao processo, como DNA polimerases, helicases, topoisomerasas e chaperonas (KOONIN e YUTIN, 2010; RAOULT, 2005; YUTIN *et al.*, 2009).

A limitação técnica foi um dos motivos para que mais vírus gigantes de DNA não tenham sido detectados há mais tempo, pois procedimentos de isolamento viral clássicos, como a filtração em filtros microbiológicos de 0,2 μm , causava a retenção da maioria dos NCPLV. Além disso, a seleção dos sistemas celulares representava um problema, uma vez que alguns vírus gigantes de DNA apresentam espectro de hospedeiros muito restrito. Sendo assim, a maioria dos vírus gigantes de DNA ambientais foram inicialmente detectados com o auxílio de dados metagenômicos. Muitos outros vírus interessantes e incomuns podem estar espalhados pelos mais

diversos ambientes. Sendo assim, a descoberta e caracterização dos NCPLV está em sua fase inicial (CLAVERIE *et al.* 2006; ETTEN, LANE e DUNIGAN, 2010; GHEDIN e CLAVERIE, 2005).

1.2 Família *Mimiviridae* e outros vírus gigantes

A descoberta do primeiro mimivírus aconteceu a partir de estudos de caracterização de MPAA relacionados a pneumonias nosocomiais presentes em um reservatório de água do sistema de refrigeração de um hospital em Bradford, na Inglaterra. Esta amostra de água foi coletada durante um surto de pneumonia ocorrido em 1992, e o estudo aprofundado deste material aconteceu no início dos anos 2000. O grupo de pesquisa francês coordenado pelo Dr. Didier Raoult (Universidade de Marseille, França) percebeu a presença de um micro-organismo crescendo em amebas e que se assemelhava a pequenos cocos Gram-positivos frente à coloração de Gram, isolados do material coletado em Bradford. Embora este MPAA apresentasse dimensões bacterianas e características de um Gram-positivo, não respondia a nenhuma classe de antibióticos. Após diversas tentativas mal sucedidas de isolamento deste micro-organismo, os pesquisadores decidiram fazer microscopia eletrônica do material, e surpreendentemente, foram visualizadas estruturas com simetria muito semelhante a alguns vírus. Estudos genéticos posteriores revelaram que os “cocos de Bradford”, como ficaram conhecidos, eram, de fato, um novo vírus, então denominado *Acanthamoeba polyphaga mimivirus* (APMV) (Fig. 01) (LA SCOLA *et al.*, 2003).

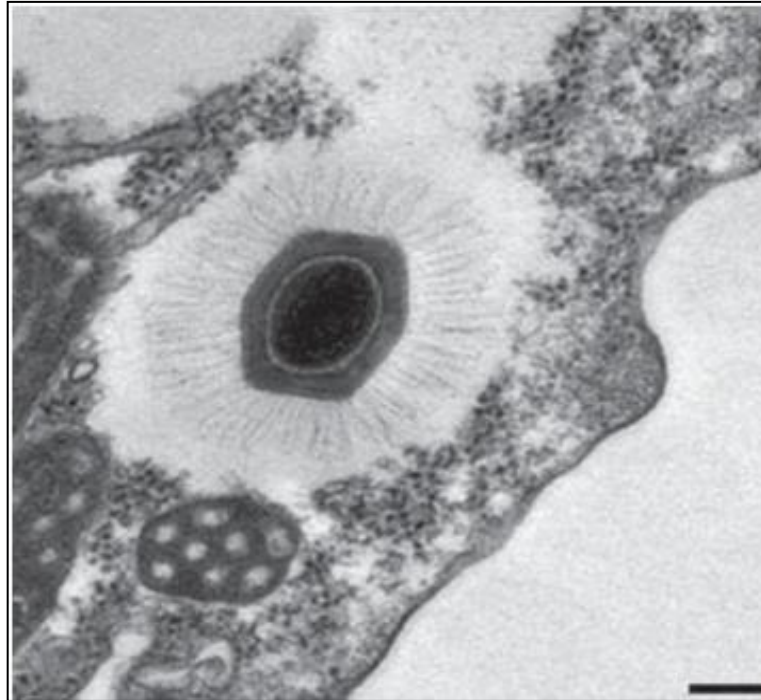


Figura 01: Morfologia de APMV. A visualização de APMV através de microscopia eletrônica de transmissão evidencia a estrutura peculiar do vírus gigante: capsídeo proteico circundado por fibras e presença de membrana interna, que envolve o genoma viral.

Fonte: Vincent, La Scola, Papazian, 2010.

Na ocasião da descoberta, por apresentar características diferenciais que não permitiam sua classificação em uma família viral já existente, a família *Mimiviridae* foi criada para incluir APMV (DESNUES e RAOULT, 2010). Atualmente, a família compreende os gêneros *Mimivirus*, que contém como única espécie APMV e *Cafeteriavirus*, que contém também uma única espécie, *Cafeteria roenbergensis virus* (COLSON *et al.*, 2011a; ICTV, 2012). Com o isolamento de várias amostras de vírus gigantes, vem sendo proposta a criação de uma nova ordem, *Megavirales* que seria dividida em dois grupos distintos: um com a família *Mimiviridae*, dividida em três linhagens (A, B e C) e outro com a família *Marseilleviridae* (COLSON *et al.*, 2012; COLSON *et al.*, 2013c).

Antes da caracterização de APMV, sequências gênicas semelhantes as sequências dos vírus da família *Mimiviridae* obtidas por metagenômica de águas oceânicas já haviam sido depositadas no *GenBank* há alguns anos. Após a correta

identificação deste como vírus, pesquisadores iniciaram uma busca intensa por “parentes” semelhantes. As análises filogenéticas feitas a partir de amostras do mar de Sargasso, por exemplo, demonstraram que tais sequências seriam estritamente relacionadas a vírus gigantes ainda desconhecidos, porém, abundantes no ambiente marinho (CLAVERIE *et al.* 2006; ETTEN, LANE e DUNIGAN, 2010; GHEDIN e CLAVERIE, 2005).

Após cinco anos da caracterização de APMV, uma nova amostra viral foi isolada de uma torre de resfriamento em Paris, *A. castellani mamavirus* (ACMV) (DESNUES e RAOULT, 2010). Este vírus possui morfologia e propriedades muito semelhantes às de APMV, assim como genes codificadores de proteínas envolvidas na transcrição e tradução gênica, porém ainda não foi oficialmente inserido na família *Mimiviridae* (COLSON *et al.*, 2011b).

Nos últimos tempos várias amostras de vírus gigantes têm sido isoladas nos mais diferentes ambientes e espécimes (PAGNIER *et al.*, 2013). *Marseillevirus*, também isolado a partir de amebas de vida livre apresenta características genéticas um pouco distantes de APMV e ACMV (RAOULT e BOYER, 2010); *Megavirus chilensis*, isolado a partir de uma amostra de água coletada na costa do Chile (ARSLAN *et al.*, 2011); *Terra1*, *Terra2*, *Courdo*, e *Moumouvirus*, isolados de amostras ambientais como solo e água (LA SCOLA *et al.*, 2010); *Senegalvirus*, isolado à partir de fezes de um paciente senegalês saudável (COLSON *et al.*, 2013a); LBA111, isolado em amostras respiratórias de pacientes com infecção pulmonar (SAADI *et al.*, 2013a); *Lentillevirus*, isolado à partir de uma solução de lavagem de lentes de contato (DESNUES *et al.*, 2012) e *Pandoravirus*, isolados no Chile e Austrália, com genomas complexos com tamanho de 2,5 e 1,9 Mb, respectivamente, cujo isolamento levantou a proposta de um novo gênero (PHILIPPE *et al.*, 2013).

1.3 Amebas de vida livre

As amebas do gênero *Acanthamoeba*, pertencem a um grupo de protozoários intitulado amebas de vida livre (AVL). Estas são extremamente ubíquas, e já foram isoladas em ambientes aquáticos, solo, ar, sistemas de tratamento de esgoto, ambientes hospitalares, sistema de ventilação e ar condicionado e em lentes de contato. Podem ser encontradas como parte da microbiota normal de alguns animais, incluindo o homem. As AVL são extremamente resistentes a extremos de pH e temperatura, e são altamente estáveis após tratamento com desinfetantes (CROZETTA, 2007; DUARTE, 2010; SILVA e ROSA, 2003).

Até o momento, já foram descritas aproximadamente vinte e quatro espécies para o gênero *Acanthamoeba*, sendo as mais estudadas: *A. polyphaga*, *A. castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. rhyodes* e *A. divionensi*, geralmente associadas a doenças em indivíduos imunodebilitados. Estas espécies são caracterizadas por apresentarem duas fases em seu ciclo de vida: trofozoítica, ativa, que se alimenta e se reproduz e oocística, que se desenvolve em situações de condições desfavoráveis de sobrevivência. As AVL podem causar doenças graves e crônicas, entre as quais, tem-se: encefalite amebiana granulomatosa, acantamebíase cutânea, ceratite amebiana e a meningoencefalite amebiana primária (CROZETTA, 2007).

Os micro-organismos patogênicos associados a amebas (MPAA) representam agentes causadores de pneumonia, que ganharam destaque nos últimos anos (GREUB e RAOULT, 2004). Fazem parte dos MPAA micro-organismos dos gêneros *Legionella*, *Parachlamydia*, *Mycobacterium*, dentre outros (GREUB e RAOULT, 2004; LA SCOLA *et al.*, 2005). Embora ainda seja debatido o quão importante são estes patógenos em termos de números absolutos de casos de pneumonia, uma parte da comunidade científica acredita que os MPAA estão associados a muitos casos nosocomiais de infecção pulmonar (*revisado* por GREUB e RAOULT, 2004).

Análises realizadas por diversos grupos de pesquisa demonstram que os MPAA são patógenos que mesmo após serem fagocitados por amebas, resistem ao ambiente intracelular, e muitas vezes conseguem se multiplicar e produzir progênie

numerosa (FRITSCHÉ *et al.*, 1993; GREUB E RAOULT, 2004; LA SCOLA *et al.*, 2005). Desta forma, é possível que diferentes gêneros de AVL, como *Acanthamoeba* sp., funcionem como plataformas biológicas de amplificação e propagação de MPAA (FRITSCHÉ *et al.*, 1993; GREUB e RAOULT, 2004; LA SCOLA *et al.*, 2005). Este dado ganha importância quando são considerados diversos estudos realizados em pequenas, médias e grandes instituições de saúde, que revelaram a presença de AVL em objetos e no piso de diversos ambientes hospitalares, como unidades de terapia intensiva (UTI), centro cirúrgico, berçário, cozinha, emergência e setor de doenças infecciosas (CARLESSO *et al.*, 2007; SILVA e ROSA, 2003).

Todavia, apesar de toda atenção e importância que vem sendo atribuída às AVL e aos MPAA nos últimos anos, uma descoberta recente chamou atenção da comunidade científica e agregou ainda mais valor aos MPAA: o isolamento e caracterização dos mimivírus (LA SCOLA *et al.*, 2003).

1.4 Estrutura

APMV possui uma estrutura complexa com características peculiares. Apresenta partículas maduras com diâmetro maior que 700 nm, não sendo, portanto, filtráveis através de filtros de 0,2 µm, como a grande maioria dos vírus conhecidos. As partículas virais não apresentam envelope externo, mas fibras de até 300 nm podem estar associadas ao capsídeo, aumentando consideravelmente suas dimensões. A função destas fibras ainda não foi totalmente elucidada, mas alguns autores acreditam que elas podem ser importantes no processo de adsorção viral e para proteção do vírus contra radiação solar (LA SCOLA *et al.*, 2003, MOREIRA e BROCHIER-ARMANET, 2008; RAOULT, LA SCOLA e BIRTLES, 2007; XIAO *et al.*, 2009).

APMV é capaz de codificar enzimas que sintetizam complexos polissacarídeos que são encontrados no lipopolissacarídeo (LPS) e/ou peptidoglicano de bactérias. Tais polissacarídeos formam a camada exterior da partícula de APMV na qual ficam embebidas as fibras. Isso aliado ao tamanho da

partícula viral pode ser responsável por facilitar a fagocitose do vírus pelas amebas (CLAVERIE, ABERGEL e OGATA, 2009).

Embora estudos preliminares tenham sugerido que APMV apresenta um capsídeo com simetria genuinamente icosaédrica, Xiao e colaboradores (2009) demonstraram que isto pode não ser verdade. Projeções computacionais (Fig. 02) baseadas em imagens obtidas da partícula viral por microscopia eletrônica e de força atômica revelaram que APMV apresenta uma estrutura complexa, com simetria pentagonal. Nesta simetria, um dos eixos é formado pela junção de faces compostas por capsômeros, que convergem para uma depressão central. Denominada de forma *star-gate*, esta região permite que o genoma viral seja liberado por esta região do vírus, podendo ser importante durante os momentos iniciais do ciclo de multiplicação viral. Ocorre também a presença de uma membrana interna envolvendo o genoma que parece estar imerso em uma matriz fibrosa (KUZNETSOV *et al.*, 2013; XIAO *et al.*, 2009).

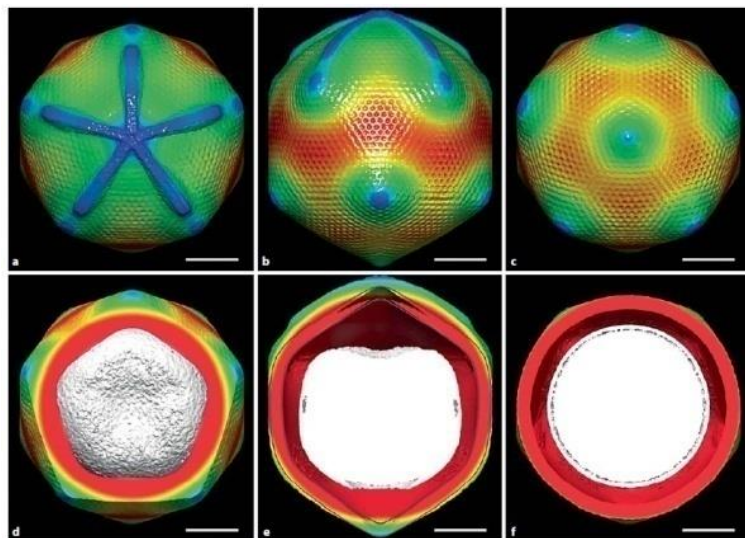


Figura 02: Estrutura de APMV. Imagem obtida através de projeção computacional baseada em crio-microscopia eletrônica evidencia a estrutura externa e interna de APMV. A-C: Diferentes ângulos da estrutura externa do capsídeo viral com simetria pentagonal evidencia a presença do *star-gate*, canal através do qual o genoma viral é liberado no citoplasma da célula hospedeira. D-E: Estrutura interna do capsídeo. É possível verificar a membrana interna que envolve o genoma.

Fonte: Klose *et al.*, 2010.

A estrutura de APMV pode ser um reflexo de transferência gênica horizontal (TGH), principalmente no ambiente intracelular de uma ameba. A associação do genoma com uma matriz fibrosa se assemelha à estrutura dos grandes genomas eucariotos; a liberação do genoma por mecanismo de *star-gate* é observado em fagos; e por fim, a matriz de peptideoglicano que envolve as fibras externas pode ter sido derivada de bactérias (XIAO *et al.*, 2009).

1.5 Genoma

O genoma de APMV é composto por uma molécula de DNA dupla fita de aproximadamente 1,2 Mb que codifica aproximadamente 1000 proteínas, muitas ainda sem função conhecida e outras nunca antes observadas em outros vírus. Dentre estas, merecem destaque proteínas envolvidas em processo de tradução protéica, reparo do DNA, motilidade celular e biogênese de membranas. 9% do genoma é não codificador e este tamanho relativamente grande permite ao vírus que codifique para proteínas não-essenciais para seu ciclo de multiplicação, mas que aumentam seu valor adaptativo. Algumas sequências do genoma de APMV exibem pouca ou nenhuma homologia com quaisquer outras sequências nucleotídicas conhecidas nas atuais bases de dados, as chamadas ORFans (CLAVERIE e ABERGEL, 2010; COLSON *et al.*, 2011b; SAINI e FISHER, 2007; SUHRE, 2005).

A região central do genoma de APMV é altamente conservada, e codifica principalmente proteínas estruturais e enzimas envolvidas no metabolismo do ácido nucléico. A presença de genes que codificam proteínas envolvidas em processos de tradução, como as amino-acil tRNA sintetases e fatores de alongação permite que APMV não necessite completamente da maquinaria da célula hospedeira para replicação de seu genoma (COLSON *et al.*, 2011b; COLSON *et al.*, 2013b; SUHRE, 2005).

O genoma de APMV e outras amostras de mimivírus ainda não incluídas na família *Mimiviridae* apresentam alto conteúdo de adenina-timina (AT), sendo os códons mais frequentes AAA (lisina) e AAT (asparagina). Alguns genes, por outro

lado, apresentam conteúdo de nucleotídeos e códons muito diferentes, podendo estar envolvidos em eventos de TGH. A TGH provavelmente também contribuiu para a relativa expressividade numérica de genes observada em APMV (COLSON *et al.*, 2013b). Diante disso, embora especulativo, é possível que no grande genoma de APMV ocorra a presença de regiões responsáveis por codificar proteínas não estruturais que estejam relacionadas com mecanismos de imunomodulação.

Um estudo que avaliou as alterações genômicas em APMV mantido em cultura axênica de amebas (sistema alopátrico, com isolamento genético) verificou que após sucessivas passagens em amebas nessas condições, o tamanho do genoma diminuiu e alterações morfológicas ocorreram. Em cultivo alopátrico, sem as fontes principais para a troca gênica (bactérias, eucariotos e outros micro-organismos amebianos), ocorrem deleções no genoma, principalmente nas regiões terminais. A perda das fibras e de sua glicosilação ocorre porque nas condições de cultivo estas não são hipoteticamente necessárias, uma vez que não há competição com outros micro-organismos amebianos, por exemplo. Isso ainda influencia na capacidade do vírus se associar com virófagos e na capacidade antigênica da partícula que está associada as fibras (BOYER *et al.*, 2011).

Análises do perfil de transcrição, expressão e variabilidade gênica em APMV após 150 passagens em amebas em comparação com o tipo selvagem, evidenciaram que 77% dos genes permaneceram intactos, 23% apresentaram variabilidade na sequência nucleotídica e 10% se tornaram inativos. A maioria dos genes que sofreram variações e inativação ao longo das passagens eram menos transcritos e expressos no início do cultivo alopátrico. Já para os genes com altos níveis transcricionais e de expressão observou-se que a maioria permaneceu intacta. O fato de genes fracamente transcritos e expressos em sua maioria serem inativados sugere que em condições alopátricas o vírus tende a perder e/ou degradar genes sem utilidade. Além disso, sabe-se que ocorre reparo de DNA em regiões ativamente transcritas e isso pode explicar por que os genes com menores níveis transcricionais sofreram mais variações, uma vez que não são alvo de reparação e essas variações observadas correspondem a erros de sequências que permanecem (COLSON e RAOULT, 2012).

1.6 Ciclo de multiplicação

APMV possui um ciclo de multiplicação peculiar (Fig. 03). A replicação de seu genoma de DNA é caracterizada por ocorrer exclusivamente no citoplasma da célula hospedeira. Porém, este não deve ser considerado um processo independente do núcleo hospedeiro, uma vez que fatores nucleares necessários à replicação podem participar do processo. Estudos recentes demonstraram através de microscopia de força atômica que o núcleo da ameba não apresenta alterações durante o ciclo de infecção do vírus gigante (KUZNETSOV *et al.*, 2013; MUTSAFI *et al.* 2010).

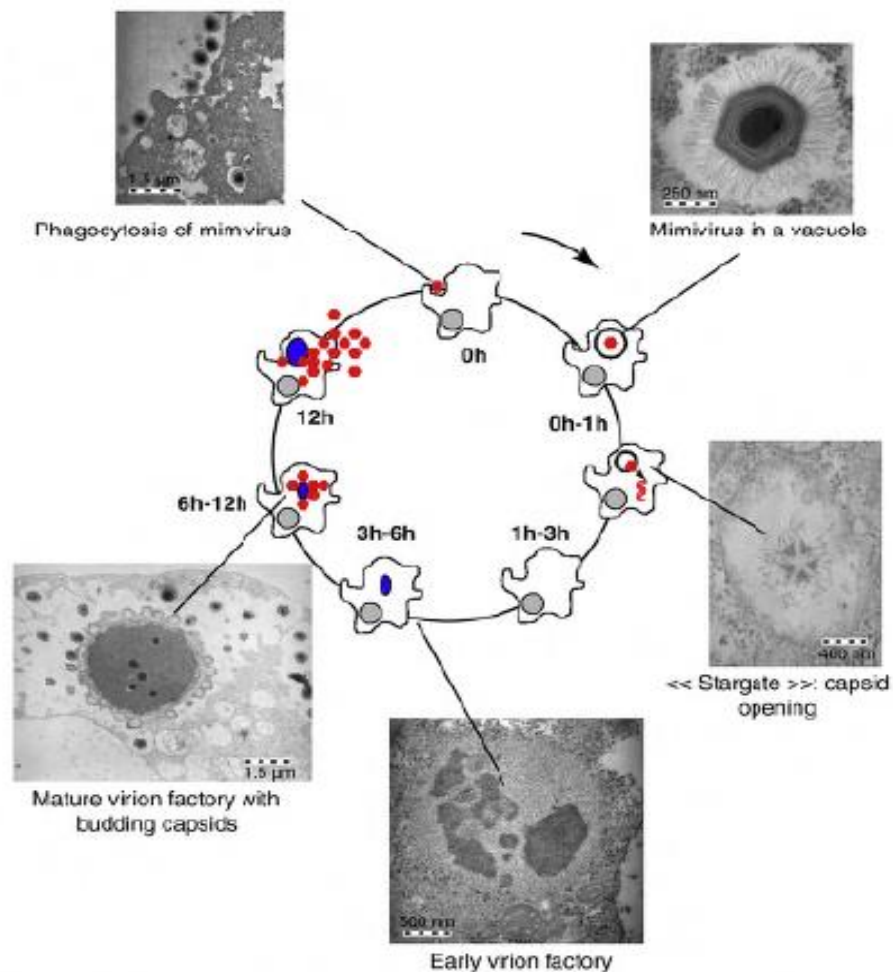


Figura 03: Ciclo de multiplicação de APMV em *A. polyphaga*. Esquemática do ciclo de multiplicação de APMV em amebas baseada em imagens obtidas por microscopia eletrônica de transmissão. APMV que penetra na célula hospedeira através do processo de fagocitose é

representado por pontos vermelhos; a fábrica viral por um círculo azul; o núcleo celular por um círculo cinza e o fagossomo por um círculo branco.

Fonte: Claverie e Abergel, 2010.

Foi demonstrado que APMV penetra em amebas do gênero *Achantamoeba* através de fagocitose e que o início do ciclo de multiplicação é marcado por uma fase de eclipse típica, na qual partículas virais não são visualizadas na célula (CLAVERIE, ABERGEL e OGATA, 2009; LA SCOLA *et al.*, 2008; LEGENDRE *et al.*, 2010; SUZAN-MONTI *et al.*, 2007). Nos estágios iniciais de multiplicação, partículas virais fagocitadas podem ser detectadas dentro de endossomos na célula hospedeira, até a ocorrência da fusão da membrana viral com a membrana da vesícula endossomal, o canal *star-gate* se abre no capsídeo viral liberando o genoma para o citoplasma da célula hospedeira (MUTSAFI *et al.* 2010).

O genoma é desnudado e se estabiliza sob a forma de núcleos esféricos livres (sementes virais), ao redor dos quais se formam as chamadas fábricas virais, nas quais ocorre a produção de proteínas componentes dos capsídeos virais e do *star-gate*, proteínas que se associam ao DNA viral, o qual é bem distribuído no interior da fábrica, onde sofre processo de replicação e transcrição e é preparado para ser empacotado nos capsídeos pré formados (ETTEN, LANE e DUNIGAN, 2010; KUZNETSOV *et al.*, 2013; MUTSAFI *et al.* 2010; SUZAN-MONTI *et al.*, 2007; XIAO *et al.*, 2009). Recentemente foi demonstrado que cerca de 2 horas após a infecção de amebas por APMV, inicia-se o aparecimento de várias vesículas transportadoras, as quais a origem ainda é desconhecida, mas suspeita-se que derivem de membrana nuclear ou do retículo endoplasmático rugoso próximo ao núcleo. Essas vesículas são apontadas como responsáveis por carrear fatores nucleares para as fábricas virais (KUZNETSOV *et al.*, 2013).

A transcrição dos genes ocorre de uma forma temporal: transcrição de genes iniciais, intermediários e tardios (SUHRE, AUDIC e CLAVERIE, 2005; LEGENDRE *et al.*, 2010). Após a expressão de genes tardios ocorre um aumento da fábrica viral e proteínas estruturais são sintetizadas, dando início ao processo de morfogênese viral. Na superfície das fábricas virais, acumulada com proteínas, inicia-se a montagem dos capsídeos e *star-gate*, seguido do empacotamento do mesmo com DNA. Ocorre uma

alta acumulação de vírions em fase final de morfogênese, sendo liberados na superfície da fábrica viral, onde adquirem uma camada de tegumento e uma camada de fibras superficiais, como etapa final antes da liberação da célula hospedeira mediada por lise (SUZAN-MONTI *et al.*, 2007; KUZNETSOV *et al.*, 2013; MUTSAFI *et al.*, 2010).

Também foi verificada a permissividade de fagócitos como monócitos e macrófagos, humanos e murinos a APMV, através de processo fagocitário, levando a infecção produtiva (Fig. 04), no entanto, pouco se sabe sobre este processo, sendo os trabalhos atuais com APMV feitos em sua maioria tendo amebas como modelo (GHIGO *et al.*, 2008).

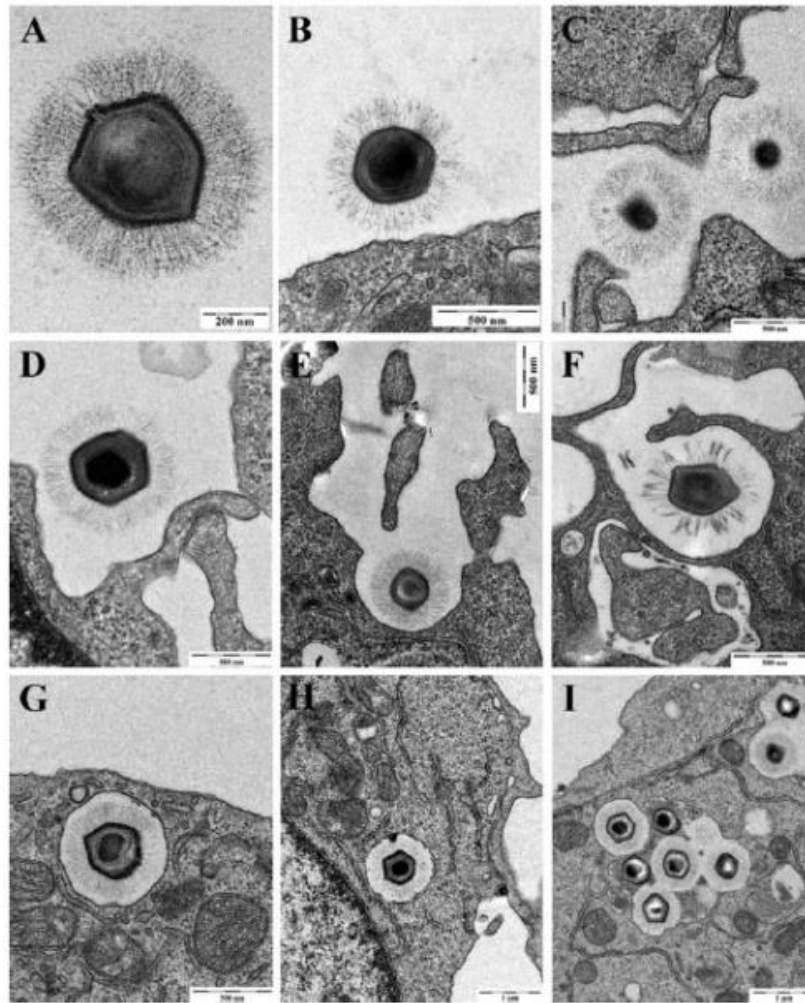


Figura 04: Multiplicação de APMV em macrófagos. Análise da penetração de APMV em células Raw 264.7, linhagem de macrófagos murinos, por microscopia eletrônica: (A) APMV isolado. (B) APMV em contato com a membrana celular. (C) APMV em contato com extensões celulares. (D e E) Largas extensões celulares começam a englobar APMV. (F) APMV englobado. (G) Grande vesícula endocítica contendo APMV. (H) Vesícula endocítica contendo APMV aparece em um sítio mais profundo no citoplasma. (I) Vesículas ocasionalmente se fundem.

Fonte: Ghigo *et al.*, 2008.

1.7 Importância clínica de APMV

Pacientes que se encontram em ambiente hospitalar, principalmente se imunodebilitados e respirando sob ajuda de aparelhos, representam um grupo de

risco para agentes causadores de pneumonia associados a amebas (LA SCOLA *et al.*, 2005). Porém, especificamente em relação à APMV, os resultados encontrados nos últimos anos, tentando relacioná-lo a casos de pneumonia em humanos não foram conclusivos. Foram realizadas detecções do genoma deste vírus e também de anticorpos contra APMV em diferentes amostras de pacientes com pneumonia (nosocomial ou não) em diferentes localidades e por diferentes técnicas (BOUSLUBIA *et al.*, 2013; RAOULT, LA SCOLA e BIRTLES, 2007; VANSPAUWEN *et al.*, 2012).

Foi estabelecido também um modelo animal para estudo do desenvolvimento da pneumonia *in vivo*. Dentre as diversas vias de infecção testadas, a via intracardíaca foi a mais promissora, sendo testada em camundongos (VINCENT, LA SCOLA E PAPAIZIAN, 2010). Nestes, foi possível observar evidências histopatológicas de pneumonia aguda: espessamento de paredes alveolares com infiltração celular de leucócitos, macrófagos e linfócitos; dano alveolar difuso e presença de eritrócitos no lúmen alveolar. A partir deste material, foi possível isolar o vírus e detectar antígenos por ensaio de imunofluorescência indireta (VINCENT, LA SCOLA E PAPAIZIAN, 2010).

Em 2013 foram publicados os primeiros estudos que obtiveram sucesso no isolamento de amostras de vírus gigantes a partir de espécimes humanos. Em um deles, haviam sido coletadas 196 amostras de pacientes da Tunísia, entre 2009 e 2010. O isolamento foi feito a partir de um experimento feito em placas de ágar, no qual a multiplicação do vírus presente nos espécimes analisados foi baseada em placas de lise em monocamada de amebas. Além disso, sorologia, análise proteômica e sequenciamento foram realizados para a amostra positiva, (LBA111), pertencente a um paciente de 72 anos com pneumonia. LBA111 também se mostrou positiva através de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real. O vírus isolado apresentou morfologia semelhante aos demais mimivírus, com tamanho de aproximadamente 560 nm e genoma de 1,23 Mb. Testes sorológicos apresentaram soropositividade e análise de proteínas através de Western-blot mostrou a imunoreatividade do soro do paciente positivo contra proteínas específicas de APMV e LBA111 (SAADI *et al.*, 2013a). Em outro estudo do mesmo grupo de pesquisa, *Shan virus*, foi isolado a partir de amostra de fezes coletadas de uma paciente da Tunísia, acometida com pneumonia (SAADI *et al.*, 2013b).

Em uma amostra de fezes, através de análise metagenômica, foram detectadas sequências semelhantes a outros vírus gigantes. Um vírus foi isolado, sendo denominado *Senegalvirus* e incluído na hipotética família *Marseilleviridae*, representando a primeira detecção de um *Marseillevirus* a partir de uma amostra humana (COLSON *et al.*, 2013a). Em uma amostra de sangue de doador aparentemente saudável foi também estabelecida a presença de um vírus gigante através de sequenciamento completo do genoma, detecção de antígenos, visualização morfológica e multiplicação em células (POPGEORGIEV *et al.*, 2013).

Ghigo *et al.* (2008) observaram que APMV é internalizado apenas por células fagocitárias, como macrófagos e nunca por células não-fagocíticas, incluindo fibroblastos, células epiteliais ou neuronais. Sendo assim, essas células podem ser um alvo para multiplicação do vírus em humanos. O ciclo de infecção de APMV dentro de macrófagos foi avaliado através da técnica de PCR em tempo real e foi possível concluir que o número de cópias do DNA viral aumentou significativamente com o aumento no tempo de infecção. APMV foi citopatogênico para os macrófagos e realizou ciclos de multiplicação produtivos.

A investigação ao longo dos últimos anos está fortalecendo a idéia de que vírus gigantes não possuem apenas impacto ambiental e podem sim estar envolvidos com a saúde humana. Apesar disso, existem ainda questões a serem debatidas e dessa forma, há a necessidade de estudos adicionais e mais abrangentes para resolver essas questões (GHIGO *et al.*, 2008; RAOULT, LA SCOLA e BIRTLES, 2007). Embora meramente especulativo, caso a hipótese de que APMV realmente atue como patógeno humano se confirme, evidências evolutivas relativas à interação patógeno-hospedeiro deverão ser encontradas em ambas as espécies.

1.8 Interferons

Interferons (IFN) correspondem a uma família heterôgena de citocinas que são expressas por várias células de vertebrados em resposta ao estímulo por

determinados patógenos. Atuam como a primeira resposta contra uma grande gama de infecções virais, levando ao controle precoce da infecção ou a montagem de uma resposta imune adequada (LAROCQUE *et al.*, 2011). Foram descobertos e descritos em 1957, durante estudos de interferência viral, nos quais foi observada a presença de um fator antiviral em membranas corioalantóides de ovos embrionados de galinhas incubadas com *Influenza virus A* inativado pelo calor, capaz de inibir a multiplicação do mesmo vírus em uma nova membrana (ISAACS e LINDENMANN, 1957). Atualmente sabe-se que o gene ancestral de IFN continha íntrons e sofreu duplicações levando ao surgimento dos vários subtipos conhecidos. Estas duplicações ocorreram antes da divisão de répteis, aves e mamíferos e especificamente para IFN do tipo I, aliado as duplicações, o gene ancestral perdeu seus íntrons, sendo tais eventos ocorridos após o surgimento de mamíferos placentários. Os vários subtipos de IFN apontam para a importância destas citocinas para o desenvolvimento dos vertebrados, provavelmente devido a sua capacidade de imunomodulação e de regulação de mecanismos fisiológicos (HILLYER *et al.*, 2012; KRAUSE & PESTKA, 2005; SAMARAJIWA *et al.*, 2009).

Atualmente, são divididos em três classes, sendo classificados com base na sequência de aminoácidos e no tipo de receptor aos quais se ligam: IFN do tipo I (IFN alfa e beta, predominantemente), tipo II (IFN gama) e tipo III (IFN lambda I, II e III) (LAROCQUE *et al.*, 2011; SAMARAJIWA *et al.*, 2009).

Uma infecção viral usualmente modifica a atividade transcricional dos genes do hospedeiro. Isso ocorre como uma estratégia desenvolvida pelos hospedeiros e vírus, ambos na tentativa de facilitar a sua própria sobrevivência. Muitos vírus induzem a expressão de genes celulares envolvidos na replicação do ácido nucléico, a fim de aumentar a sua própria replicação. Por outro lado, a indução de IFN e de genes estimulados por IFN (ISG) é feita pelo hospedeiro para criar um estado antiviral (LAROCQUE *et al.*, 2011; SAMARAJIWA *et al.*, 2009).

Os IFN podem realizar várias outras ações complementares além de atividade antiviral. Eles possuem efeitos sobre muitos aspectos da fisiologia celular, dentre eles: crescimento, diferenciação celular, motilidade e várias outras, podendo assim apresentar efeitos imunomoduladores, antiproliferativos e anticancerígenos (DE WEERD *et al.*, 2013; SAMARAJIWA *et al.*, 2009; SEN, 2001; THOMAS *et al.*, 2011).

IFN podem causar efeitos inibitórios sobre o crescimento celular mediado por ações sob o aparato de controle do ciclo celular. Algumas células são extremamente sensíveis a atividade antiproliferativa de IFN alfa. Devido ao potencial clínico das propriedades dos IFN, este tipo de regulação do crescimento celular tem sido intensivamente estudado (GOODBOURN, DIDCOCK e RANDALL, 2000; LAROCQUE *et al.*, 2011; THOMAS *et al.*, 2011).

Quase todas as fases de resposta imune inata e adaptativa são afetadas profundamente por IFN. Todas as classes de IFN compartilham a capacidade de aumentar a expressão de proteínas MHC de classe I e assim promover respostas de células TCD8. Em contraste, apenas IFN gama é capaz de induzir a expressão de proteínas MHC de classe II, promovendo assim respostas de células TCD4. IFN podem também ter efeitos diretos sobre as células B, regulando o desenvolvimento, a proliferação, e a secreção de imunoglobulinas. Outra função imunomodulatória corresponde à ação sobre células NK, aumentando sua citotoxicidade e estimulando a sua proliferação (BORDEN *et al.* 2007; DE WEERD *et al.*, 2013; GOODBOURN, DIDCOCK e RANDALL, 2000; SEN, 2001; THOMAS *et al.*, 2011).

As propriedades antiproliferativa e imunomodulatória dos IFN permitiram a exploração destes no uso terapêutico contra vários tipos de cânceres, doenças autoimunes, como esclerose múltipla e infecções como hepatite C e D (DE WEERD *et al.*, 2013; GONZÁLEZ-NAVAJAS *et al.*, 2012; THOMAS *et al.*, 2011). IFN têm sido utilizados em tentativas para tratar neoplasias, várias formas de cânceres hematológicos e tumores sólidos, por exemplo (BORDEN *et al.* 2007; FRIEDMAN, 2007; GONZÁLEZ-NAVAJAS *et al.*, 2012; SEN, 2001;).

1.9 Interferons do Tipo I: IFN alfa e IFN beta

Os IFN do tipo I são um grande grupo de citocinas estruturalmente semelhantes que apresentam estrutura terciária composta por cinco alfa hélices e que são ativos na forma de monômeros. Das três classes de IFN, os IFN do tipo I são os que estão mais envolvidos em uma resposta imune inicial eficaz contra

infecções virais, além de serem os mais bem caracterizados neste sentido e aprovados para uso terapêutico (ALCAMI, SYMONS e SMITH, 2000; BONJARDIM, 2005; HARDY *et al.*, 2001; VANCOVA, LA BONNARDIERE e KONTSEK, 1998). São divididos em diferentes subtipos: alfa, beta, delta, epsilon, kappa, omega e tau (KALLIOLIAS e IVASHKIV, 2010; LEVY, MARIÉ e DURBIN, 2011) que competem pelo mesmo receptor celular, IFNAR, composto por duas subunidades (IFNAR1 e IFNAR2). Este receptor está presente em quase todos os tipos celulares, porém são pouco abundantes. De qualquer forma, são capazes de responder de forma robusta aos IFN, sugerindo que eles podem estar agrupados em áreas específicas da membrana celular (KIM *et al.*, 1997). Os genes para IFN do tipo I não contêm íntrons e estão codificados em humanos no braço curto do cromossomo 9 (BORDEN *et al.*, 2007; KALLIOLIAS e IVASHKIV, 2010; UDDIN e PLATANIAS, 2004). Vários tipos celulares são capazes de produzir IFN do tipo I, entre os quais, encontram-se: células dendríticas, fibroblastos, células epiteliais e macrófagos, sendo a indução de altos níveis de IFN do tipo I uma resposta inicial comum para muitas infecções em mamíferos (KONTSEK, KARAYIANNI-VASCONCELOS e KONTSEKOVÁ, 2003; LAROCQUE *et al.*, 2011; LEVY, MARIÉ, PRAKASH, 2003 ; SEN, 2001).

Dentro da família do IFN alfa, existem cerca de 14 a 20 membros, dependendo da espécie em questão. Em humanos, são encontrados 13 subtipos. A identidade de sequência dentre os subtipos é de cerca de 75% e as proteínas correspondentes apresentam quatro resíduos de cisteína conservados, que parecem estar envolvidos com ligações intramoleculares, as quais são importantes para a manutenção da atividade biológica. Mesmo com estrutura e função semelhantes, os subtipos de IFN alfa são produzidos diferencialmente e podem apresentar pequenas diferenças em suas atividades biológicas (ALCAMI, SYMONS e SMITH, 2000; COELHO *et al.*, 2005; HARRISON *et al.*, 2003; MALMGAARD *et al.*, 2002; SEN, 2001; UZÉ *et al.*, 2007).

Em mamíferos, geralmente há apenas um membro para o subtipo IFN beta. Este apresenta de 25 a 30% de homologia com o subtipo IFN alfa e é produzido por várias células. A similaridade de aminoácidos com os IFN alfa é de cerca de 70%. A estrutura terciária de IFN beta foi analisada através de técnicas de cristalografia e espectroscopia de ressonância magnética nuclear evidenciando a presença de cinco

alfa hélices. Assim como IFN alfa, este tipo atua na forma de monômero e se liga ao mesmo receptor celular, porém pode apresentar atividades biológicas diferenciais e maior potência, justificada por sua maior afinidade pelo receptor compartilhado com IFN alfa. Recentemente, foi demonstrado ainda que IFN beta pode sinalizar utilizando apenas a cadeia IFNAR1 do seu receptor celular, regulando genes exclusivos que aumentam sua atividade antiviral (ALCAMI, SYMONS e SMITH, 2000; COELHO *et al.*, 2005; DE WEERD *et al.*, 2013; HARRISON *et al.*, 2003 ; MALMGAARD *et al.*, 2002 ; SEN, 2001; UZÉ *et al.*, 2007).

1.10 Interferons do tipo I e atividade antiviral

A produção de IFN é transiente e culmina no desencadeamento de uma cascata de transdução de sinal que requer a ativação de receptores que reconhecem padrões moleculares (PRR) por ligação a padrões moleculares associados a patógenos (PAMP) (Fig. 5), que correspondem aos mais diversos produtos microbianos, como ácidos nucleicos (BORDEN *et al.*, 2007). Dentre os PRR, os receptores transmembrana endossômicos, os receptores *toll like* (TLR), são os mais caracterizados. Existem vários receptores TLR dentro desta família de proteínas e especificamente em relação ao reconhecimento de produtos virais, tem-se: TLR3, TLR7, TLR8 e TLR9. TLR3 é capaz de detectar dsRNA, um sub-produto da replicação do genoma de vírus de DNA e RNA; TLR7 e TLR8 reconhecem RNA fita simples (ssRNA) e TLR9 é ativado por moléculas de DNA (BORDEN *et al.*, 2007). Outros PRR, correspondem a helicases citoplasmáticas, a gene induzida pelo ácido retinóico I (RIG-I) e proteínas associadas com diferenciação de melanoma 5 (MDA5). PAMP ao serem reconhecidos por PRR levam ao desencadeamento da cascata de indução dos IFN. Especificamente em relação à indução de IFN do tipo I, ocorre a regulação de diversas vias de sinalização. Para IFN beta, proteínas quinases ativadas por stress (SAPK), como c-Jun N-terminal quinase (JNK) e p38MAPK são recrutadas para ativar fatores de transcrição JUN e ATF2, resultando na formação do complexo proteína de ativação 1 (AP1), que é translocado para o núcleo para regular a transcrição de IFN beta. Outra via possível

ocorre através da ativação do complexo $IKK\alpha/\beta/\gamma$, que uma vez ativado fosforila $I\kappa B$, que por sua vez dissocia-se de $NF\kappa B$. Uma vez dissociado, $NF\kappa B$ transloca-se para o núcleo, liga-se a região promotora e atua como regulador transicional. Já para IFN alfa, após a detecção da presença de um patógeno, quinases $IKK\epsilon$ e $TBK1$ são ativadas, fosforilam $IRF3$ (fator regulador 3 de IFN) pré-existente em células não estimuladas, o fator fosforilado transloca-se para o núcleo, ligando-se a $ISRE$ e ativando a transcrição de IFN alfa (BONJARDIM, 2005; BORDEN *et al.*, 2007; GARCIA-SASTRE e BIRON, 2006; LEVY, MARIÉ e DURBIN, 2011).

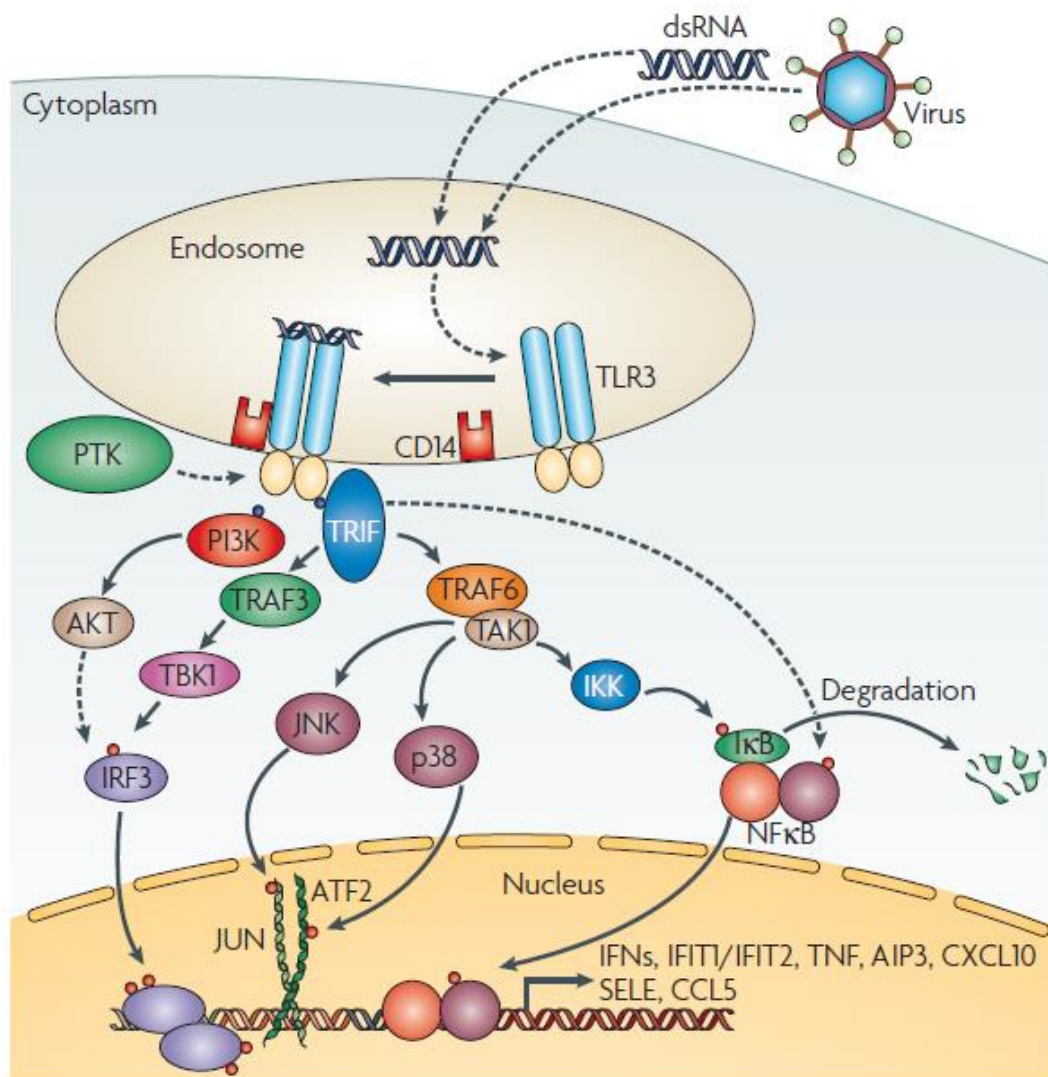


Figura 05: Exemplo de via de indução de IFN após reconhecimento de um PAMP viral. A indução de IFN inicia-se com o reconhecimento de dsRNA viral por TLR3 no lúmen endossomal. TLR3 é fosforilado em resíduos de tirosina por uma proteína tirosina quinase (PTK), se dimeriza e liga-se ao marcador de superfície CD14 ativando o complexo de sinalização montado pelo adaptador indutor de IFN beta que contém o domínio TIR (TRIF). Duas principais vias podem se

bifurcar a partir deste ponto: uma composta pela associação de TRIF com o adaptador TRAF3 (do inglês, *tumour necrosis factor (TNF) receptor-associated factor 3*) que sinaliza a ativação de quinases TBK1 (do inglês, *tank-binding kinase 1*) e IKK- ϵ (cinase de IB induzível- ϵ) que por sua vez ativam e fosforilam o fator de transcrição IRF3. Este também precisa ser fosforilado por P13K via proteína quinase AKT para uma ativação completa. A outra via atua através de TRAF6 (do inglês, *TNF-receptor-associated factor 6*) e TAK1 (do inglês, *transforming growth factor- β -activated kinase*) levando à ativação dos fatores de transcrição NF κ B, JUN e fator de transcrição de ativação 2 (ATF2). Os fatores de transcrição ativados translocam-se para o núcleo, ligam-se aos promotores específicos e induzem a transcrição dos genes de IFNs. Setas cheias indicam passos totalmente elucidados, já as setas pontilhadas mostram os passos que contêm intermediários ainda desconhecidos.

Fonte: BORDEN *et al.*, 2007.

Os IFN expressos irão desencadear a ativação da transcrição de ISG, sendo estes os mediadores dos efeitos antivirais e outras atividades biológicas (Fig. 06). Os IFN promovem a ativação de receptores celulares de IFN, seguida da fosforilação de membros da família Janus quinases (Jak) ou tirosinas quinases (Tyk), que uma vez ativadas fosforilam transdutores de sinais e ativadores de transcrição (STAT), que formam heterodímeros STAT1/STAT2 que ligam-se a um terceiro fator p48/IRF9, formando o fator genético 3 estimulador de IFN (ISGF3) que por sua vez se ligará a porção ISRE (elemento responsivo estimulado por interferons) presente na região promotora dos ISG para induzir a transcrição destes genes. Uma vez expressos, os ISG transmitem ações celulares que limitam a replicação e propagação viral, e que modulam indiretamente a maturação da resposta imune adaptativa (BONJARDIM, 2005; BORDEN *et al.*, 2007; ERICKSON, SEIWERT e GALE, 2008; WONG *et al.*, 2002).

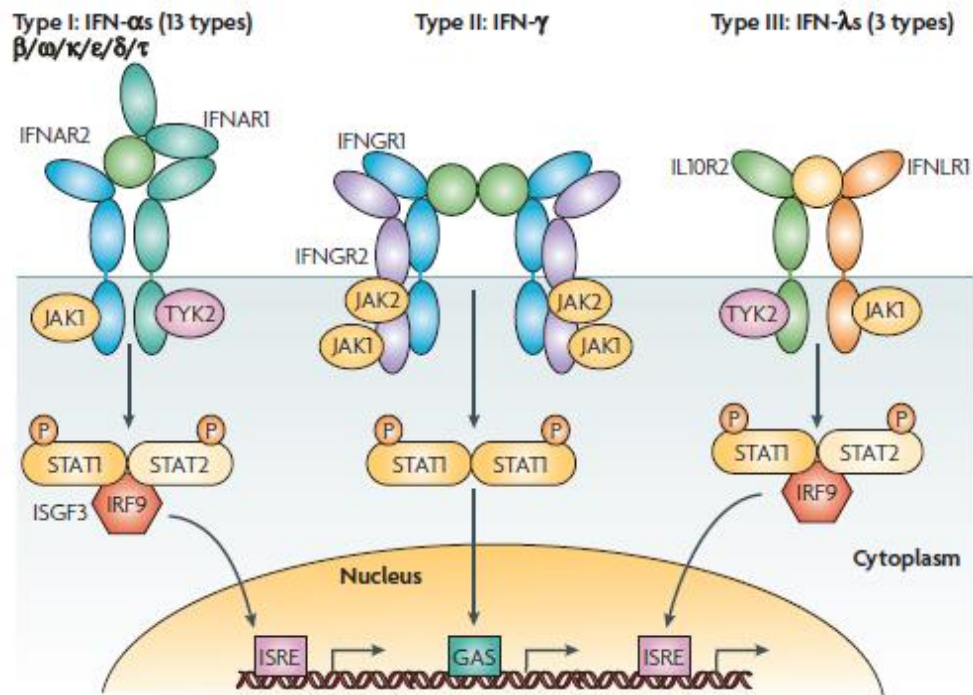


Figura 06: Ativação de ISG por IFN. Cada tipo de IFN tem um receptor celular específico para se ligar: IFN do tipo I ligam-se ao receptor de IFN do tipo I (IFNAR) que contém duas subunidades IFNAR1 e IFNAR2; o IFN gama (IFN do tipo II) se liga ao receptor de IFN do tipo II (IFNGR) que também contém duas subunidades: IFNGR1 e IFNGR2 e os IFN do tipo III, ao receptor de IFN do tipo III que possui uma cadeia exclusiva, IFNLR1, e uma cadeia compartilhada com outros membros da família de interleucinas, IL-10R2. Para os IFN do tipo I e III, ocorre a associação entre os receptores e proteínas quinases JAK1 e TYK2, que uma vez ativadas fosforilam STAT1 e STAT2 formando um heterodímero que se associa com o fator IRF9 formando o complexo ISGF3 que se transloca para o núcleo e induz a transcrição de ISGs. Já para o IFN gama, a associação ocorre com JAK1 e JAK2, que fosforila STAT1 formando um homodímero, que no núcleo liga-se a região GAS e assim promove a transcrição dos ISG.

Fonte: BORDEN *et al.*, 2007.

Os ISG correspondem a um grupo diverso de mais de 300 genes. Dos ISG atualmente identificados e bem caracterizados, pode-se citar: homólogo humano para o gene de resistência a mixovírus 1 murino (MxA), 6-16, 2'5'oligo adenilato sintetase (2'5'OAS) e proteína quinase R dependente de RNA dupla fita (PKR). Entretanto, muitos ainda não possuem funções bem conhecidas (BORDEN *et al.*, 2007; SAMARAJIWA, *et al.*, 2009; SAMUEL, 2001; SEN, 2001).

Os genes de resistência aos mixovírus (MX) são ISG que codificam proteínas que inibem a replicação de diferentes de vírus. Proteínas Mx foram inicialmente descobertas em camundongos resistentes à *Influenza virus A*. Nos seres humanos, ocorrem dois genes que codificam MxA e MxB. O modo de ação da proteína Mx pode depender da localização subcelular da mesma, as proteínas Mx de murinos são predominantemente nucleares enquanto as proteínas Mx de outras espécies tendem a localizar-se no citoplasma. Apesar destes padrões de localização diferentes, tanto Mx1 nuclear de murinos quanto MxA citoplasmática de humanos inibem a replicação do *Influenza virus*. Estas proteínas estão envolvidas no tráfico de vesículas através de sua associação com o citoesqueleto e o retículo endoplasmático. Logo, essa interação leva a atividade antiviral por interação com nucleocapsídeos virais que são aprisionados em locais celulares para o isolamento ou a degradação, prevenindo a replicação viral. O ISG 6-16 (proteína induzida por IFN alfa, 6) parece estar envolvido com interrupção da síntese protéica e indução de apoptose (NETHERTON *et al.*, 2009; PAVLOVIC, HALLER, STAEHELI, 1992; SEN, 2001; STEVENSON *et al.*, 2011).

Em células tratadas com IFN, PKR é predominantemente encontrado no citoplasma e associado a ribossomos. PKR é uma serina/treonina quinase que é ativada por autofosforilação mediada por dsRNA viral e assim, catalisa a fosforilação intermolecular do fator de iniciação eucariótico 2 (eIF2 α), um co-fator no processo de tradução, necessário para o recrutamento de RNA transportador para os ribossomos para formar o complexo traducional. Sua fosforilação por PKR permite que ele se ligue de forma irreversível ao eIF2 β , que normalmente atua liberando eIF2 α do complexo para que este possa participar da tradução de outros RNA. Como a atividade de eIF2 β é inibida pela fosforilação e ligação de eIF2 α , este fica preso ao complexo e impedido de iniciar futuros eventos de tradução. Isto evita que a tradução de proteínas celulares e virais ocorra, alterando o padrão de tradução da célula hospedeira e inibindo a replicação viral (SAMUEL, 2001; SHORT, 2009).

2'5'OAS e endorribonuclease latente (RNase L) são induzidos em resposta a IFN e conduzem à degradação de RNA (SAMUEL, 2001). RNase L estimula a degradação de mRNA virais e celulares para prevenir a síntese de proteínas virais. RNase L é ativado por uma interação com oligômeros de adenosina, que são ligados

por uma ligação fosfodiéster em uma configuração 2'-5' e que é ativada por dsRNA. (SAMUEL, 2001; SHORT, 2009).

1.11 Mecanismos de evasão

Como parasitas intracelulares obrigatórios, os vírus foram capazes de desenvolver vários mecanismos de evadir a resposta antiviral mediada pelos hospedeiros, a partir de um processo de co-evolução com os mesmos (PERDIGUERO e ESTEBAN, 2009). *Vaccinia virus* (VACV), *Influenza virus*, *Human herpesvirus 1*, *Human immunodeficiency virus* e *Epstein-Barr virus* são alguns exemplos de vírus que desencadearam tais mecanismos ao longo de sua evolução (WAIBLER *et al.*, 2009). No genoma de muitos vírus, é possível encontrar genes que codificam proteínas envolvidas com a modulação da via dos IFN de diferentes formas: inibição da expressão gênica, codificação de produtos virais que interferem com a resposta aos IFN, codificação de antagonistas de IFN ou ISG (Fig. 07) (GARCIA-SASTRE e BIRON, 2006; SMITH *et al.*, 2013).

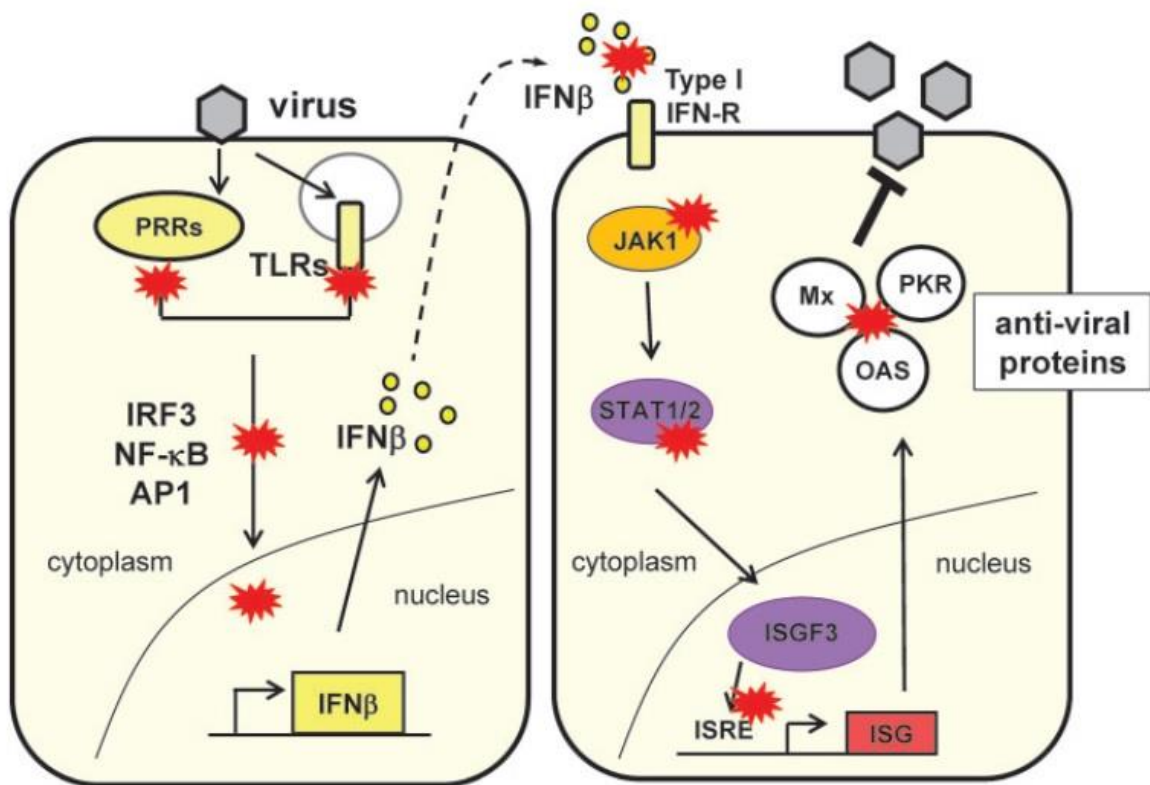


Figura 07: IFN x Vírus. Vírus são capazes de codificar diversas proteínas (destacadas em vermelho) que interferem em diferentes etapas da cascata de sinalização de IFN, tendo papel de imunomodulação.

Fonte: SMITH *et al.*, 2013.

Por antagonismo, alguns vírus são capazes de diminuir a indução de IFN. Este mecanismo pode ocorrer através de inibição de IRF3, por exemplo. *Influenza virus* e vírus da família *Poxviridae* são exemplos de vírus que podem desencadear este mecanismo de evasão, sendo capazes de codificar proteínas que se ligam ao dsRNA prevenindo a estimulação de sensores celulares de dsRNA viral e impedindo que IRF3 seja ativado. dsRNA pode também sofrer ligação direta por antagonistas, como a proteína V de vários paramixovírus (ANDREJEVA *et al.*, 2004; GARCIA-SASTRE e BIRON, 2006). Já o antagonismo que interfere com a via de sinalização dos IFN tem como alvo principal a via JAK/STAT. Estudos em camundongos com deficiência de STAT1 e STAT2 demonstraram a importância desta via na indução de uma resposta antiviral eficiente, uma vez que estes camundongos apresentaram intensa sensibilidade frente à infecção por vários vírus

(MANN *et al.*, 2008). Vírus evoluíram estratégias de inibir esta via em diversos pontos: a proteína V do *Measles virus*, por exemplo, interrompe a capacidade de STAT1 se associar com os receptores de IFN do tipo I e do tipo II, enquanto a proteína P de *Rabies virus* se liga a STAT1 e STAT2, aprisionando-os na região citoplasmática. Outros vírus codificam proteínas que diminuem os níveis de STAT2 em células humanas infectadas ou bloqueiam a fosforilação de STAT1, por exemplo (BRZOZKA, FINKE e CONZELMANN, 2006; KUBOTA *et al.*, 2002).

Dentro da família *Poxviridae*, VACV apresenta diferentes mecanismos de evasão bem estudados e caracterizados (PERDIGUERO e ESTEBAN, 2009; SMITH *et al.*, 2013). Vários genes contidos em seu genoma codificam proteínas que funcionam como análogos de citocinas, como antagonistas e como receptores solúveis (WAIBLER *et al.*, 2009). VACV é capaz de codificar imunomoduladores que atuam no meio intra ou extracelular. Muitos dos genes virais com função imunomodulatória foram adquiridos diretamente do hospedeiro por TGH durante a co-evolução entre vírus-hospedeiro (PERDIGUERO e ESTEBAN, 2009).

Já foi demonstrado que camundongos e células dendríticas infectadas com a amostra *Vaccinia virus* Ankara modificado (MVA) geram respostas antivirais significativas induzidas por IFN, principalmente do tipo I. Já em infecções dos mesmos sistemas com VACV ou com VACV em associação com MVA isto não é observado. Estes resultados sugerem que VACV expressa inibidores de IFN que foram funcionalmente eliminados em MVA, um vírus atenuado (WAIBLER *et al.*, 2009).

Dentre as várias proteínas imunomoduladoras que interferem com a produção de IFN em células infectadas com VACV, tem-se: A46 que inibe moléculas adaptadoras de TLR (BOWIE *et al.*, 2000; STACK *et al.*, 2005); A52 que inibe as moléculas de sinalização IRAK2 e TRAF6 (BOWIE *et al.*, 2000; HARTE *et al.*, 2003); K7 que impede a ativação de IRF mediada por TBK1/ IKK- ϵ (SCHRODER, BARAN e BOWIE, 2008); N1, B14, K1, e M2 que estão envolvidas na inativação do fator de transcrição NF κ B (GEDEY, HINTHONG e SHISLER, 2006; SHISLER e JIN, 2004) e C6, que foi recentemente caracterizada como proteína capaz de inibir a ativação de IRF3 e IRF7 (UNTERHOLZNER *et al.*, 2011) (Fig. 08).

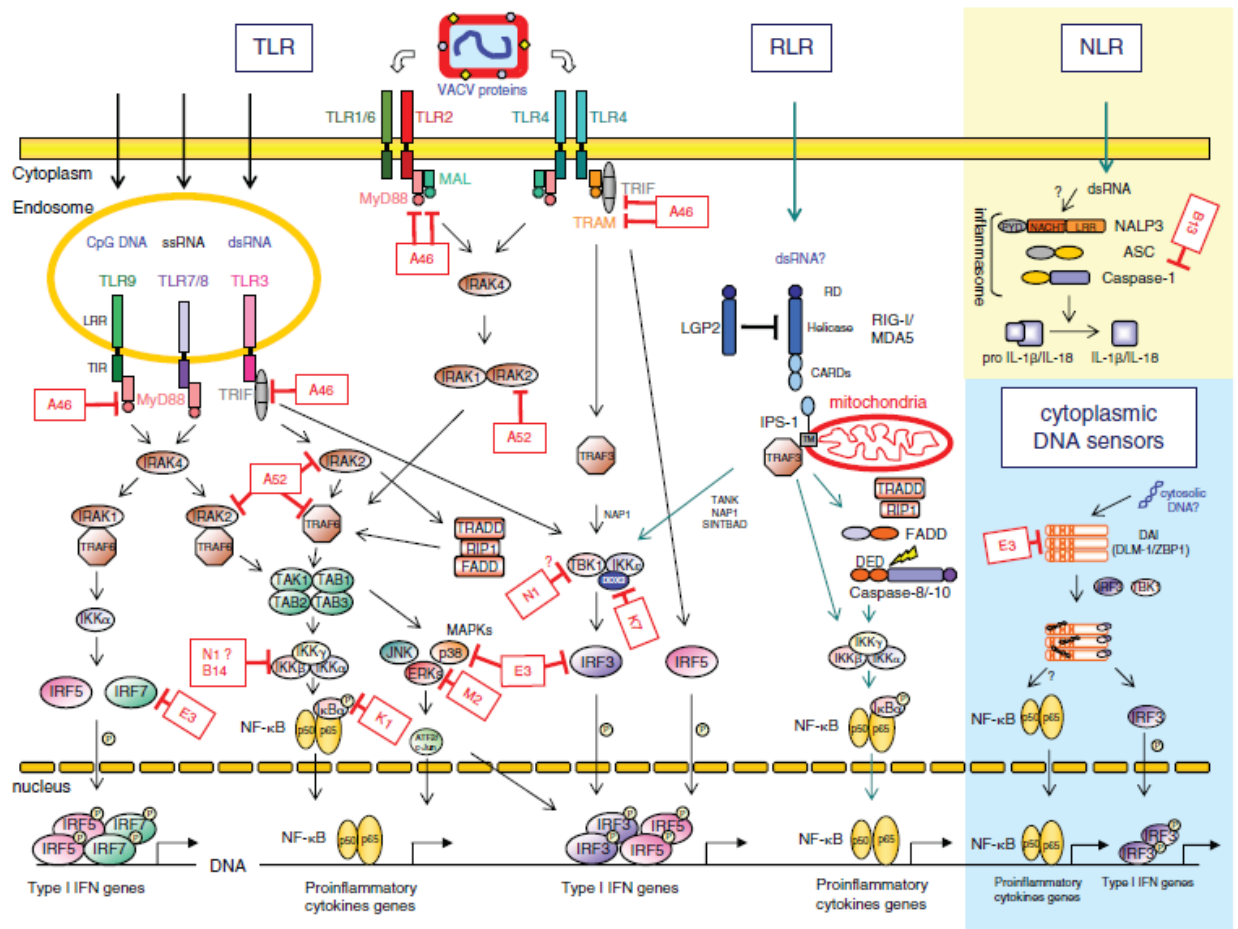


Figura 08: Interação entre PRR celulares, vias de indução de IFN e proteínas codificadas pelo VACV. PRR do hospedeiro estão indicados em azul; as proteínas imunomoduladoras codificadas por VACV que interferem com as vias de indução de IFN, como A46, A52, K7, N1, B14, K1, e M2 em vermelho.

Fonte: PERDIGUERO e ESTEBAN, 2009.

VACV codifica também os chamados receptores solúveis de IFN ou viroceptores, B8 e B19, que bloqueiam a ligação de IFN aos seus receptores celulares naturais (SYMONS, ALCAMÍ e SMITH, 1995; WAIBLER *et al.*, 2009). O produto do gene E3L de VACV é uma proteína de ligação ao dsRNA que ao se ligar a estas moléculas, sequestrando-as, inibe a ativação de PKR e parece também ser capaz de bloquear a produção de 2'5'OAS (CHANG, WATSON e JACOBS, 1992; DAVIES *et al.*, 1993). Já o gene K3L codifica um homólogo de eIF2 α que interfere

com a função de PKR, agindo como um pseudosubstrato (CARROL *et al.*, 1993; DAVIES *et al.*, 1992; DAVIES *et al.*, 1993). A fosfatase VH1 de VACV, um componente do vírion crítico para a replicação viral, provoca a desfosforilação de STAT1 (LIU, LEMON, TRAKTMAN, 1995, SCHMIT *et al.*, 2013) (Fig.09) (MANN *et al.*, 2008; PERDIGUERO e ESTEBAN, 2009). É importante lembrar que assim como o VACV, outros membros dos NCLDV apresentam genomas extensos, capazes de sintetizar um poderoso arsenal de imunomodulação. Todavia, não existem dados acerca de genes de imunomodulação codificados por membros da família *Mimiviridae*.

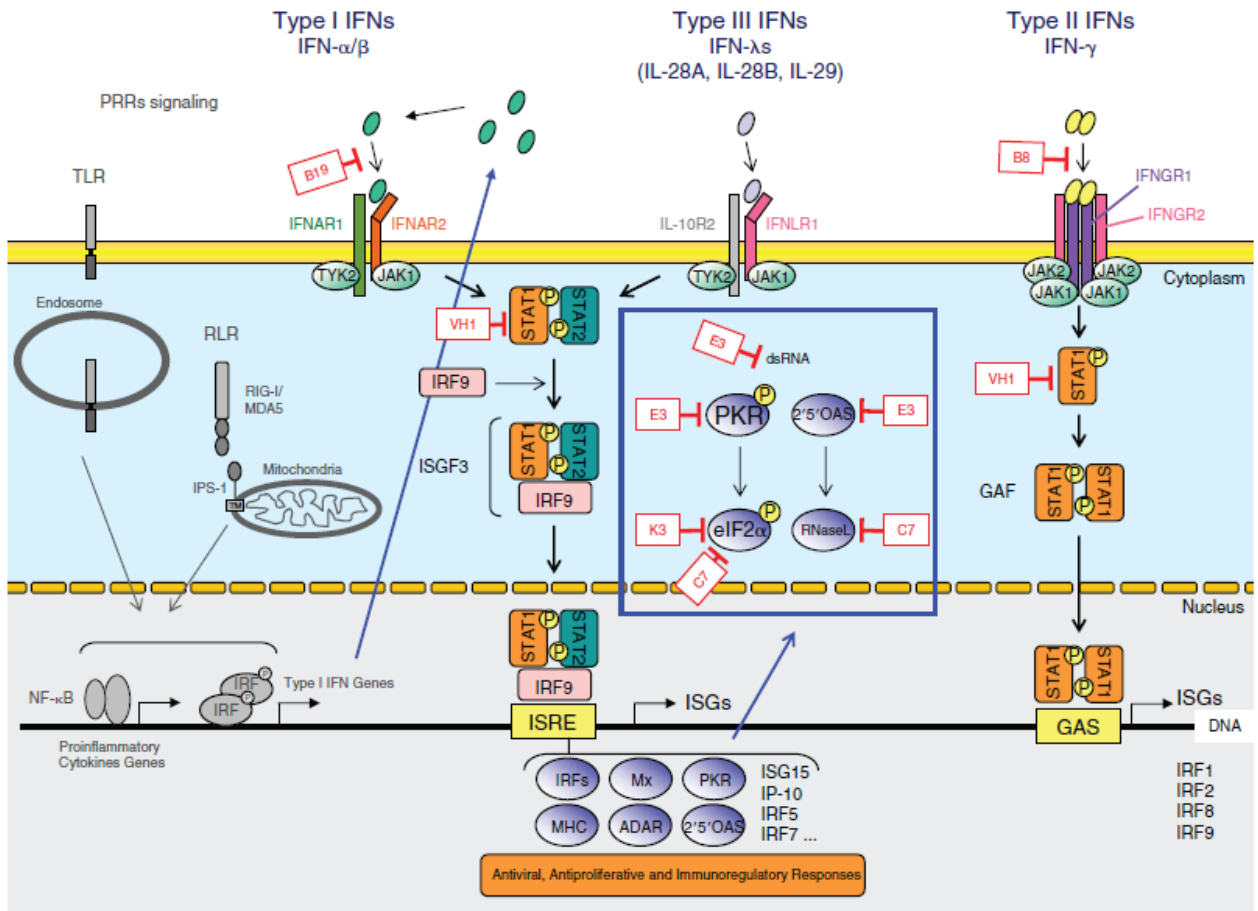


Figura 09: VACV x IFN. Inibição da resposta antiviral mediada por IFN através de proteínas imunomoduladoras de VACV que agem como receptores solúveis, proteínas de ligação ao dsRNA e moléculas antagonistas.

Fonte: PERDIGUERO e ESTEBAN, 2009.

II. JUSTIFICATIVA

Os IFN são citocinas produzidas por diversas células de vertebrados que desempenham importantes funções durante a resposta imune gerada contra infecções virais. Durante a tentativa das células hospedeiras em abortarem a infecção viral, várias estratégias são montadas pelos vírus, numa tentativa de contra-atacar o estado antiviral, dessa forma, vírus e hospedeiro realizam um constante processo de co-evolução. O fato de APMV penetrar em células fagocitárias e gerar uma infecção produtiva, além de sugerir que estes poderiam estar relacionados com a patogênese e a multiplicação de APMV em seres humanos e outros vertebrados, desperta o interesse a respeito da interação deste vírus com o sistema interferon (SI), uma vez que este tipo celular é capaz de produzir IFN como resposta a infecções virais. Assim, este estudo se mostra interessante, uma vez que APMV exhibe características peculiares, sendo estrutura e genomicamente complexo. Este vírus foi isolado inicialmente em amebas, que é considerada seu hospedeiro natural, logo, de maneira geral, não seria esperada a interação deste com o SI, uma vez que estas citocinas só são produzidas em vertebrados. Porém, esta possibilidade não pode ser descartada, uma vez que este vírus gigante contém um grande número de genes, muitos dos quais obteve por TGH através de micro-organismos com os quais co-habitou o ambiente intracelular das amebas, nas quais ocorre à propagação dos mais diversos agentes patogênicos, a seleção de características de virulência e a adaptação de patógenos ao ambiente fagocitário. Assim, este ambiente poderia ter contribuído para uma possível aquisição de genes por APMV que codificam proteínas capazes de interagir com o SI. Além disso, APMV vem sendo apontado com um possível patógeno humano e caso essa hipótese se confirme, evidências da co-evolução entre as duas espécies devem ser encontradas. Desta forma, este estudo é importante não só por trazer informações sobre a relação deste vírus com a resposta imune inata, mas também por direcionar futuros estudos relacionados com este possível agente causador de pneumonia.

III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo verificar a forma pela qual APMV interage com o sistema interferon (SI) em células mononucleares do sangue periférico (PBMC) humanas.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliar a susceptibilidade e permissividade de PBMC humanos ao APMV;
- Avaliar a susceptibilidade e permissividade de diferentes linhagens monocíticas, humanas e murinas ao APMV;
- Mensurar os níveis de expressão de mRNA de IFN do tipo I (*IFNA2*, *IFNB1*) em PBMC humanas infectadas com APMV;
- Mensurar os níveis de expressão de mRNA de dois diferentes ISG (*MX1* e *IFI6*) em PBMC humanas infectadas com APMV;
- Mensurar os níveis de proteínas de IFN do tipo I (*IFNA2*, *IFNB1*) em PBMC humanas infectadas com APMV;
- Verificar a atividade antiviral de IFN do tipo I (*IFNA2* e *IFNB1*) contra APMV em PBMC humanas;
- Avaliar a presença de possíveis viroceptores codificados por APMV;
- Verificar a capacidade de APMV interferir com a fosforilação de STAT1 e STAT2.

IV. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

4.1.1 Sistemas celulares

4.1.1.1 Amebas

Amebas de vida livre do gênero *Acanthamoeba* correspondem a células hospedeiras para APMV. *A. castellanii* proveniente da *American Type Culture Collection* (ATCC 30010) (Maryland, E.U.A.) foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Amebíases do Instituto de Ciências Biológicas (ICB), da UFMG. Estas células foram utilizadas para multiplicação e ensaios de titulação viral. Amebas *A. castellanii* foram cultivadas em garrafas de cultura (TPP, Suíça) contendo meio protease peptona extrato de levedura e glicose (PYG) suplementado com 7% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Brasil), gentamicina (50 µg/ml), penicilina potássica (200 U/mL) e anfotericina B (fungizona) (2,5 µg/ml) e incubadas à 32 °C, sendo as garrafas completamente vedadas. Os subcultivos foram feitos três vezes por semana ou de acordo com a necessidade, sendo a monocamada celular desprendida da superfície da garrafa de cultura através de um banho de gelo de cinco minutos. Após este processo, o conteúdo foi coletado, as células contadas em câmara de Neubauer e o conteúdo dividido em novas garrafas de cultura e adicionado de novo meio PYG.

4.1.1.2 PBMC humanas

PBMC são compostas por monócitos, linfócitos e células dendríticas, células capazes de produzir IFN e relevantes para a resposta antiviral. O cultivo primário de PBMC foi feito através do fracionamento de sangue humano e utilizado neste trabalho para verificar a interação de APMV com o SI. O fracionamento ocorreu por gradiente de densidade a partir do sangue de 05 voluntários, após assinatura do termo de consentimento aprovado pelo Comitê de Ética da UFMG (COEP-UFMG) (Anexo 1) conforme descrito por Böyum (1968): aproximadamente 10 mL de sangue foram coletados em tubos contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e diluídos em mesmo volume de solução salina fosfatada (PBS) 1X. O sangue diluído foi lentamente adicionado sobre uma camada de 10 mL de Ficoll-Paque (GE Healthcare Life Sciences, Reino Unido) e em seguida centrifugado por trinta minutos à 400xg, à temperatura ambiente. O anel de PBMC foi aspirado com uma pipeta e em seguida lavado com 50 mL de PBS 1X e novamente centrifugado, a 400xg por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com meio RPMI 1640 (Life Technologies, Gaithersburg, MD) suplementado com 1% de SFB. As células foram contadas em Câmara de Neubauer, cultivadas em meio RPMI 1640 1% SFB em placas de seis poços (1×10^6 células por poço) e incubadas à 37°C, em atmosfera com 5% de CO₂.

4.1.1.3 Células Vero

Linhagem contínua derivada de células epiteliais de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*), obtida da ATCC (CCL-81) (Maryland, E.U.A.) foi utilizada para titulação de IFN e pesquisa de viroceptores. Células Vero foram cultivadas em garrafas de cultura contendo meio mínimo essencial de Eagle (MEM) (Gibco™, E.U.A) suplementado com 5% de SFB, gentamicina (50 µg/ml), penicilina potássica (200 U/mL) e anfotericina B (fungizona) (200 U/mL) e incubadas à 37°C, em atmosfera com 5% de CO₂. Os subcultivos foram feitos três vezes por semana

ou de acordo com a necessidade, sendo a monocamada celular lavada com solução de PBS 1X por três vezes e tratada com solução de tripsina contendo EDTA para desprendimento da superfície da garrafa de cultura. Após este processo, o conteúdo foi ressuspensionado em meio MEM. As células foram contadas em câmara de Neubauer e o conteúdo dividido em novas garrafas de cultura adicionadas de novo meio MEM.

4.1.1.4 Células Raw 264.7

Linhagem de macrófagos murinos derivados de tumores induzidos pelo *Abelson murine leukemia virus* em camundongos machos BALB/c proveniente da ATCC (TIB-71) (Maryland, E.U.A.). Foram utilizadas para realização de ensaios de infectividade viral. Células Raw 264.7 foram cultivadas em garrafas de cultura contendo meio (DMEM) (Gibco™, E.U.A) suplementado com 5% de SFB, gentamicina (50 µg/ml), penicilina potássica (200 U/mL) e anfotericina B (fungizona) (200 U/mL) e incubadas à 37°C, em atmosfera com 5% de CO₂. Os subcultivos foram feitos três vezes por semana ou de acordo com a necessidade, sendo a monocamada celular lavada com solução de PBS 1X por três vezes e tratada com solução de tripsina contendo EDTA para desprendimento da superfície da garrafa de cultura. Após este processo, o conteúdo foi ressuspensionado em meio DMEM. As células foram contadas em câmara de Neubauer e o conteúdo dividido em novas garrafas de cultura adicionadas de novo meio DMEM.

4.1.1.5 Células Jurkat, clone E6-1

Linhagem de linfócitos T humano proveniente da ATCC (TIB-152) (Maryland, E.U.A.) foi gentilmente cedida pela Dr. Edel Stancioli (LBVA, UFMG). Foram utilizadas para realização de ensaios de infectividade viral. Células Jurkat foram

cultivadas em garrafas de cultura contendo meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB, gentamicina (50 µg/ml), penicilina potássica (200 U/mL) e anfotericina B (fungizona) (200 U/mL) e incubadas à 37°C, em atmosfera com 5% de CO₂. Os subcultivos foram feitos três vezes por semana ou de acordo com a necessidade. As células em solução de azul de tripan 0,5% foram contadas em câmara de Neubauer e o conteúdo dividido em novas garrafas de cultura com novo meio.

4.1.1.6 Células U937

Linhagem de monócitos humanos proveniente da ATCC (CRL-1593.2) (Maryland, E.U.A.). Foram utilizadas para realização de ensaios de infectividade viral. Células U937 foram cultivadas em garrafas de cultura contendo meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SFB, gentamicina (50 µg/ml), penicilina potássica (200 U/mL) e anfotericina B (fungizona) (200 U/mL) e incubadas à 37°C, em atmosfera com 5% de CO₂. Os subcultivos foram feitos três vezes por semana ou de acordo com a necessidade. As células em solução de azul de tripan 0,5% foram contadas em câmara de Neubauer e o conteúdo dividido em novas garrafas de cultura com novo meio.

4.1.2 Vírus

4.1.2.1 APMV

O estoque inicial de APMV foi gentilmente cedido pelo Dr. Didier Raoult (Universite de La Mediterranee, França). Estoques virais posteriores foram produzidos e titulados, de acordo com a necessidade, em células de *A. castellanii*.

4.1.2.2 *Encephalomyocarditis virus*

O *Encephalomyocarditis virus* (EMCV) foi gentilmente cedido pelo Dr. Ian Kerr (Londres, Reino Unido) e os estoques virais já existentes no Laboratório de Vírus, obtidos em cultivo de fibroblastos de camundongos (células L-929), foram utilizados em ensaios de pesquisa de viroceptores e titulação de IFN.

4.1.2.3 *Vaccinia virus* amostra Western Reserve

O *Vaccinia virus* amostra Western Reserve (VACV-WR) foi gentilmente cedido pelo Dr. C. Jungwirth (Universitat Wurzburg, Alemanha). Os estoques virais existentes no Laboratório de Vírus, obtidos em cultivo de células Vero, foram utilizados. Este vírus foi utilizado como controle, por ser um vírus que sabidamente inibe o SI (PERDIGUERO e ESTEBAN, 2009).

4.1.2.4 *Parainfluenza virus 1 Mill Hill*

O *Parainfluenza virus 1 Mill Hill* (PIVMH) foi gentilmente cedido pelo Dr. C. Jungwirth (Universitat Wurzburg, Alemanha). Os estoques virais existentes no Laboratório de Vírus, obtidos em cultivo de células Vero, foram utilizados. Este vírus foi utilizado como controle, por ser um vírus que sabidamente induz IFN em PBMC (MARTINS, RODRIGUEZ DOS SANTOS e GOLGHER, 1989).

4.1.2.5 Apeu virus

O *Apeu virus* (APEUV) foi gentilmente cedido pelo Dr. Paulo César Peregrino Ferreira (Laboratório de Vírus, UFMG). Os estoques virais existentes no Laboratório de Vírus, obtidos em cultivo de células Vero, foram utilizados. Este vírus foi utilizado como controle, por ser um vírus sabidamente sensível a IFN em PBMC (ALMEIDA *et al.*, 2008).

4.1.3 Interferons

Neste estudo foram utilizadas alíquotas pré-tituladas de IFN alfa2A (IFNA2) e beta (IFNB1) recombinantes obtidos comercialmente (Bergamo e Rentschier Arzneimittel GmbH & Co, respectivamente).

4.2 Métodos

4.2.1 Multiplicação de APMV (La Scola *et al.*, 2003)

Para a produção de APMV, garrafas T75 contendo monocamada de amebas da espécie *A. castellanii* apresentando cerca de 80% de confluência foram inoculadas com o vírus na multiplicidade de infecção (m.o.i.) de 0,01. Para isto, o meio das garrafas foi descartado, e a solução viral (em PBS 1X) cuidadosamente adicionada sobre a monocamada. Após uma hora de adsorção, a monocamada foi adicionada de 25 mL de meio PYG 7% SFB. As garrafas contendo os inóculos virais foram mantidas a 32 °C, completamente vedadas. Após três dias de incubação, o

efeito citopático foi avaliado, e quando em torno de 90-100%, o sobrenadante e os fragmentos celulares foram coletados para purificação viral.

4.2.2 Purificação de APMV (La Scola *et al.*, 2003)

Para a purificação do vírus, após 90-100% de ECP, sobrenadante e lisado celular foram coletados, transferidos para tubos Falcon de 50 mL, e mantidos sob resfriamento. Após centrifugação a 900xg, por 5 minutos, à 4°C, o sobrenadante foi transferido para um outro tubo, e o sedimento foi submetido a 3 ciclos de congelamento e descongelamento, visando a liberação de partículas virais eventualmente contidas em trofozoítos não lisados. Ainda com este intuito, o lisado foi ressuspensionado em 5-10 mL de PBS 1X e então submetidos a 2 ciclos de lise no homogeneizador do tipo “Douncer” modelo (Wheaton, E.U.A) por 50 vezes. Em seguida, o sobrenadante e o sedimento foram filtrados em filtros de 2 micrômetros tipo (Millipore, E.U.A) para a retenção de lisado celular. Este filtrado foi então vagarosamente gotejado sobre 10 mL de uma solução de sacarose a 22% (Merck, Alemanha), em tubos próprios para a ultra centrífuga *Combi Sorvall Rotor AH-629va*. A amostra foi, então, ultra centrifugada a 14000 rotações por minuto (r.p.m), por 30 minutos, entre 4 °C e 8 °C, para a sedimentação do vírus. Por fim, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensionado em PBS 1X. As alíquotas do vírus foram identificadas e estocadas à -80 °C.

4.2.3 Curva de ciclo único em diferentes linhagens celulares

Células Raw 264.7, Jurkat e U937 foram implantadas em placas de 6 poços (1×10^6 células por poço) e infectados com solução viral de APMV inoculado no volume de 100 µL na m.o.i. de 10, em duplicata para cada tempo estabelecido. As placas foram incubadas à 37 °C, em atmosfera com 5% de CO₂. Após diferentes

períodos de infecção: 0; 0,5; 2; 4; 8; 18 e 24 horas, sobrenadante e células foram coletados e centrifugados a 900xg por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento resuspendido em PBS 1X, a partir do qual foi verificado o perfil de multiplicação viral por titulação em amebas pelo método de TCID₅₀.

4.2.4 Ensaios de infectividade viral em PBMC humanas

PBMC humanas implantadas em placas de 6 poços (1x10⁶ células por poço) foram infectados com solução viral de APMV inoculado no volume de 100 µL, em diferentes m.o.i (0,01; 0,1; 1 e 10), em duplicata para cada tempo estabelecido: 0; 0,5; 2; 4; 8; 18 e 24 horas. As placas foram incubadas à 37 °C, em atmosfera com 5% de CO₂. Após diferentes períodos de infecção: 0, 30 minutos, 2, 4, 8, 18 e 24 horas, sobrenadante e células foram coletados e centrifugados a 900xg por 5 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento resuspendido em PBS 1X, a partir do qual foi verificado o perfil de multiplicação viral por titulação em amebas pelo método de TCID₅₀.

4.2.5 Indução de mRNA de IFN do tipo I e ISG em PBMC humanas infectadas com APMV

As PBMC humanas foram adicionadas em placas de 6 poços (1x10⁶ células por poço) e infectadas com APMV (infectioso ou inativado por luz U.V.) ou PIVMH na m.o.i. 10, em duplicata para cada tempo estabelecido. As placas foram incubadas à 37 °C, em atmosfera com 5% de CO₂. Após 4, 8, 18 e 24 horas de infecção, sobrenadante e células foram coletados, centrifugados a 900xg por 5 minutos, à 4 °C. O sobrenadante foi coletado para posterior realização de ELISA e o sedimento submetido à extração de RNA celular total e RT-PCR, sendo o cDNA resultante

utilizado para verificar os níveis de mRNA de IFN do tipo I (*IFNA2* e *IFNB1*) e ISG (*Mx1* e *IFI6*) por PCR em tempo real.

4.2.6 Quantificação de proteínas de IFN do tipo I em sobrenadantes de PBMC humanas infectadas com APMV

Sobrenadantes de PBMC humanas infectadas com APMV ou PIVMH na m.o.i. 10 por 18 horas foram coletados e utilizados para detecção de proteínas de IFNA2 e IFNB1 por ELISA comercial. Os kits VeriKine™ Human Interferon Alpha Multi-Subtype ELISA (limite de detecção de 12.5 pg/ml) e Verikine™ Human IFN beta ELISA Kit (limite de detecção de 25 pg/ml) (PBL Interferon Source, Piscataway, NJ, E.U.A) foram utilizados de acordo com as instruções do fabricante.

4.2.7 Curva de ciclo único de APMV em PBMC humanas previamente tratadas com IFN do tipo I

As PBMC humanas foram adicionadas em placas de 6 poços (1×10^6 células por poço) e tratadas com 100 U de IFN recombinantes obtidos comercialmente, IFNA2 e IFNB1, por 18 horas, sendo incubadas à 37 °C, em atmosfera com 5% de CO₂. Após, as células foram infectadas com APMV na m.o.i. 10 em duplicata para cada tempo estabelecido e incubadas à 37 °C, em atmosfera com 5% de CO₂. Após diferentes períodos de infecção: 0, 30 minutos, 2, 4, 8, 18 e 24 horas, o sobrenadante e células foram coletados e centrifugados a 900xg por 5 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento resuspenso em PBS 1X, a partir do qual foi verificado o perfil de multiplicação viral por titulação em amebas pelo método de TCID₅₀.

4.2.8 Sensibilidade dose-resposta de APMV a IFN do tipo I

As PBMC humanas foram adicionadas em placas de 6 poços (1×10^6 células por poço) e tratadas com 10, 100 ou 500 U de IFN recombinantes obtidos comercialmente, IFNA2 e IFNB1 por 18 horas, incubadas à 37 °C, em atmosfera com 5% de CO₂. Após, as células foram infectadas com APMV na m.o.i. 10 em duplicata e incubadas a 37 °C, em atmosfera com 5% de CO₂ por 8 horas. Após o tempo de infecção, sobrenadante e células foram coletados e centrifugados a 900xg por 5 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento resuspendido em PBS 1X, a partir do qual foi verificado o perfil de multiplicação viral por titulação em amebas pelo método de TCID₅₀. VACV-WR e APEUV foram utilizados como controle, sendo utilizados na m.o.i 0,01 e 1.

4.2.9 Pesquisa de viroceptores em sobrenadantes de PBMC humanas infectadas com APMV.

Para investigar a presença de um possível viroreceptor em APMV, sobrenadantes de PBMC humanas infectadas com APMV e de células Vero infectadas com VACV-WR foram utilizados. Estes sobrenadantes foram inativados sob luz U.V. por 15 minutos e juntamente com IFNA2 (1/30.000 U) ou IFNB1 (1/80.000 U) foram diluídos em meio DMEM suplementado com 1% de SFB, na razão de dois. As amostras diluídas foram utilizadas para tratar células Vero cultivadas em placas de 96 poços com 90% de confluência. Dezoito horas após o tratamento, o meio foi descartado e as células infectadas com EMCV (10^4 TCID₅₀/mL) diluído 1:20.000. A infecção foi monitorada por 48 horas e a placas fixadas com formol 3,7% e coradas com cristal violeta 1% para a análise do resultado.

4.2.10 Fosforilação de STAT1 e 2 em PBMC humanas infectadas com APMV

As PBMC humanas foram infectadas com APMV (infeccioso ou inativado por U.V.) e PIVMH na m.o.i. 10 por 18 horas. Após o tempo de infecção, as células foram tratadas com 100 U de IFNA2 ou IFNB1 e incubadas à 37 °C por 10 ou 30 minutos. Após o período de tratamento, as células foram coletadas, lisadas com tampão *radio-immunoprecipitation assay* (RIPA) (Aprotinina 4,2 µg/mL; Leupeptina 4,2 µg/mL; PMSF 1 mM; NaVO3 1 mM; NaF 50mM; RIPA 1X e água q.s.p 5mL) e centrifugadas a 13.500 r.p.m por 15 minutos a 4 °C. A concentração de proteínas foi determinada utilizando-se o método colorimétrico de *Bradford*. 30 µg de extrato celular total por amostra foram fracionados por eletroforese em gel poliacrilamida/SDS (PAGE) 12% a 100 V por duas horas. Após o fracionamento, as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose, por uma hora a 100V (350miliamperes). Membranas foram bloqueadas a temperatura ambiente por 1 hora com PBS 1X contendo 5% de leite em pó desnatado e 0,1% de Tween 20. Após o bloqueio, as membranas foram lavadas três vezes com PBS Tween 0,1% e incubadas com anticorpo policlonal anti-Fosfo-Stat1 ou 2 (Tyr 701) de coelho (Cell signaling Technology, Beverly, MA) (1:1.000) ou anticorpo monoclonal anti-β-actina murino (Sigma, São Paulo, Brazil) (1:1.500), em PBS com 5% de albumina sérica bovino (BSA) e 0.1% de Tween 20 *overnight*. As membranas foram então lavadas três vezes com PBS Tween 0,1% e incubadas com o anticorpo secundário conjugado anti coelho ou anti-murino (1:1.000) diluído em PBS Tween 0,1% por uma hora. Após este tempo, as membranas foram lavadas mais três vezes com PBS Tween 0,1%. Bandas imunorreativas foram visualizadas usando um sistema de detecção de quimioluminescência aumentada, como descrito nas instruções do fabricante (GE Healthcare, Reino Unido).

4.2.11 Fosforilação dose-dependente de STAT1 e 2 em PBMC humanas infectadas com APMV

As PBMC humanas foram infectados com APMV na m.o.i. 10 e VACV-WR na m.o.i 0,01 por 18 horas. Após o tempo de infecção, as células foram tratadas com 1, 10, 100 U de IFNA2 ou IFNB1 e incubadas a 37 °C por 15 minutos. Após o tempo de tratamento as células foram coletadas e submetidas ao processo de extração de proteínas, seguido de Western-blot conforme descrito no item 4.2.10.

4.2.12 Extração de RNA total e transcrição reversa

A extração de RNA total foi feita a partir de alíquotas coletadas durante os experimentos com PBMC utilizando o kit *Rneasy* (Qiagen, Alemanha), de acordo com as recomendações do fabricante. O processo consistiu, resumidamente, nas seguintes etapas: lise celular e inativação de RNAses com tampão de guanidina; desnaturação e precipitação dos complexos protéicos com etanol 70% e passagem das amostras por uma coluna de afinidade, seguida de lavagens com tampões de lavagem e eluição do RNA extraído com água livre de nuclease. A obtenção de cDNA foi feita tendo como molde 1 µg de RNA extraído das culturas de células. As reações foram feitas utilizando-se a enzima MMLV (Promega, Madison, WI, USA), tampão 5X, dNTPs, oligo Dt e DTT nas concentrações indicadas pelo fabricante e água q.s.p para 20 µl de reação. O RNA e oligo dT foram incubados a 70 °C por 5 minutos e depois incubados em gelo por 5 minutos. Os outros componentes da reação foram adicionados e os tubos incubados a 42 °C por uma hora e a 72 °C por 15 minutos. O cDNA resultante foi diluído em 40 µl de água.

4.2.13 PCR em tempo real

O cDNA obtido com a reação de transcrição reversa foi utilizado como molde nas reações de PCR em tempo real. Estas foram feitas em placas de 48 poços, em duplicata, utilizando oligonucleotídeos específicos, SYBR Green Master Mix (Applied Biosystem, EUA) e água em concentrações ajustadas para 10 µl de reação. As reações foram feitas no aparelho StepOne (Applied Biosystem, EUA). Os resultados foram obtidos a partir de valores arbitrários dados a curva padrão e corrigidos utilizando normalização com os níveis do gene constitutivo beta actina.

Tabela 1. Sequências dos oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR em tempo real.

Oligonucleotídeo	Sequência <i>Foward</i>	Sequência <i>Reverse</i>
<i>Beta-actina</i>	TGACGGGGTCACCCACACTGTGCC	CTAGAAGCATTTGCGGTGGAC GATGG
<i>IFNA2</i>	TTGACCTTTGCTTTACTGGT	CACAAGGGCTGTATTTCTTC
<i>IFNB1</i>	CCTGTGGCAATTGAATGGGAGGC	CAGGTAGATGGTATAGCGTGG
<i>Mx1</i>	ATCCTGGGATTTTGGGGCTT	CCGCTTGTCGC TGGTGTGC
<i>IFI6</i>	CATGCGGCAGAAGGCGGTAT	CGACGGCCATGAAGGTCAGG

4.2.14 Titulação de APMV (La Scola *et al.*, 2003)

Placas de 96 poços com 4×10^4 trofozoítos de amebas por poço foram utilizadas para titulação de APMV pelo método de TCID₅₀ (REED e MUENCH, 1938). As amostras a serem tituladas sofreram três ciclos de congelamento e descongelamento com nitrogênio líquido, em seguida foram centrifugadas a 900xg por 5 minutos, a 4 °C. O sobrenadante foi diluído seriadamente em PBS 1X, na razão de 10 (10^{-1} A 10^{-11}). Um total de 50 µL de cada diluição foi inoculado em cada poço, em quadruplicata. As placas foram completamente vedadas, incubadas à 32 °C e a infecção monitorada por até quatro dias para observação de efeito citopático e cálculo do título (REED e MUENCH, 1938).

4.2.15 Titulação de APEUV e VACV-WR

As amostras de PBMC humanas infectadas com APEUV e VACV-WR foram tituladas pelo método de PFU. As amostras foram submetidas a três ciclos de congelamento e descongelamento e diluídas na razão de 10 (de 10^{-1} a 10^{-5}) em meio DMEM 0% SFB, e 400 µl de cada diluição foram utilizados para infectar células Vero em placas de 6 poços. Após uma hora de adsorção, o meio das culturas de células foi completado com 2 mL de DMEM 2% SFB. As células foram incubadas a 37°C em ambiente com 5% de CO₂ até se verificar o aparecimento de placas de lise viral nos controles de vírus. Neste momento as células foram fixadas com formol 3,7%, coradas com cristal violeta 1% e os títulos virais determinados pela contagem das placas de lise de cada amostra.

V. RESULTADOS

5.1 APMV é capaz de se multiplicar em PBMC humanas

Estudos recentes demonstram a capacidade de APMV multiplicar-se em células fagocitárias humanas e murinas (GHIGO *et al.*, 2008). Neste trabalho, foi verificada a permissividade de PBMC humanas à infecção por APMV pela primeira vez. Pools de PBMC humanas foram infectados com APMV em diferentes m.o.i. (0,01; 0,1; 1 e 10). Após os tempos de infecção, as células foram coletadas e processadas para realização da titulação do vírus em monocamada de amebas pelo método de TCID₅₀. Os resultados obtidos demonstraram a capacidade de APMV multiplicar-se nestas células, gerando uma infecção produtiva. Para todas as m.o.i testadas, foi possível verificar aumento no título viral quatro horas após infecção, sendo este mantido por até 24 horas (Figura 10). Sendo assim, para os experimentos seguintes a m.o.i. de 10 foi selecionada, na tentativa de manter o maior número de células possíveis estimuladas.

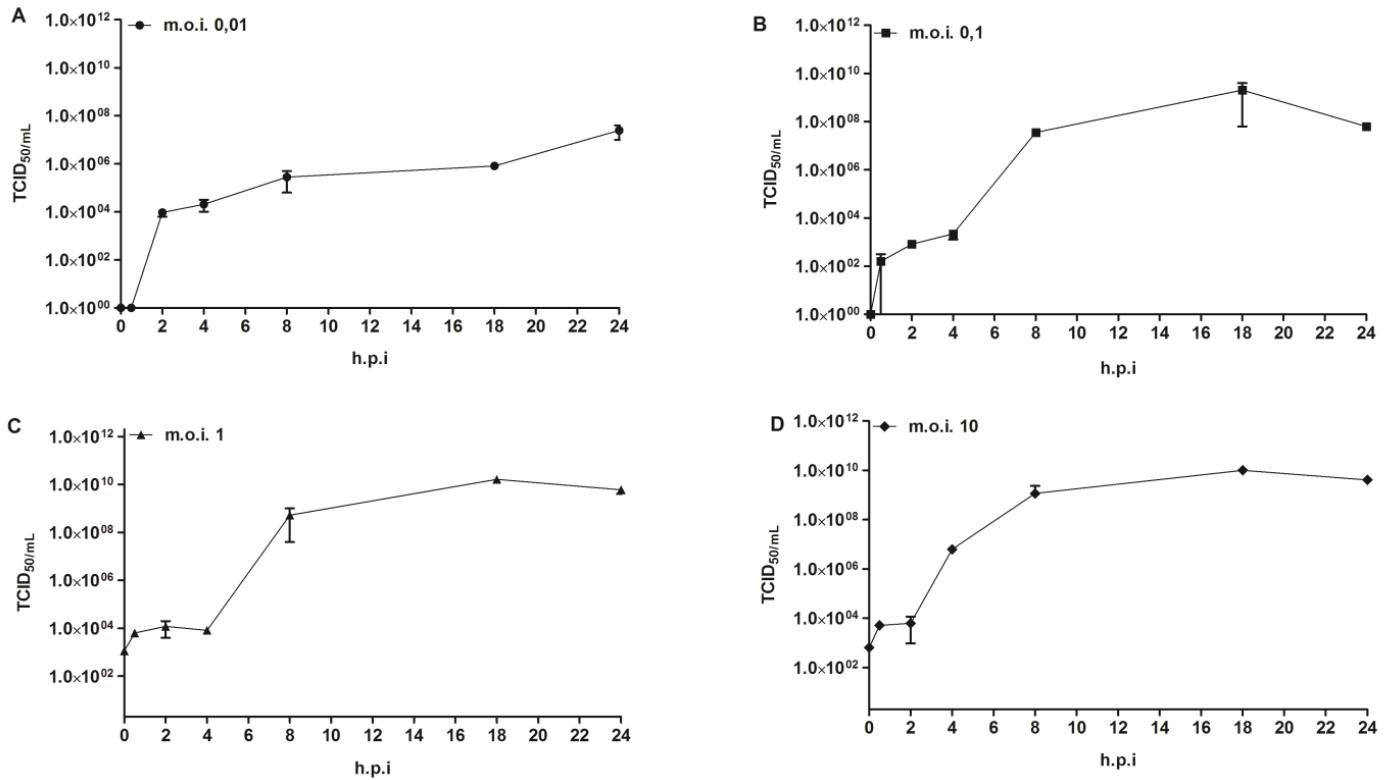


Figura 10: Multiplicação de APMV em PBMC humanas. PBMC humanas foram infectadas com APMV em diferentes m.o.i. por até 24 horas. A infectividade das partículas virais foi avaliada por titulação em amebas. (A) m.o.i. 0,01; (B) m.o.i. 0,1; (C) m.o.i. 1; (D) m.o.i. 10. Em todas as m.o.i. testadas, APMV mostrou um aumento no crescimento viral após 4 horas de infecção, sendo este mantido até 24 horas.

5.2 Multiplicação de APMV em diferentes linhagens celulares

Devido a composição celular heterogênea de PBMC e na tentativa de confirmar estudos anteriores (GHIGO *et al.*, 2008), optou-se por verificar a susceptibilidade de linhagens contínuas a APMV. Foram utilizadas linhagens de macrófagos Raw 264.7, monócitos U937 e linfócitos Jurkat, clone E6-1. As células foram infectadas com APMV na m.o.i. 10 e após os tempos de infecção, foram coletadas e processadas para realização da titulação viral em monocamada de amebas pelo método de TCID₅₀. Os resultados obtidos demonstraram a capacidade de APMV multiplicar-se em células Raw 264.7 e U937, gerando uma infecção produtiva (Fig. 11 A e B), ao contrário de células Jurkat, que não se mostrou permissiva ao vírus (Fig. 11C).

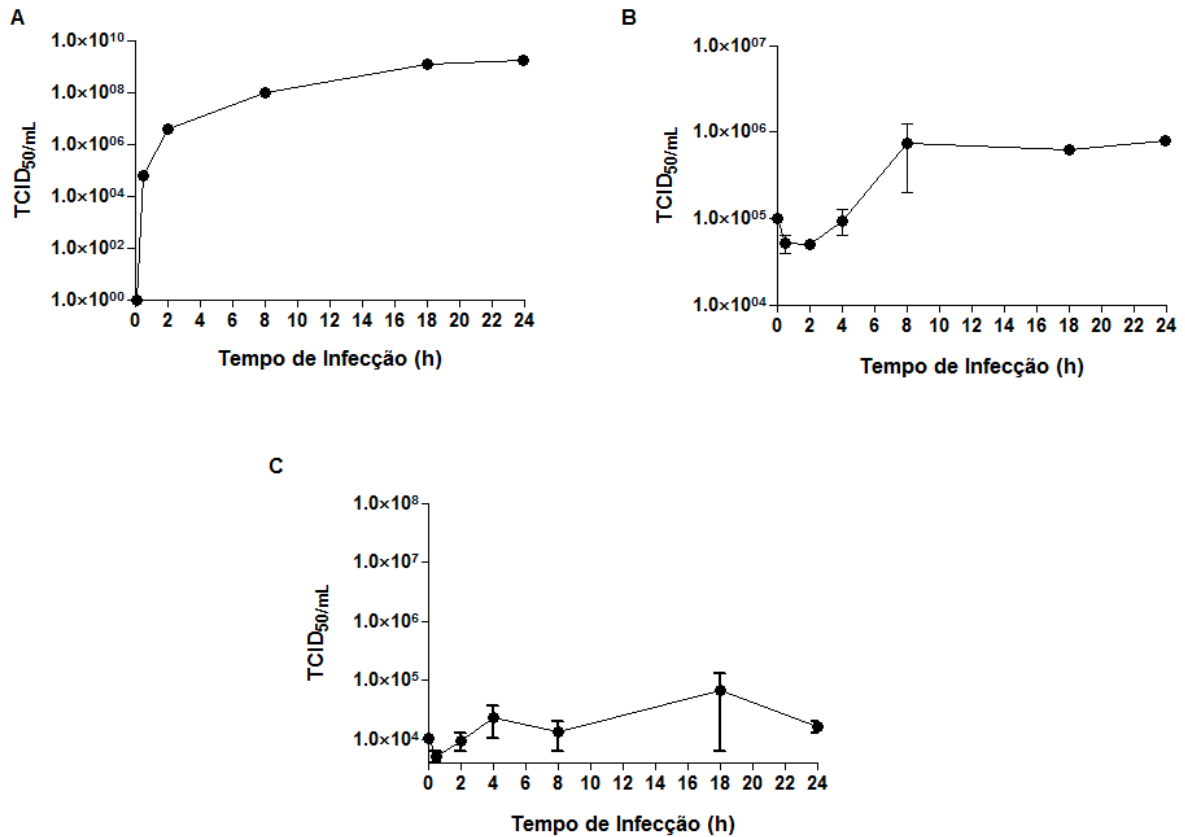


Figura 11: Multiplicação de APMV em linhagens contínuas. Células Raw 264.7, U937 ou Jurkat foram infectadas com APMV na m.o.i. de 10 por até 24 horas. A infectividade das partículas virais foi avaliada por titulação em amebas, sendo Raw 264.7 e U937 permissivas a APMV, enquanto em células Jurkat o vírus não foi capaz de se multiplicar. (A) Multiplicação do vírus em Raw 264.7. (B) Multiplicação do vírus em U937. (C) Multiplicação do vírus em Jurkat, clone E6-1.

5.3 APMV induz a expressão de mRNA de *IFNA2* e *IFNB1* em PBMC humanas infectadas por 18 horas

Uma resposta comum do hospedeiro a infecção viral é a expressão de IFN do tipo I, sendo assim foi verificada a capacidade de APMV induzir a expressão destas citocinas em PBMC humanas. Pools destas células foram infectados com APVM ou PIVMH na m.o.i. 10 e através de PCR em tempo real não foi verificada a expressão

de mRNA de *IFNA2* e *IFNB1* em células infectadas por tempos precoces. Todavia, mRNA destas citocinas foram detectados após 18 horas de infecção, assim como observado em PBMC infectadas com PIVMH, e em contraste com o controle de células (Figura 12A e B). A quantificação de mRNA através de ensaios de PCR em tempo real foi corroborada com os resultados obtidos pelos ensaios de ELISA, através dos quais foi possível quantificar as proteínas de IFN do tipo I presentes em sobrenadantes de PBMC humanas infectadas por 18 horas (Figura 12C e D).

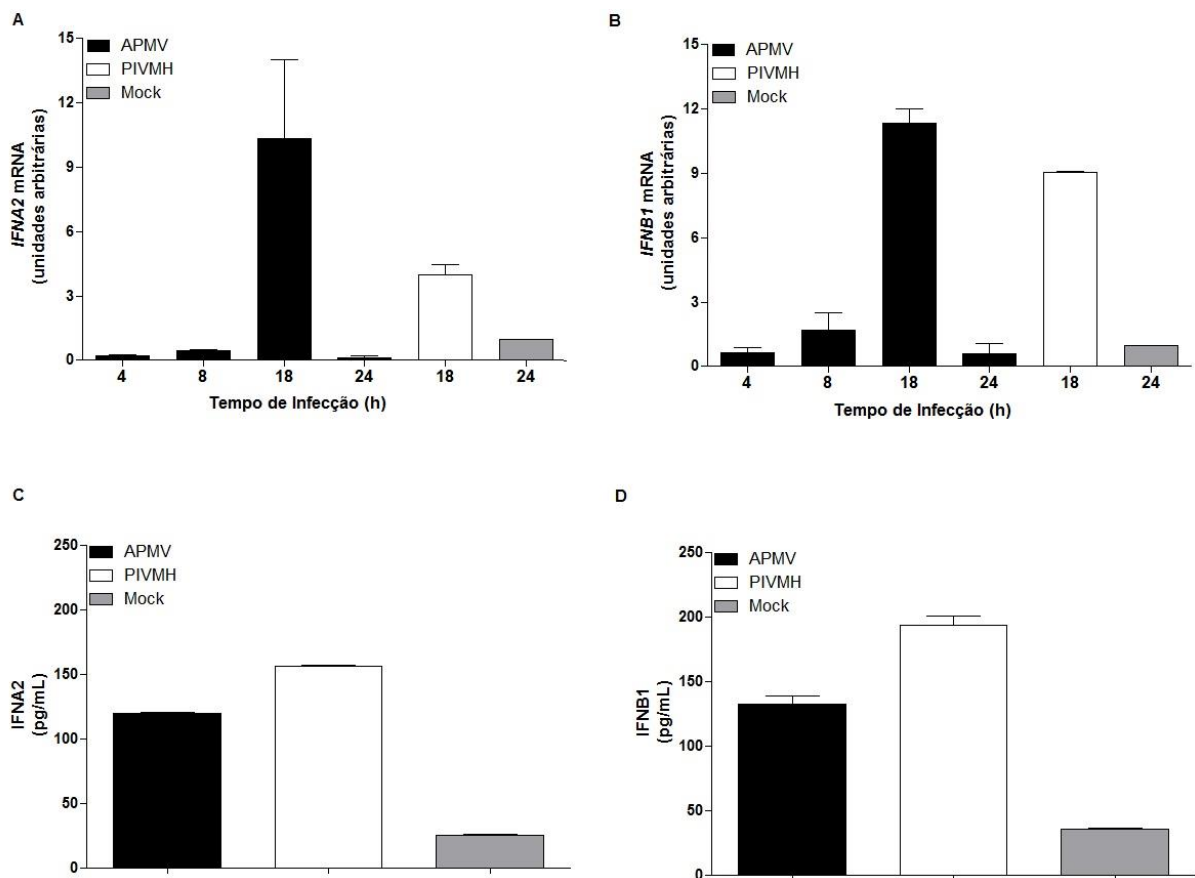


Figura 12: Indução de IFN do tipo I em PBMC humanas infectadas com APMV.

PBMC humanas foram infectadas com APMV na m.o.i. de 10. Após os diferentes tempos de infecção, as células foram coletadas, submetidas à extração de RNA total, transcrição reversa, sendo o cDNA resultante aplicado como molde em PCR em tempo real. Em paralelo, o sobrenadante das células infectadas foi utilizado para quantificação de proteínas através de Elisa. (A) Quantificação de mRNA de *IFNA2*. (B) Quantificação de mRNA de *IFNB1*. (C) Quantificação de proteínas de IFNA2. (D) Quantificação de proteínas de IFNB1. Os resultados de PCR em tempo real mostraram a expressão de mRNA de IFN do tipo I em células infectadas com APMV por 18 horas e não em tempos mais precoces, assim como a quantificação de proteínas através do Elisa.

5.4 APMV infeccioso não induz a expressão de mRNA de ISG em PBMC humanas, enquanto APMV inativado por luz U.V. induz

Uma vez expressos, os IFN levam a indução de diversos ISG que irão promover a ação antiviral de diferentes formas. Para verificar se os IFN do tipo I induzidos por APMV em PBMC humanas após 18 horas de infecção seriam capazes de induzir ISG, pools destas células foram infectados com APMV ou PIVMH na m.o.i. 10. Não houve detecção de mRNA de dois diferentes ISG, *MX1* e *IFI6* em PBMC infectadas com APMV por diferentes tempos, mesmo 18 horas. Ao contrário, foi possível detectar altos níveis de expressão destes genes em células infectadas com PIVMH, cerca de 100 vezes mais em relação a APMV. Já os ensaios de PCR em tempo real feitos a partir de PBMC infectadas com APMV inativado por luz U.V. indicaram que nessas condições as células foram capazes de induzir a expressão de mRNA dos dois ISG em todos os tempos testados, em níveis comparáveis a PIMVH. APMV inativado induz cerca de 150 vezes mais a expressão de mRNA de *MX1* em relação ao vírus infeccioso. Para *IFI6* os níveis observados são menores, porém chegam a ser cerca de 100 vezes mais após 8 horas de infecção. (Fig. 13).

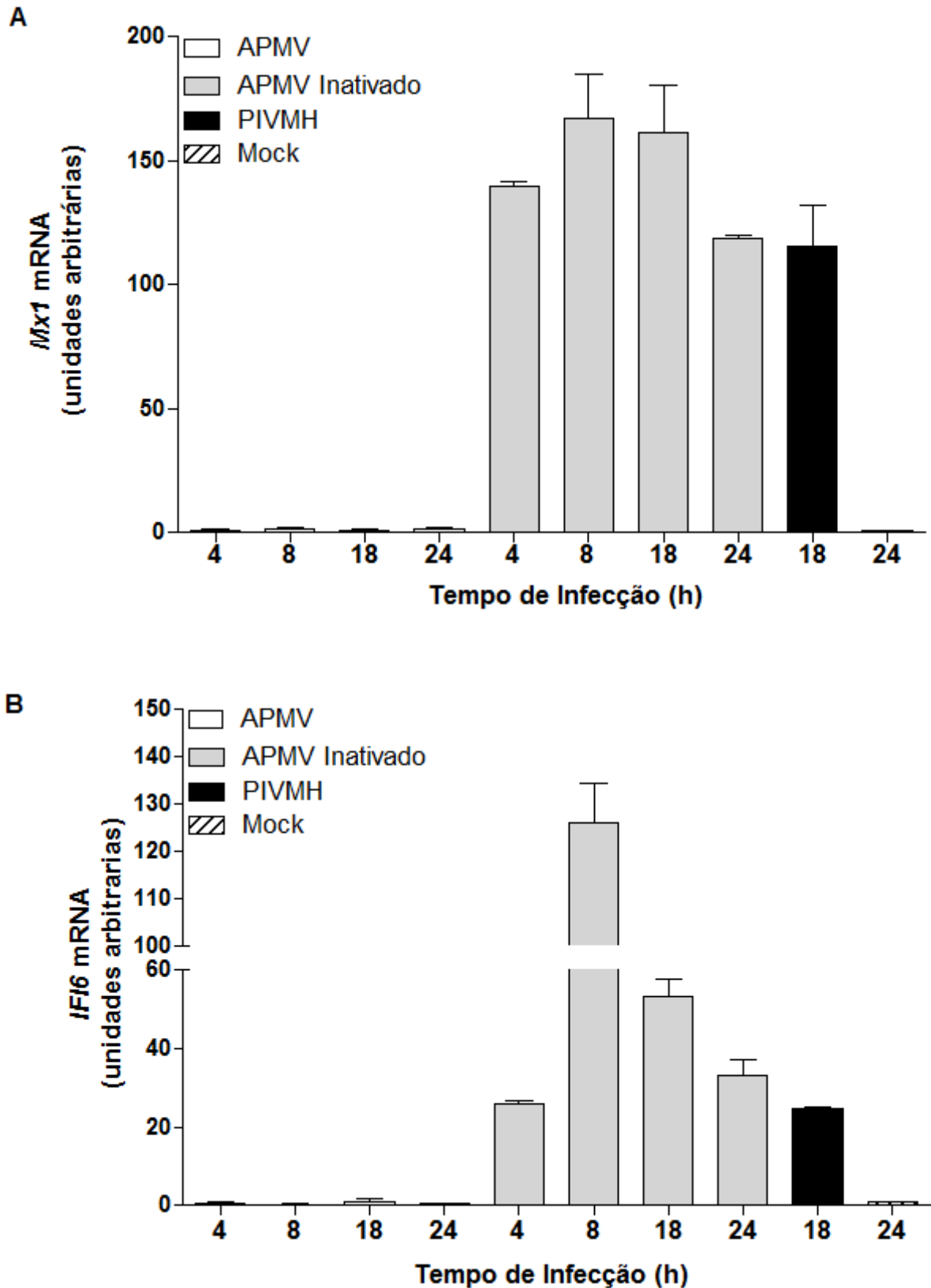


Figura 13: Perfil de expressão de mRNA de *MXI* e *IFI6* em PBMC humanas infectadas com APMV infeccioso ou inativado por luz U.V. PBMC humanas foram infectadas com APMV infeccioso ou inativado por luz U.V. na m.o.i. de 10. Após os diferentes tempos

de infecção, as células foram coletadas, submetidas à extração de RNA total, transcrição reversa, sendo o cDNA resultante aplicado como molde em PCR em tempo real. (A) Quantificação de *MX1*.

(B) Quantificação de *IFI6*. PBMC humanas infectadas com partículas viáveis de APMV não apresentaram expressão de mRNA de *MX1* e *IFI6*. Já em PBMC infectadas com APMV inativado sob luz U.V., houve expressão de altos níveis de expressão de ISG.

5.5 APMV é sensível à ação antiviral de IFNB1, mas resiste ao tratamento com IFNA2 em PBMC humanas

PBMC foram tratadas por 18 horas com 100 U de IFNA2 ou IFNB1 e após este tempo as células foram infectadas com APMV na m.o.i. 10. Verificou-se que APMV foi capaz de multiplicar-se normalmente em células tratadas com IFNA2, de forma semelhante ao observado em células não tratadas (Fig. 10D), enquanto o tratamento com IFNB1 inibiu a multiplicação de APMV nestas células. Na tentativa de verificar se a sensibilidade de APMV aos IFN do tipo I seria dose-dependente um segundo experimento foi realizado, no qual as células foram tratadas com diferentes doses de IFNA2 e IFNB1, 10, 100 e 500 U por 18 horas e posteriormente infectadas com APMV por 8 horas. O resultado obtido foi correlacionado com aquele verificado com a curva de ciclo único do vírus em células pré-tratadas com IFN (Fig. 14A), mesmo em uma dose mais alta o vírus foi capaz de se multiplicar em PBMC tratadas com IFNA2, porém, teve o título diminuído significativamente em células tratadas com IFNB1 (Fig. 14B e C).

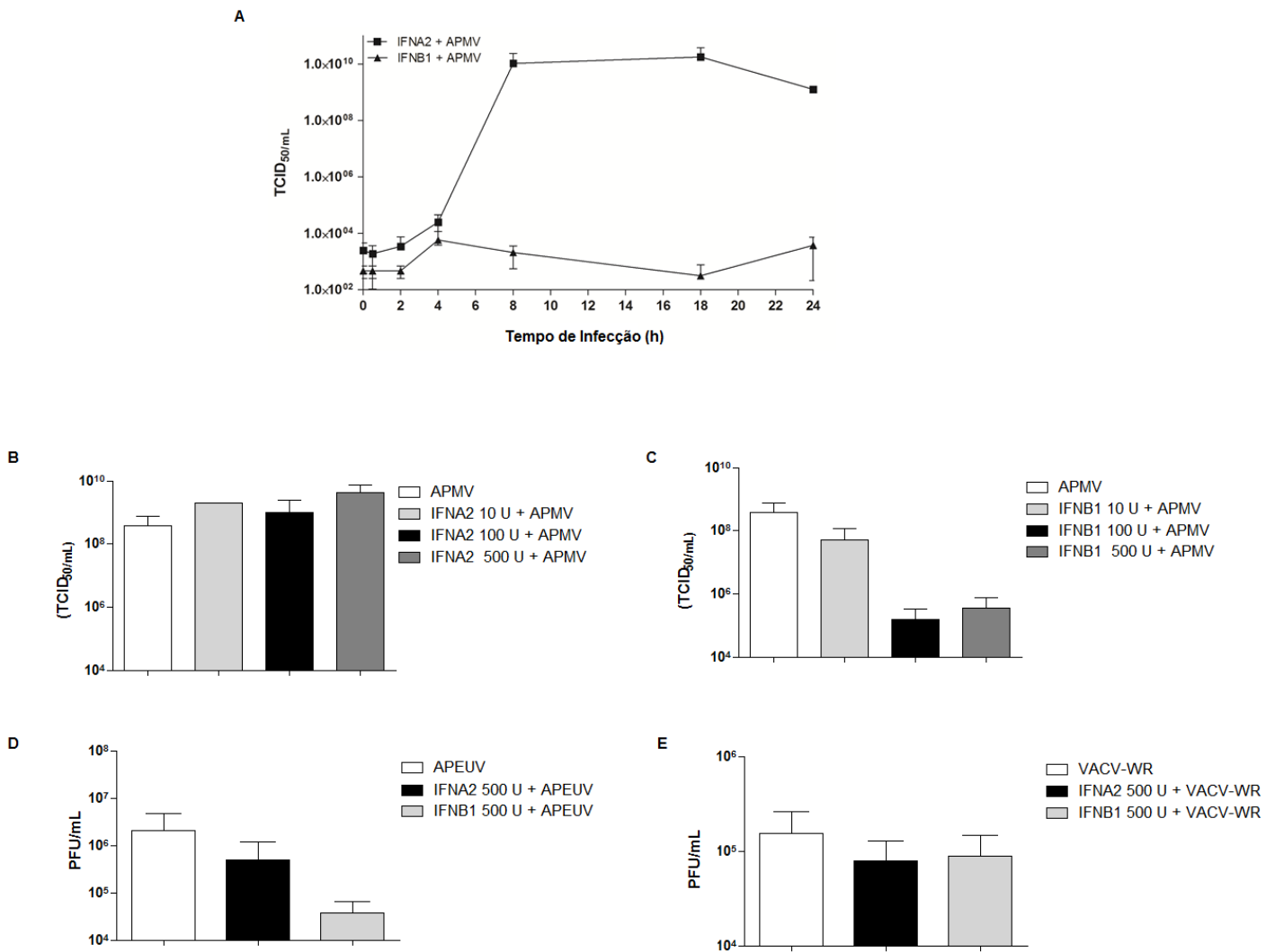


Figura 14: Atividade antiviral de IFN do tipo I contra APMV. PBMC humanas foram tratadas com diferentes doses de *IFNA2* ou *IFNB1* por 18 horas e em seguida infectadas com APMV, APEUV ou VACV-WR. A infectividade das partículas virais foi avaliada por titulação. (A) Curva de ciclo único de APMV em PBMC pré-tratadas com *IFNA2* ou *IFNB1* mostra que *IFNB1* é capaz de inibir a multiplicação viral, enquanto *IFNA2* não é. (B) *IFNA2* não é capaz de proteger as células da infecção por APMV, mesmo em doses elevadas. (C) A inibição da multiplicação de APMV por *IFNB1* ocorre de uma maneira dose-dependente. (D e E) Multiplicação de APEUV e VACV-WR em PBMC pré-tratadas com IFN do tipo I.

5.6 APMV não contém viroceptores solúveis contra *IFNA2* e *IFNB1*

Os resultados iniciais indicaram que APMV possui algum mecanismo de inibição da atividade biológica de IFN. Na tentativa de elucidar este mecanismo,

optou-se por pesquisar a presença de viroceptores em APMV, receptores solúveis presentes inclusive em VACV, outro vírus gigante. Para isso, células Vero foram tratadas com sobrenadantes de células infectadas com APMV ou VACV-WR inativados por luz U.V. e incubados com IFN por 18 horas. Após este tempo, as células foram infectadas com EMCV. Células tratadas apenas com IFN ou sobrenadante de controle de células incubado com IFN foram capazes de proteger as células contra a infecção por EMCV. Como esperado, sobrenadantes de células infectadas com VACV aboliram a atividade biológica de IFN, indicando a presença de viroceptores neste sobrenadante. Já os sobrenadantes de células infectadas com APMV e incubados com IFN não inibiram a atividade dos IFN neste sistema, fornecendo evidência de que APMV não contém viroceptores contra IFN do tipo I em seu genoma (Fig. 15), sendo seu mecanismo de inibição da atividade de IFN provavelmente intracelular.

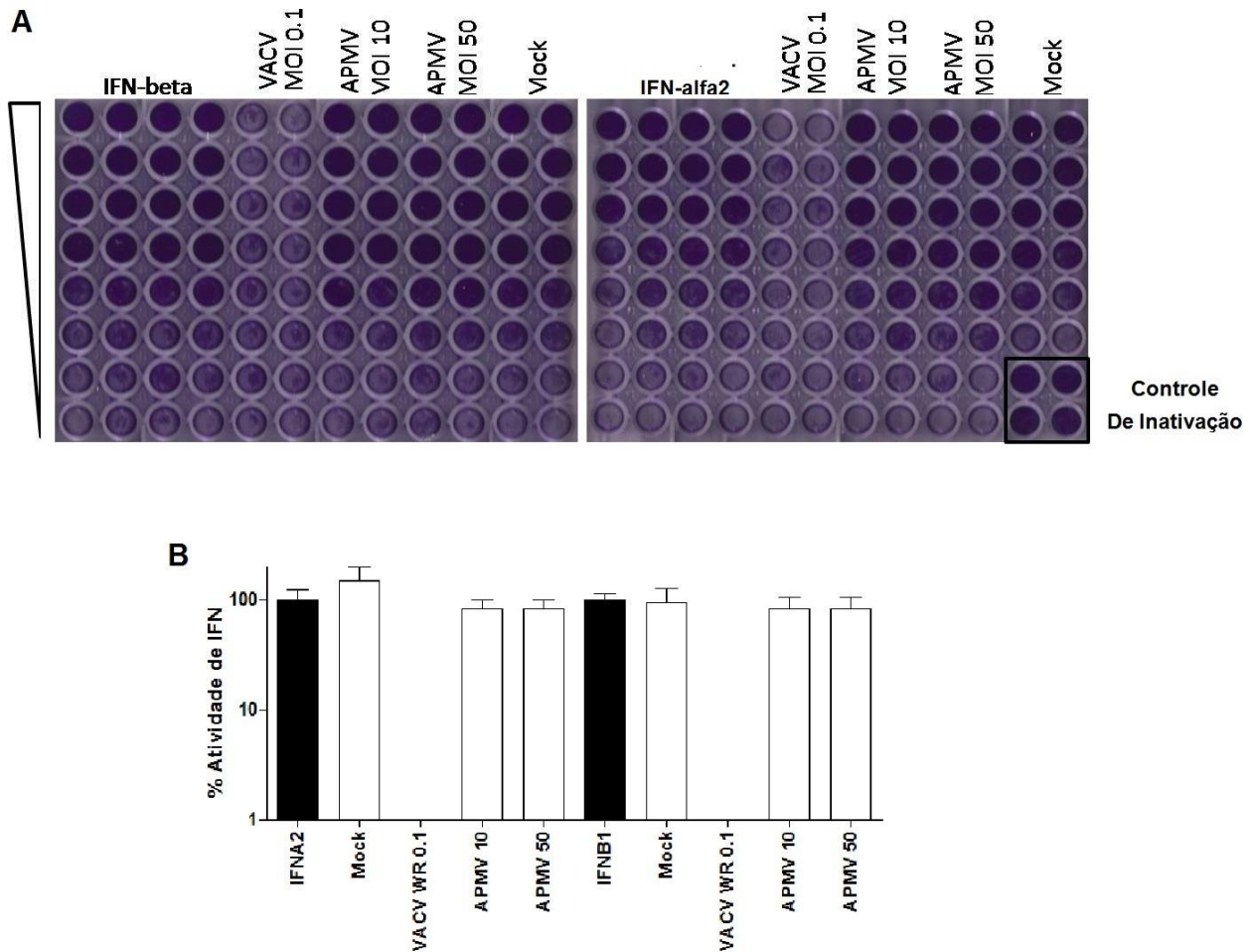


Figura 15: APMV não contém viroceptores contra IFNA2 e IFNB1. (A) Células Vero foram tratadas com sobrenadantes de PBMC infectadas com APMV, incubadas com IFN do tipo I por 18 horas e em seguida desafiadas com EMCV. EMCV foi capaz de infectar as células, mostrando que APMV não interfere com a atividade antiviral dos IFN do tipo I, logo, não apresenta viroceptores em seu genoma (B) Atividade dos IFN do tipo I contra EMCV expressa em porcentagem.

5.7 A inibição da expressão de ISG por APMV não é mediada pelo bloqueio da fosforilação de STAT1 e 2

STAT1 é um componente da via de sinalização de IFN importante para permitir a indução de ISG. Para determinar se a fosforilação de STAT1 poderia estar alterada em PBMC humanas infectadas com APMV e PIVMH, foi realizado um Western-blot a partir de células infectadas por 18 horas e posteriormente submetidas

a um rápido tratamento (10 ou 30 minutos) com 100 U de IFNA2 ou IFNB1. Foi verificado que houve fosforilação de STAT1 em células infectadas e não infectadas tratadas com IFN, enquanto nenhuma fosforilação foi verificada em células não tratadas com IFN e não infectadas (Fig 16). Para verificar se a fosforilação de STAT1 seria dependente da dose de IFN utilizada, foi realizado um segundo experimento, no qual também foi verificada a fosforilação de STAT2, que junto com o primeiro, forma um complexo importante para regular a transcrição de ISG. PBMC infectadas com APMV e VACV-WR por 18 horas foram tratados por 15 minutos com 1, 10 ou 100 unidades de cada IFN do tipo 1, IFNA2 ou IFNB1. Novamente foi observada a fosforilação de STAT1 nas diferentes condições, mostrando um padrão dose-dependente (Fig. 17A). O mesmo resultado foi observado para STAT2 (Fig. 17B).

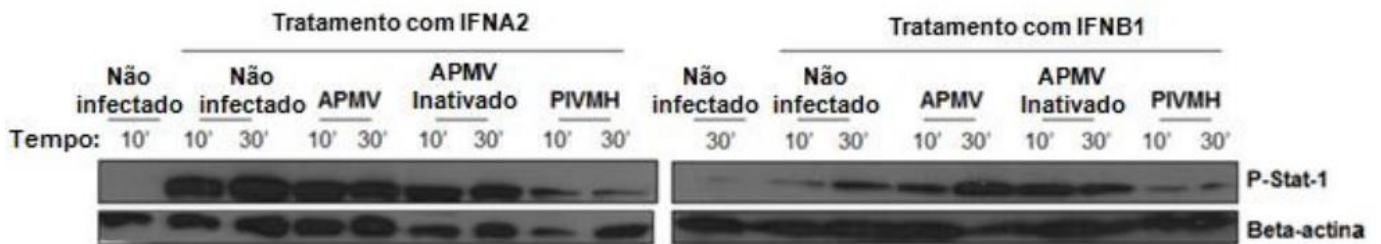


Figura 16. Infecção de PBMC humanas por APMV não altera a fosforilação de STAT1 por IFN do tipo I. PBMC humanas infectadas por APMV por 18 horas foram tratadas por 10 ou 30 minutos com 100U de *IFNA2* ou *IFNB1* e o nível de fosforilação de STAT1 foi verificado por western-blot. Foi possível verificar um nível de fosforilação semelhante entre células infectadas e não infectadas tratadas com IFN.

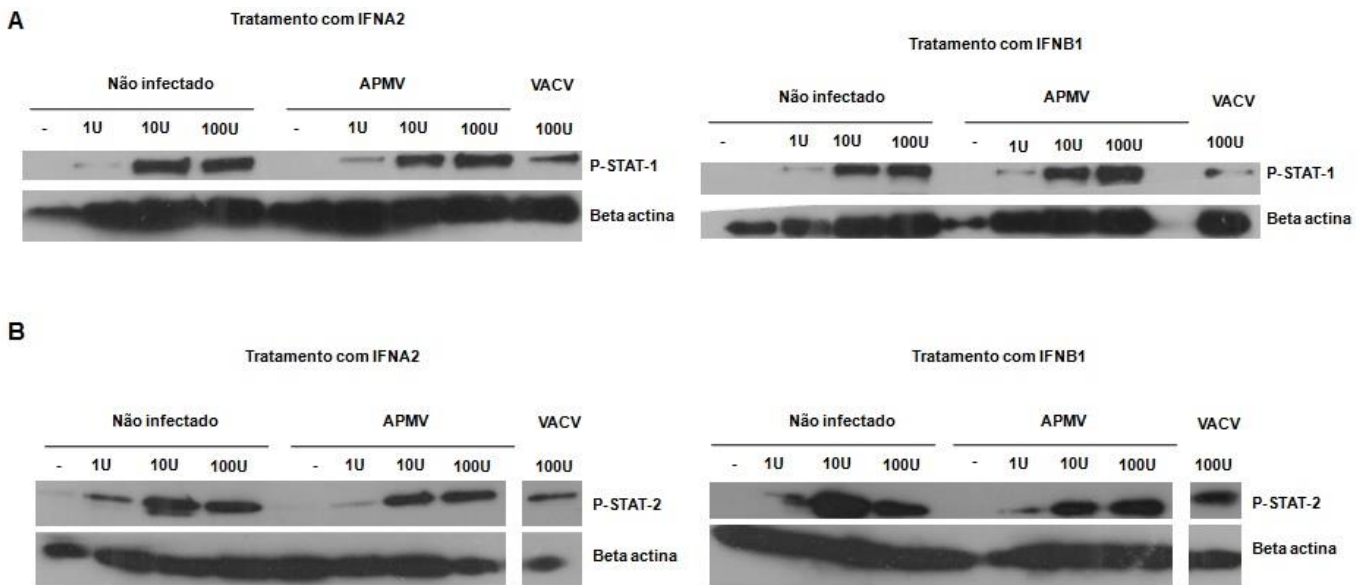


Figura 17. Fosforilação de STAT1 e 2 ocorre de maneira dose-dependente de IFN do tipo I em PBMC infectadas com APMV. PBMC humanas infectadas por APMV por 18 horas foram tratadas por 15 minutos com diferentes doses de *IFNA2* ou *IFNB1* e o nível de fosforilação de STAT1 e 2 foi verificado por western-blot. (A) Perfil de fosforilação de STAT1. (B) Perfil de fosforilação de STAT2. Foi possível verificar um nível de fosforilação com caráter dose-dependente em células infectadas com APMV.

VI. DISCUSSÃO

Sabe-se que a produção de IFN é uma importante arma do sistema imunológico do hospedeiro vertebrado contra infecções virais, embora os mecanismos de evasão por parte dos vírus permitam que este continue se multiplicando com sucesso (LAROCQUE *et al.*, 2011; SAMARAJIWA *et al.*, 2009). A recente investigação dessas estratégias evolutivas levou não só ao conhecimento a cerca das defesas imunológicas, mas também para *insights* sobre a origem e evolução das relações vírus-hospedeiro (PERDIGUERO e ESTEBAN, 2009). Neste contexto, o presente estudo traz novos dados a cerca da relação do vírus gigante APMV e o sistema interferon.

Resultados prévios evidenciaram a capacidade de APMV se multiplicar em células fagocitárias (GHIGO *et al.*, 2008). No entanto, neste trabalho, pela primeira vez foi demonstrado que APMV é capaz de se multiplicar em PBMC humanas (Fig. 10). Neste trabalho, optou-se por trabalhar com PBMC e não com as subpopulações celulares purificadas, na tentativa de mimetizar as condições do sistema imune hospedeiro o máximo possível e preservar assim a interação entre vírus e cada tipo celular presente neste tipo de amostra. Uma vez que PBMC correspondem a uma população heterogênea de células, formada por monócitos, linfócitos e células dendríticas, investigamos também a susceptibilidade de linhagens monocíticas, macrofágicas e de linfócitos ao APMV (Fig. 11). Nossos resultados indicam que o vírus é capaz de multiplicar em algumas destas células, corroborando com estudos que demonstram que células fagocitárias são permissivas ao APMV (GHIGO *et al.*, 2008).

Como seria de se esperar de uma partícula viral gigante, os resultados encontrados também revelaram que APMV é capaz de estimular o sistema imune inato de vertebrados levando a produção de IFN do tipo I em PBMC humanas. Os ensaios de PCR em tempo real, feitos para avaliar a expressão de mRNA de IFN tipo I, permitiram a detecção de IFNA2 e IFNB1 após 18 horas de infecção das células com APMV. Esta detecção é consistente com o observado para o controle positivo, células infectadas com PIVMH, um vírus sabidamente capaz de induzir IFN

em PBMC (MARTINS, RODRIGUEZ DOS SANTOS e GOLGHER, 1989) (Fig. 12A e B). Os níveis de proteínas de IFNA2 e IFNB1 também foram detectados em sobrenadantes de PBMC infectadas com APMV e PIVMH por 18 horas por meio de um ensaio de ELISA, o que confirma que estas citocinas são de fato secretadas pelas células infectadas (Fig. 12C e D). Estes resultados indicaram que APMV além de se multiplicar em PBMC humanas, foi reconhecido como outro patógeno qualquer, induzindo uma resposta imune. APMV é um vírus que apresenta uma estrutura complexa, protegendo o seu genoma de DNA há um capsídeo formado por múltiplas camadas, membranas internas, fibras externas e componentes químicos que se assemelham a componentes bacterianos (XIAO *et al.*, 2009). Este tipo de estrutura pode hipoteticamente ser reconhecido por mais de um PRR de superfície ou intracelular, por exemplo.

Todavia, embora APMV induza a produção de IFN do tipo I em PBMC humanas não houve detecção de níveis consideráveis de mRNA de dois ISG analisados, *MX1* e *IF6l*, em células infectadas com APMV (Fig. 13). *MX1* é considerado um marcador da atividade de IFN, porque não é induzido por outros estímulos além destas citocinas (HOLZINGER *et al.*, 2007). O mesmo parece ser verdade para *IF6l*. Considerando-se as células infectadas por PIVMH, estes genes foram induzidos pelos IFN produzidos como resposta ao reconhecimento viral, já no caso das células infectadas com APMV, houve produção de IFN, mas estas moléculas não foram capazes de promover a indução de ISG, levando a hipótese de que APMV é capaz de inibir a sinalização de IFN por algum mecanismo ainda desconhecido. Já em PBMC infectadas com APMV inativado por luz U.V., mRNA de *MX1* e *IF6l* foram normalmente detectados, revelando que o possível mecanismo de inibição de ISG por APMV depende de multiplicação viral (Fig. 13).

Além de revelar a capacidade de APMV interagir com a atividade biológica de IFN, também foi verificada a ação antiviral de IFN do tipo I contra APMV em PBMC humanas. Foi visto que células tratadas com IFNA2 foram normalmente infectadas por APMV, de uma maneira independente da dose utilizada, uma vez que mesmo em células tratadas com 500 U de IFN, o vírus foi capaz de se multiplicar. Por outro lado, IFNB1 foi capaz de inibir a multiplicação de APMV em dose igual ou maior a 100 U e não na dose de 10 U, logo, sua atividade antiviral contra APMV mostrou ser

dose-dependente (Fig. 14). A redução significativa nos títulos de APMV em células tratadas com IFNB1 indica que as células de vertebrados são capazes de estabelecer uma resposta biológica eficaz contra a infecção por APMV. Há dados na literatura que mostram que IFNB1 é mais potente do que outros IFN do tipo I nas suas atividades biológicas. Os mecanismos por trás dessa atividade diferencial ainda não estão bem estabelecido, mas dependem de regulação de ISG, afinidades de ligação diferencial de cada subtipo de IFN com a cadeia IFNAR1 do receptor celular de IFN do tipo I, densidade do receptor celular e por uma atividade de *feedback* negativo mediada pelo ISG USP18 (HOLZINGER *et al.*, 2007; MORAGA *et al.*, 2009). Recentemente, foi também demonstrado que IFN beta, mas não outros IFN do tipo I, é capaz de sinalizar utilizando apenas a cadeia IFNAR1 do receptor de IFN do tipo I. Ao fazer isso, IFN beta regula um conjunto distinto e exclusivo de genes diferentes dos ISG clássicos, por vias de sinalização ainda desconhecidas. Uma hipótese é que talvez um desses genes regulados preferencialmente por IFN beta seja responsável pela atividade antiviral mais potente deste IFN contra APMV (DE WEERD *et al.*, 2013). Sabe-se também que o gene IRG1, que atua em macrófagos durante processos infecciosos codifica uma enzima capaz de produzir o ácido itacônico, um metabólito com ação antimicrobiana. Através de estratégia de silenciamento deste gene, foi visto que células fagocitárias silenciadas levavam a uma redução na produção do ácido e conseqüentemente menor atividade antimicrobiana frente a patógenos conhecidos. Sendo assim, IRG1 parece ter papel importante na resposta imune conduzida por macrófagos (MICHELUCCI *et al.*, 2013). Sabe-se que IRG1 é 73 vezes mais expresso em camundongos sem a cadeia IFNAR2 do receptor de IFN do tipo I e tratados com IFN beta, sendo, portanto induzido exclusivamente por IFN beta em condições específicas (DE WEERD *et al.*, 2013). Portanto IRG1 é um potencial candidato a responsável pela atividade antiviral mediada por IFNB1, mas estudos mais refinados são necessários para confirmar esta hipótese. Uma vez que uma infecção com APMV se inicia em uma célula previamente tratada com IFN, o(s) mecanismo(s) de evasão codificado(s) pelo vírus poderiam possibilitar a inibição da resposta mais fraca de IFNA2, mas não seria suficiente para agir contra a forte ação antiviral de IFNB1. Esta é uma indicação de que o sucesso na resposta antiviral contra APMV *in vivo* é IFNB1-dependente. Os vírus utilizados como controle, VACV-WR e APEUV foram respectivamente

resistente e sensível aos IFN do tipo I, como esperado (ALMEIDA *et al.*, 2008; PERDIGUERO e ESTEBAN, 2009).

Com os primeiros resultados deste trabalho foi possível sugerir a cerca de mecanismos de evasão do sistema imune por APMV. Tais mecanismos poderiam ter como alvo a inibição de ISG e ser mediados por interferência com a ligação do IFN aos seus receptores celulares ou por meio da inibição das vias de sinalização intracelulares desencadeadas pela produção de IFN. Já foi descrito que vírus da família *Poxviridae*, como VACV, por exemplo, codificam viroceptores solúveis em seu genoma que possuem essa função de imunomodulação. Estas moléculas são secretadas por células infectadas e se ligam com alta afinidade ao IFN no meio extracelular, abolindo assim a sua capacidade de se ligar ao seu receptor celular específico e, conseqüentemente, inibindo a ativação ISG (SYMONS, ALCAMÍ e SMITH, 1995, MANN *et al.*, 2008; WAIBLER *et al.*, 2009). Ao utilizar sobrenadantes de PBMC infectadas com APMV, verificou-se que não há produção de viroceptores nas células infectadas, uma vez que os IFN do tipo I incubados com estes sobrenadantes conservaram a sua capacidade de induzir um estado antiviral em células Vero protegendo-as contra a infecção por EMCV, enquanto o controle utilizado, sobrenadante de células Vero infectadas com VACV-WR foi capaz de abolir completamente a atividade dos IFN do tipo I, devido à presença de um viroceptor conhecido, codificado pelo poxvírus (Fig. 15). Este resultado revelou que o mecanismo utilizado por APMV para inibir o sistema interferon é mediado por outras moléculas e provavelmente ocorre intracelularmente.

A fosforilação de fatores de transcrição, em particular STAT, desencadeada pela ligação de um IFN aos seus receptores, é crítica para a indução de ISG (BORDEN *et al.*, 2007; ERICKSON, SEIWERT e GALE, 2008; WONG *et al.*, 2002). A fim de verificar um possível mecanismo de inibição da via de sinalização de IFN por APMV, inicialmente foi avaliada a fosforilação de STAT1, imprescindível para promover a transcrição de ISG, em PBMC humanas infectadas. Foi visto que há fosforilação deste componente em células infectadas por APMV e submetidas a rápido tratamento com IFN do tipo I, assim como observado nos controles de células infectadas com PIVMH e células apenas tratadas com IFNA2 ou IFNB1 (Fig. 16). Foi visto também que a fosforilação de STAT1, assim como de STAT2 ocorre de forma

dose dependente. O nível de STAT1 e 2 fosforilados em células infectadas com VACV-WR foi menor do que nos controles, como esperado para um vírus capaz de evadir o sistema interferon (Fig 17). Estes resultados revelaram que a interferência de APMV com a indução ISG deve acontecer em outro ponto da via de sinalização de IFN. Como hipóteses, o vírus pode ser capaz de inibir a fosforilação de IRF9, bloquear a translocação nuclear de ISGF3 ou mesmo inibir especificamente a tradução de determinados ISG, além disso pode-se sugerir também a participação de micro RNA. As possibilidades são muitas, e devido ao tamanho do genoma de APMV, os mecanismos de inibição podem ser complexos e difíceis de serem demonstrados. Futuros estudos voltados para essa questão, aliada à melhor caracterização de um grande número de genes de APMV ainda desconhecidos são necessários para a completa compreensão de como APMV interfere com a imunidade inata.

Sabe-se que APMV foi isolado em uma ameba de vida livre, *A.polyphaga*, porém, se amebas fossem o hospedeiro exclusivo para APMV, os mecanismos de interação com o sistema interferon provavelmente não teriam sido selecionados positivamente pela seleção natural, uma vez que o sistema interferon é encontrado somente em animais vertebrados. Outra evidência que corrobora essa teoria é que, após várias passagens em amebas, APMV perde parte do seu genoma em um evento semelhante ao observado para a atenuação de patógenos virais humanos em cultura de células (BOYER *et. al.*, 2011). Assim, o fato de APMV ser capaz de se multiplicar em amebas pode ser considerado um fator de risco para a saúde dos vertebrados, uma vez que amebas infectadas podem se tornar a fonte de infecção por APMV ou mesmo um lugar no qual o vírus pode interagir e obter novos genes através de associação com outros patógenos. Considerando a história natural entre os vírus e seus hospedeiros, as interações observadas neste trabalho são provavelmente o resultado da co-evolução entre APMV e hospedeiros vertebrados e representam uma evidência de uma relação ancestral entre estes e os vírus gigantes.

VII. CONCLUSÕES

- APMV é capaz de se multiplicar em PBMC humanas;
- APMV induz a expressão de IFN do tipo I nestas células;
- APMV impede a expressão de mRNA de *MX1* e *IF6I* em PBMC infectadas, indicando um possível mecanismo de evasão;
- APMV é resistente ao tratamento com IFNA2, mas sensível ao tratamento com IFNB1;
- A evasão da expressão de ISG por APMV é independente de viroceptores contra *IFNA2* e *IFNB1* e do bloqueio da fosforilação de STAT1 e 2.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCAMI, A.; SYMONS, J.A.; SMITH, G.L. The *Vaccinia virus* soluble alpha/beta interferon (IFN) receptor binds to the cell surface and protects cells from the antiviral effects of IFN. **Journal of virology**, E.U.A., v. 74, n. 23, p. 11230-9, 2000.

ALMEIDA, G.M.; DE OLIVEIRA, D.B.; MAGALHÃES, C.L.; BONJARDIM, C.A.; FERREIRA, P.C.; KROON, E.G. Antiviral activity of type I interferons and interleukins 29 and 28a (type III interferons) against *Apeu virus*. **Antiviral Research**, Países Baixos, v. 80, n. 3, p. 302-8, 2008.

ANDREJEVA, J.; CHILDS, K.S.; YOUNG, D.F.; CARLOS, T.S.; STOCK, N.; GOODBOURN, S.; RANDALL, RE. The V proteins of paramyxoviruses bind the IFN-inducible RNA helicase, MDA-5, and inhibit its activation of the IFN-beta promoter. **PNAS**, E.U.A., v. 101, n. 49, p. 17264-9, 2004.

ARSLAN, D.; LEGENDRE, M.; SELTZER, V.; ABERGEL, C.; CLAVERIE, J.M. Distant mimivirus relative with a larger genome highlights the fundamental features of *Megaviridae*. **PNAS**, E.U.A., v. 108, n. 42, p. 17486-91, 2011.

BONJARDIM, C.A. Interferons (IFNs) are key cytokines in both innate and adaptive antiviral immune responses—and viruses counteract IFN action. **Microbes and Infection**, França, v. 7, n. 3, p. 569-78, 2005.

BORDEN, E.C.; SEN, G.C.; UZE, G.; SILVERMAN, R.H.; RANSOHOFF, R.M.; FOSTER, G.R.; STARK, G.R. Interferons at age 50: past, current and future impact on biomedicine. **Nature reviews. Drug discovery**, Inglaterra, v. 6, n. 12, p. 975–90, 2007.

BOUSBIA, S.; PAPAZIAN, L.; SAUX, P.; FOREL, J.M.; AUFRAY, J.P.; MARTIN, C.; RAOULT, D.; LA SCOLA, B. Serologic prevalence of amoeba-associated microorganisms in intensive care unit pneumonia patients. **PLoS One [electronic resource]**, E.U.A., v. 8, n. 3, e58111, 2013.

BOWIE, A.; KISS-TOTH, E.; SYMONS, J.A.; SMITH, G.L.; DOWER, S.K.; O'NEILL, L.A. A46R and A52R from *Vaccinia virus* are antagonists of host IL-1 and toll-like receptor signaling. **PNAS**, E.U.A., v. 97, n. 18, p. 10162–7, 2000.

BOYER, M.; AZZA, S.; BARRASSI, L.; KLOSE, T.; CAMPOCASSO, A.; PAGNIER, I.; FOURNOUS, G.; BORG, A.; ROBERT, C.; ZHANG, X.; DESNUES, C.; HENRISSAT, B.; ROSSMANN, M.G.; LA SCOLA, B.; RAOULT, D. Mimivirus shows dramatic genome reduction after intraamoebal culture. **PNAS**, E.U.A., v. 108, n. 25, p. 10296-301, 2011.

BÖYUM, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, Noruega, v. 97, p. 77–89, 1968.

BRZÓZKA, K.; FINKE, S.; CONZELMANN, K.K. Inhibition of interferon signaling by rabies virus phosphoprotein P: activation-dependent binding of STAT1 and STAT2. **Journal of virology**, E.U.A., v. 80, n. 6, p. 2675-83, 2006.

CARROLL, K.; ELROY-STEIN, O.; MOSS, B.; JAGUS, R. Recombinant *Vaccinia virus K3L* gene product prevents activation of doublestranded RNA-dependent, initiation factor 2 alpha-specific protein kinase. **The Journal of biological chemistry**, E.U.A., v. 268, n. 17, p. 12837–142, 1993.

CHANG, H.W.; WATSON, J.C.; JACOBS, B.L. The *E3L* gene of *Vaccinia virus* encodes an inhibitor of the interferon-induced, doublestranded RNA-dependent protein kinase. **PNAS**, E.U.A., v. 89, n.11, p. 4825–29, 1992.

CLAVERIE, J.M.; ABERGEL, C. Mimivirus: the emerging paradox of quasi-autonomous viruses. **Trends in Genetics**, Inglaterra, v. 26, n. 10, p. 431-37, 2010.

CLAVERIE, J.M.; ABERGEL, C.; OGATA, H. Mimivirus. **Current topics in microbiology and immunology**, Alemanha, v. 328, p. 89-121, 2009.

CLAVERIE, J.M.; OGATA, H.; AUDIC, S.; ABERGEL, C.; SUHRE, K.; FOURNIER, P.E. Mimivirus and the emerging concept of "giant" virus. **Viruses Research**, Países Baixos, v. 117, n. 1, p.133-144, 2006.

COELHO, L. F.; MAGNO DE FREITAS ALMEIDA, G.; MENNECHET, F.J.; BLANGY, A.; UZÉ, G. Interferon-alpha and -beta differentially regulate osteoclastogenesis: role of differential induction of chemokine CXCL11 expression. **PNAS**, E.U.A., v.102, n.33, p.11917-22, 2005.

COLSON, P.; DE LAMBALLERIE, X.; FOURNOUS, G.; RAOULT, D. Reclassification of giant viruses composing a fourth domain of life in the new order *Megavirales*. **Intervirology**, Suíça, v.55, n. 5, p. 321-32, 2012.

COLSON, P.; FANCELLO, L.; GIMENEZ, G.; ARMOUGOM, F.; DESNUES, C.; FOURNOUS, G.; YOOSUF, N.; MILLION, M.; LA SCOLA, B.; RAOULT, D. Evidence of the megavirome in humans. **Journal of clinical virology**, Países Baixos, v. 57, n. 3, p.191-200, 2013a.

COLSON, P.; FOURNOUS, G.; DIENE, S.M.; RAOULT, D. Codon usage, amino acid usage, transfer RNA and amino-acyl-tRNA Synthetases in mimiviruses. **Intervirology**, Suíça, v. 56, n. 6, p.364-75, 2013b.

COLSON, P.; GIMENEZ, G.; BOYER, M.; FOURNOUS, G.; RAOULT, D. The giant *Cafeteria roenbergensis virus* that infects a widespread marine phagocytic protist is a new member of the fourth domain of Life. **PLoS One**, E.U.A., v. 6, n. 4, p. 01-11, 2011a.

COLSON, P.; PAGNIER, I.; YOOSUF, N.; FOURNOUS, G.; LA SCOLA, B.; RAOULT, D. '*Marseilleviridae*', a new family of giant viruses infecting amoebae. **Archives of virology**, Áustria, v. 158, n.4, p. 915-20, 2013c.

COLSON, P.; YUTIN, N.; SHABALINA, S.A.; ROBERT, C.; FOURNOUS, G.; LA SCOLA, B.; RAOULT, D.; KOONIN, E.V. Viruses with more than 1,000 Genes: *Mamavirus*, a new *Acanthamoeba polyphaga mimivirus* strain, and reannotation of mimivirus genes. **Genome biology and evolution**, Inglaterra, v. 3, p. 737-42, 2011b.

COLSON, P.; RAOULT, D. Lamarckian evolution of the giant mimivirus in allopatric laboratory culture on amoebae. **Frontiers in cellular and infection microbiology [electronic resource]**, Suíça, v.,2, n.91, 2012. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22919682>>

DAVIES, M.V.; CHANG, H.W.; JACOBS, B.L.; KAUFMAN, R.J. The E3L and K3L *Vaccinia virus* gene products stimulate translation through inhibition of the double-stranded RNA-dependent protein kinase by different mechanisms. **Journal of virology**, E.U.A., v. 67, n. 3, p. 1688–92, 1993.

DAVIES, M.V.; ELROY STEIN, O.; JAGUS, R.; MOSS, B.; KAUFMAN, R.J. The *Vaccinia virus* K3L gene product potentiates translation by inhibiting double-stranded-RNA-activated protein kinase and phosphorylation of the alpha subunit of eukaryotic initiation factor 2. **Journal of virology**, E.U.A., v. 66, n. 4, p. 1943–50, 1992.

DE WEERD, N.A.; VIVIAN, J.P.; NGUYEN, T.K.; MANGAN, N.E.; GOULD, J.A.; BRANIFF, S.J.; ZAKER-TABRIZI, L.; FUNG, K.Y.; FORSTER, S.C.; BEDDOE, T.; REID, H.H.; ROSSJOHN, J.; HERTZOG, P.J. Structural basis of a unique interferon-beta signaling axis mediated via the receptor IFNAR1, **Nature immunology**, E.U.A., v. 14, n.9, p. 901-7, 2013.

DESNUES, C.; LA SCOLA, B.; YUTIN, N.; FOURNOUS, G.; ROBERT, C.; AZZA, S.; JARDOT, P.; MONTEIL, S.; CAMPOCASSO, A.; KOONIN, E.V.; RAOULT, D. Provirophages and transpovirons as the diverse mobilome of giant viruses. **PNAS**, E.U.A., v. 109, n. 44, p. 18078-83, 2012.

DESNUES, C.; RAOULT, D. Inside the lifestyle of the virophage. **Intervirology**, Suíça, v. 53, n.5, p. 293-303, 2010.

ERICKSON, A.K.; SEIWERT, S.; GALE, M.J. Antiviral potency analysis and functional comparison of consensus interferon, interferon-alpha2a and pegylated interferon-alpha2b against hepatitis C virus infection. **Antiviral therapy**, Inglaterra, v. 13, n.7, p. 851-62, 2008.

ETTEN, J.L.V.; LANE, L.C.; DUNIGAN, D.D. DNA viruses: the really big ones (giruses). **Annual review of microbiology**, E.U.A., v. 13, n. 64, p. 83–99, 2010.

FRIEDMAN, R.M. Clinical uses of interferons. **British Journal of Clinical Pharmacology**, Inglaterra, v. 65, p. 158-62, 2007.

GARCIA-SASTRE, A.; BIRON, C. A. Type 1 interferons and the virus-host relationship: a lesson in détente, **Science**, E.U.A., v. 312, n. 5775, p. 879-82, 2006.

GEDEY, R.; JIN, X.L.; HINTHONG, O.; SHISLER, J.L. Poxviral regulation of the host NF-kappaB response: the *Vaccinia virus* M2L protein inhibits induction of NF-kappaB activation via an ERK2 pathway in virus-infected human embryonic kidney cells. **Journal of virology**, E.U.A., v. 80, n. 17, p. 8676–85, 2006.

GHEDIN, E.; CLAVERIE, J.M. Mimivirus relatives in the Sargasso sea. **Virology Journal**, Inglaterra, v. 2, p. 62-69, 2005.

GHIGO, E.; KARTENBECK, J.; LIEN, P.; PELKMANS, L.; CAPO, C.; MEGE, J.L.; RAOULT, D. Ameobal pathogen mimivirus infects macrophages through phagocytosis. **PLoS Pathogens**, E.U.A., v. 4, n. 6, p. 01-17, 2008.

GONZÁLEZ-NAVAJAS, J.M.; JONGDAE, L.; DAVID, M.; RAZ, E. Immunomodulatory functions of type I interferons. **Nature reviews. Immunology**, Inglaterra, v. 12, p. 125 -35, 2012.

GOODBOURN, S.; DIDCOCK, L.; RANDALL, R.E. Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. **The Journal of general virology**, Inglaterra, v. 81, n. 10, p. 2341-64, 2000.

HARDY, M.P.; OWCZAREK, C.M.; TRAJANOVSKA, S.; LIU, X.; KOLA, I.; ERTZOG, P.J. The soluble murine type I interferon receptor Ifnar-2 is present in serum, is independently regulated, and has both agonistic and antagonistic properties. **Blood**, E.U.A., v.97, n.2, p.473-82. 2001.

HARRISON, G. A.; YOUNG, L.J.; WATSON, C.M.; MISKA, K.B.; MILLER, R.D.; DEANE, E.M. A survey of type I interferons from a marsupial and monotreme:

implications for the evolution of the type I interferon gene family in mammals. **Cytokine**, E.U.A., v.21, n.3, p.105-19, 2003.

HARTE, M.T.; HAGA, I.R.; MALONEY, G.; GRAY, P.; READING, P.C.; BARTLETT, N.W.; SMITH, G.L.; BOWIE, A.; O'NEILL, L.A. The poxvirus protein A52R targets toll-like receptor signaling complexes to suppress host defense. **The Journal of experimental medicine**, E.U.A., v. 197, n. 3, p. 343–51, 2003.

HILLYER, P.; MANE, V.P.; SCHRAMM, L.M.; PUIG, M.; VERTHELYI, D.; CHEN, A.; ZHAO, Z.; NAVARRO, M.B.; KIRSCHMAN, K.D.; BYKADI, S.; JUBIN, R.G.; RABIN, R.L. Expression profiles of human interferon-alpha and interferon-lambda subtypes are ligand- and cell-dependent, **Immunology and cell biology**, Inglaterra, v. 90, n. 8, p. 774-83, 2012.

HOLZINGER, D.; JORNS, C.; STERTZ, S.; BOISSON-DUPUIS, S.; THIMME, R.; WEIDMANN, M.; CASANOVA, J.L.; HALLER, O.; KOCHS, G.; Induction of MXA gene expression by *Influenza A Virus* requires type I or type III interferon signaling, **Journal of virology**, E.U.A., v. 81, n. 14, p. 7776–85, 2007.

Internacional Committee On Taxonomy Of Viruses (ICTV). Master Species List 2012. Disponível em <<http://www.ictvonline.org>> Acesso em 01/11/2013.

ISAACS, A.; LINDENMANN, J. VIRUS interference. I. The interferon. **Proceedings. Biological sciences / The Royal Society**, Inglaterra, v.147, n. 927. p.258-67, 1957.

KALLIOLIAS, G.D.; IVASHKIV, L.B. Overview of the biology of type I interferons. **Arthritis Research & Therapy**, Inglaterra, v. 2010, n. 12, 2010.

KIM, S.H.; COHEN, B.; NOVICK, D.; RUBINSTEIN, M. Mammalian type I interferon receptors consists of two subunits: IFN α R1 and IFN α R2. **Gene**, Países Baixos, v.196, n.1-2, p. 279-86, 1997.

KLOSE, T.; KUZNETSOV, Y.G.; XIAO, C.; SUN, S.; MCPHERSON, A.; ROSSMANN, M.G. The Three-Dimensional Structure of Mimivirus. **Intervirology**, Suíça, v. 53, n. 5, p. 268-73, 2010.

KONTSEK, P.; KARAYIANNI-VASCONCELOS, G.; KONTSEKOVÁ, E. The human interferon system: characterization and classification after discovery of novel members. **Acta virologica**, Eslováquia, v. 47, n. 4, p. 201-15, 2003.

KOONIN, E.V.; YUTIN, N. Origin and evolution of eukaryotic large nucleocytoplasmic DNA viruses. **Intervirolgy**, Suíça, v. 53, p. 284–92, 2010.

KRAUSE, C. D.; PESTKA, S. Evolution of the class 2 cytokines and receptors, and discovery of new friends and relatives. **Pharmacology & therapeutics**, Inglaterra, v.106, n.3, p. 299-346, 2005.

KUBOTA, T.; YOKOSAWA, N.; YOKOTA, S.; FUJII, N. Association of *Mumps virus* V protein with RACK1 results in dissociation of STAT-1 from the alpha interferon receptor complex. **Journal of virology**, E.U.A., v. 76, n. 24, p. 12676–82, 2002.

KUZNETSOV, Y.G.; KLOSE, T.; ROSSMANN, M.; MCPHERSON, A. Morphogenesis of mimivirus and its viral factories: an atomic force microscopy study of infected cells. **Journal of virology**, E.U.A., v. 87, n. 20, p. 11200-13, 2013.

LA SCOLA, B.; AUDIC, S.; ROBERT, C.; JUNGANG, L.; DE LAMBALLERIE, X.; DRANCOURT, M.; BIRTLES, R.; CLAVERIE, J.M.; RAOULT, D. A giant virus in amoebae. **Science**, E.U.A., v. 299, n. 5615, p. 2033, 2003.

LA SCOLA, B.; CAMPOCASSO, A.; N'DONG, R.; FOURNOUS, G.; BARRASSI, L.; FLAUDROPS, C.; RAOULT, D. Tentative characterization of new environmental giant viruses by MALDI-TOF mass spectrometry. **Intervirolgy**, Suíça, v. 53, n. 5, p. 344-53, 2010.

LA SCOLA, B.; DESNUES, C.; PAGNIER, I.; ROBERT, C.; BARRASSI, L.; FOURNOUS, G.; MERCHAT, M.; SUZAN-MONTI, M.; FORTERRE, P.; KOONIN, E.; RAOULT, D. The virophage as a unique parasite of the giant mimivirus. **Nature**, Inglaterra, v. 455, n. 7209, p. 100-4, 2008.

LA SCOLA, B.; MARRIE, T.J.; AUFRAY, J.P.; RAOULT, D. Mimivirus in pneumonia patients. **Emerging infectious diseases**, E.U.A., v. 11, n. 3, p. 449–52, 2005.

LAROCQUE, L.; BLIU, A.; XU, R.; DIRESS, A.; WANG, J.; LIN, R.; HE, R.; GIRARD, M.; LI, X. Bioactivity Determination of Native and Variant Forms of Therapeutic Interferons. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, E.U.A., v. 2011, p. 1-11, 2011.

LEGENDRE, M.; AUDIC, S.; POIROT, O.; HINGAMP, P.; SELTZER, V.; BYRNE, D.; LARTIGUE, A.; LESCOT, M.; BERNADAC, A.; POULAIN, J.; ABERGEL, C.; CLAVERIE, J.M. mRNA deep sequencing reveals 75 new genes and a complex transcriptional landscape in Mimivirus. **Genome Research**, E.U.A., v. 20, n.5, p. 664-74, 2010.

LEVY, D.E., MARIÉ, I., PRAKASH, A. Ringing the interferon alarm: differential regulation of gene expression at the interface between innate and adaptive immunity. **Current opinion in immunology**, Inglaterra, v.15, n.1, p. 52-8, 2003.

LEVY, D.E.; MARIÉ, I.J.; DURBIN, J.E. Induction and function of type I and III interferon in response to viral infection. **Current opinion in virology**, Países Baixos, v. 1, n. 6, p. 476-86, 2011.

LIU, K.; LEMON, B.; TRAKTMAN, P. The dual-specificity phosphatase encoded by *Vaccinia virus*, VH1, is essential for viral transcription *in vivo* and *in vitro*. **Journal of virology**, E.U.A., v. 69, n. 12, p. 7823–34, 1995.

MALMGAARD, L.; SALAZAR-MATHER, T.P.; LEWIS, C.A.; BIRON, C.A. Promotion of alpha/beta interferon induction during *in vivo* viral infection through alpha/beta interferon receptor/STAT1 system dependent and -independent pathways. **Journal of virology**. E.U.A., v.76, n.9, p.4520-5, 2002.

MANN, B.A.; HUANG, J.H.; LI, P.; CHANG, H.C.; SLEE, R.B.; O'SULLIVAN, A.; ANITA, M.; YEH, N.; KLEMSZ, M.J.; BRUTKIEWICZ, R.R.; BLUM, J.S.; KAPLAN, M.H. *Vaccinia virus* blocks stat1-dependent and stat1-independent gene

expression induced by Type I and type II interferons. **Journal of interferon and cytokine research**, E.U.A., v. 28, n. 6, p. 367–80, 2008.

MARTINS, R.M.; RODRIGUEZ DOS SANTOS, J.; GOLGHER, R.R. *Mill Hill strain of parainfluenza 1 virus* is a potent human interferon inducer. **Journal of interferon research**, E.U.A., v.9, n. 4, p. 379-83, 1989.

MICHELUCCI, A.; CORDES, T.; GHELFI, J.; PAILLOT, A.; REILING, N.; GOLDMANN, O.; BINZ, T.; WEGNER, A.; TALLAM, A.; RAUSELL, A.; BUTTINI, M.; LINSTER, C.L.; MEDINA, E.; BALLING, R.; HILLER, K. Immune-responsive gene 1 protein links metabolism to immunity by catalyzing itaconic acid production. **PNAS**, E.U.A., v. 110, n. 19, p. 820-5, 2013.

MORAGA, I.; HARARI, D.; SCHREIBER, G; UZÉ, G.; PELLEGRINI, S. Receptor density is key to the alpha2/beta interferon differential activities, **Molecular and cellular biology**, E.U.A., v. 29, n. 17, p. 4778-87, 2009.

MOREIRA, D.; BROCHIER-ARMANET, C. Giant viruses, giant chimeras: the multiple evolutionary histories of mimivirus genes. **BMC Evolutionary Biology**, Inglaterra, v. 8, n. 12, p. 01-10, 2008.

MUTSAFI, Y.; ZAUBERMAN, N.; SABANAY, I.; MINSKY, A. Vaccinia-like cytoplasmic replication of the giant Mimivirus. **PNAS**, E.U.A., v. 107, n. 13, p.5978–82, 2010.

NETHERTON, C.L.; SIMPSON, J.; HALLER, O.; WILEMAN, T.E.; TAKAMATSU, H.H.; MONAGHAN, P.; TAYLOR, G. Inhibition of a large double-stranded DNA virus by MxA protein, **Journal of virology**, E.U.A., v. 83, n. 5, p. 2310-20, 2009.

PAGNIER, I.; RETENO, D.G.; SAADI, H.; BOUGHALMI, M.; GAIA, M.; SLIMANI, M.; NGOUNGA, T.; BEKLIZ, M.; COLSON, P.; RAOULT, D.; LA SCOLA, B. A Decade of improvements in *Mimiviridae* and *Marseilleviridae* isolation from amoeba. **Intervirology**, Suíça, v.56, n. 6, p. 354-63, 2013.

PAVLOVIC, J.; HALLER, O.; STAEHELI, P. Human and mouse Mx proteins inhibit different steps of the *Influenza virus* multiplication cycle. **Journal of virology**, E.U.A., v.66, n. 4, p. 2564-9, 1992.

PERDIGUERO, B.; ESTEBAN, M. the interferon system and *Vaccinia virus* evasion mechanisms. **Journal of interferon & cytokine research**, E.U.A., v. 20, n. 9, p. 581-98, 2009.

PHILIPPE, N.; LEGENDRE, M.; DOUTRE, G.; COUTÉ, Y.; POIROT, O.; LESCOT, M.; ARSLAN, D.; SELTZER, V.; BERTAUX, L.; BRULEY, C.; GARIN, J.; CLAVERIE, J.M.; ABERGEL, C. Pandoraviruses: amoeba viruses with genomes up to 2.5 Mb reaching that of parasitic eukaryotes. **Science**, E.U.A., v. 341, n. 6143, p. 281-6, 2013.

POPGEORGIEV, N.; BOYER, M.; FANCELLO, L.; MONTEIL, S.; ROBERT, C.; RIVET, R.; NAPPEZ, C.; AZZA, S.; CHIARONI, J.; RAOULT, D.; DESNUES, C. Giant blood *Marseillevirus* recovered from asymptomatic blood donors. **The Journal of infectious diseases**, E.U.A., v. 208, n. 7, p. 1042-50, 2013.

RAOULT, D. The journey from Rickettsia to Mimivirus. **ASM News**, E.U.A., v. 71, n. 6, p. 278-84, 2005.

RAOULT, D.; BOYER, M. Amoebae as genitors and reservoirs of giant viruses. **Intervirology**, Suíça, v. 53, n. 5, p. 321-29, 2010.

RAOULT, D.; LA SCOLA, B.; BIRTLES, R. The discovery and characterization of Mimivirus the largest known virus and putative pneumonia agent. **Clinical infectious diseases**, E.U.A., v. 45, n. 1, p. 5-102, 2007.

REED, L.J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent end points. **American journal of epidemiology**, E.U.A., v. 27, p. 493–97, 1938.

SAADI, H.; PAGNIER, I.; COLSON, P.; CHERIF, J.K.; BEJI, M.; BOUGHALMI, M.; AZZA, S.; ARMSTRONG, N.; ROBERT, C.; FOURNOUS, G.; LA SCOLA, B.; RAOULT, D. First isolation of Mimivirus in a patient with pneumonia. **Clinical infectious diseases**, E.U.A., v. 57, n.4, p. 127-34, 2013a.

SAADI, H.; RETENO, D.G.; COLSON, P.; AHERFI, S.; MINODIER, P.; PAGNIER, I.; RAOULT, D.; LA SCOLA, B. *Shan virus*: a new mimivirus isolated from the stool of a Tunisian patient with pneumonia. **Intervirolgy**, Suíça, v. 56, n. 6, p. 424-9, 2013b.

SAINI, H.K.; FISCHER, D. Structural and functional insights into Mimivirus ORFans, **BMC Genomics [electronic resource]**, v. 8, n. 115, 2007. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17490476>>.

SAMARAJIWA, S.A.; FORSTER, S.; AUCHETTL, K.; HERTZOG, P.J. Interferome: the database of interferon regulated genes. **Nucleic Acids Research**, E.U.A., v. 37, p. 852-57, 2009.

SAMUEL, C.E. Antiviral actions of interferons. **Clinical microbiology reviews**, E.U.A., v. 14, n. 4, p. 778-809, 2001.

SCHMIDT, F.I.; BLECK, C.K.; REH, L.; NOVY, K.; WOLLSCHIED, B.; HELENIUS, A.; STAHLBERG, H.; MERCER, J. *Vaccinia virus* entry is followed by core activation and proteasome-mediated release of the immunomodulatory effector VH1 from lateral bodies. **Cell reports [electronic resource]**, E.U.A., v. 4, n. 3, p. 464-7, 2013.

SCHRODER, M.; BARAN, M.; BOWIE, A.G. Viral targeting of DEAD box protein 3 reveals its role in TBK1/IKKepsilon-mediated IRF activation. **The EMBO journal**, Inglaterra, v. 27, n. 15, p. 2147–57, 2008.

SEN, G.C. Viruses and interferons. **Annual Review of Microbiology**, E.U.A., v. 55, p. 255-81, 2001.

SHISLER, J.L.; JIN, X.L. The *Vaccinia virus K1L* gene product inhibits host NF-kappaB activation by preventing Ikbalpha degradation. **Journal of virology**, E.U.A., v. 78, n. 7, p. 3553–60, 2004.

SHORT, J.A.L. Viral evasion of interferon stimulated genes. **Bioscience Horizons [electronic resource]**, v. 2, n. 2, p. 212-24, 2009.

SMITH, G.L.; BENFIELD, C.T.O.; DE MOTES, C.M.; MAZZON, M.; EMBER, S.W.J.; FERGUSON, B.J.; SUMNER, R.P. *Vaccinia virus* immune evasion: mechanisms, virulence and immunogenicity. **Journal of General Virology**, Inglaterra, v. 94, pt. 11, p. 2367–92, 2013.

STACK, J.; HAGA, I.R.; SCHRODER, M.; BARTLETT, N.W.; MALONEY, G.; READING, P.C.; FITZGERALD, K.A.; SMITH, G.L.; BOWIE, A.G. *Vaccinia virus* protein A46R targets multiple Toll-like-interleukin-1 receptor adaptors and contributes to virulence. **The Journal of experimental medicine**, E.U.A., v. 201, n. 6, p. 1007–18, 2005.

STEVENSON, N.J.; MURPHY, A.G.; BOURKE, N.M.; KEOGH, C.A.; HEGARTY, J.E.; O'FARRELLY, C. Ribavirin enhances IFN- α signalling and MxA expression: a novel immune modulation mechanism during treatment of HCV. **PLoS ONE [electronic resource]**, E.U.A., v. 6, n. 11, e27866, 2011.

SUHRE, K. Gene and genome duplication in *Acanthamoeba polyphaga* *Mimivirus*. **Journal of Virology**, E.U.A., v. 79, n. 22, p.14095–101, 2005.

SUHRE, K.; AUDIC, S.; CLAVERIE, J.M. Mimivirus gene promoters exhibit an unprecedented conservation among all eukaryotes. **PNAS**, E.U.A., v. 102, n. 41, p. 14689-93, 2005.

SUZAN-MONTI, M.; LA SCOLA, B.; BARRASSI, L.; ESPINOSA, L.; RAOULT, D. Ultrastructural characterization of the giant volcano-like virus factory of *Acanthamoeba polyphaga* *Mimivirus*. **PLoS One**, E.U.A., v. 2, n. 3, p. 01-11, 2007.

SYMONS, J.A.; ALCAMÍ, A.; SMITH, G. L. *Vaccinia virus* encodes a soluble type I interferon receptor of novel structure and broad species specificity. **Cell**, E.U.A., v. 81, n.4, p. 551-60, 1995.

THOMAS, C.; MORAGA, I.; LEVIN, D.; KRUTZIK, P.O.; PODOPLELOVA, Y.; TREJO, A.; LEE, C.; YARDEN, G.; VLECK, S.E.; GLENN, J.S.; NOLAN, G.P.; PIEHLER, J.; SCHREIBER, G.; GARCIA, K.C. Structural linkage between ligand

discrimination and receptor activation by type I interferons. **Cell**, E.U.A., v. 146, n. 4, p. 621–32, 2011.

UDDIN, S.; PLATANIAS, L.C. Mechanisms of type-I interferon signal transduction. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, Coreia do Sul, v. 37, n. 6, p. 635-41, 2004.

UNTERHOLZNER, L.; SUMNER, R.P.; BARAN, M.; REN, H.; MANSUR, D.S.; BOURKE, N.M.; RANDOW, F.; SMITH, G.L.; BOWIE, A.G. *Vaccinia virus* protein C6 is a virulence factor that binds TBK-1 adaptor proteins and inhibits activation of IRF3 and IRF7. **PLoS pathogens**, E.U.A., v.7, n. 9, e1002247, 2011.

UZÉ, G.; SCHREIBER, G.; PIEHLER, J.; PELLEGRINI, S. The receptor of the type I interferon family. . **Current opinion in immunology**, Inglaterra, v. 316, p.71-95. 2007.

VANCOVÁ, I.; LA BONNARDIERE, C.; KONTSEK, P. *Vaccinia virus* protein B18R inhibits the activity and cellular binding of the novel type interferon-delta. **The Journal of general virology**, Inglaterra, v.79, pt. 7, p.1647-9, 1998.

VANSPAUWEN, M.J.; FRANSEN, F.M.; RAOULT, D.; WOUTERS, E.F.; BRUGGEMAN, C.A.; LINSSEN, C.F. Infections with mimivirus in patients with chronic obstructive pulmonary disease. **Respiratory medicine**, Inglaterra, v. 106, n. 12, p. 1690-4, 2012.

VINCENT, A.; LA SCOLA, B.; PAPAIZIAN, L. Advances in Mimivirus pathogenicity. **Intervirolgy**, Suíça, v. 53, n. 5, p. 304–09, 2010.

WAIBLER, Z.; ANZAGHE, M.; FRENZ, T.; SCHWANTES, A.; PÖHLMANN, C.; LUDWIG, H.; PALOMO-OTERO, M.; ALCAMÍ, A.; SUTTER, G.; KALINKE, U. *Vaccinia virus*-mediated inhibition of type I interferon responses is a multifactorial process involving the soluble type I interferon receptor B18 and intracellular components. **Journal of virology**, E.U.A., v. 83, n. 9, p. 1563–71, 2009.

WONG, L.H.; SIM, H.; CHATTERJEE-KISHORE, M.; HATZINISIRIOU, I.; DEVENISH, R.J.; STARK, G.; RALPH, S.J. Isolation and characterization of a

human STAT1 gene regulatory element. Inducibility by interferon (IFN) regulatory factor-1. **The Journal of biological chemistry**, E.U.A., v. 277, n. 22, p. 19408-17, 2002.

XIAO, C.; KUZNETSOV, Y.G.; SUN, S.; HAFENSTEIN, S.L.; KOSTYUCHENKO, V.A.; CHIPMAN, P.R.; SUZAN-MONTI, M.; RAOULT, D.; MCPHERSON, A.; ROSSMANN, M.G. Structural studies of the giant Mimivirus. **PLoS Biology**, E.U.A., v. 7, n. 4, p. 958-66, 2009.

YUTIN, N.; WOLF, Y.I.; RAOULT, D.; KOONIN, E.V. Eukaryotic large nucleocytoplasmic DNA viruses: clusters of orthologous genes and reconstruction of viral genome evolution. **Virology Journal**, Inglaterra, v. 6, n. 223, p. 01-13, 2009.

IX. ANEXOS

ANEXO 1 - Parecer de aprovação do projeto de pesquisa pelo COEP



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE – 10906413.0.0000.5149

Interessado(a): **Prof. Jônatas Santos Abrahão**
Departamento de Microbiologia
Instituto de Ciências Biológicas - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 09 de julho de 2013, o projeto de pesquisa intitulado "**Análise do perfil de expressão de mRNAs de interferons (IFNs) e de genes estimulados por IFNs (ISGs) em PBMCs humanos infectados com Acanthamoeba polyphaga mimivirus**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

Prof. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise do perfil de expressão de mRNAs de interferons (IFNs) e de genes estimulados por IFNs (ISGs) em PBMCs humanos infectados com Acanthamoeba polyphaga mimivirus

Pesquisador: Jônatas Santos Abrahão

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 10906413.0.0000.5149

Instituição Proponente: Universidade Federal de Minas Gerais

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 329.543

Data da Relatoria: 02/07/2013

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo observacional, prospectivo com uma casuística de 5 ou 10 indivíduos saudáveis (o número é distinto conforme a parte de descrição do projeto), pertencentes à comunidade da UFMG, os quais serão submetidos à coleta de sangue total (15mL), para os seguintes procedimentos: a) fracionamento do sangue coletado de modo a obter a fração de PBMCs (células mononucleares do sangue periférico) para cultivo celular de células fagocitárias ex vivo; b) infecções dos PBMCs com mimivírus; c) avaliação da atividade antiviral de IFNs contra mimivírus em PBMCs humanos; d) extração do RNA total das células utilizadas durante os experimentos de infecção, transcrição reversa, PCR em tempo-real; e) titulação de IFNs. Não há descrição da forma de recrutamento dos voluntários; não há gasto, segundo os pesquisadores, porém há a menção em um parecer que o gasto será custeado pelo laboratório de vírus até a aprovação do financiamento pela FAPEMIG; o cronograma está com data de início de 30/12/2012, inclusive para coleta de sangue; há menção da análise dos dados, utilizando o software StepOne PCR real-time systems.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo primário: "avaliar, de forma inédita, a resposta imune inata, no âmbito da produção de IFNs e ISGs, desencadeada em células fagocitárias humanas, obtidas através de sangue humano,

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad Sl 2005

Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 329.543

frente à infecção por APMV".

Objetivos Secundários: " -Avaliar a susceptibilidade e permissividade de PBMCs humanos ao mimivírus; - Verificar a atividade antiviral de IFNs contra mimivírus em PBMCs humanos; - Mensurar os níveis de expressão de mRNAs de diferentes tipos de IFNs em PBMCs humanos infectados com mimivírus; - Mensurar os níveis de expressão de mRNAs de diferentes ISGs em PBMCs humanos infectados com APMV; - Verificar se APMV é capaz de interferir com o estabelecimento do estado antiviral em PBMCs humanos; - Avaliar a presença de possíveis viroceptores codificados por APMV".

OBS: não há descrição para as siglas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo os pesquisadores, "Como a pesquisa necessita de coleta de PBMCs humanos, possíveis riscos de contaminação da equipe de coleta deve ser considerada, assim como problemas relacionados à contaminação dos pacientes doadores. Todavia, para reduzir estes riscos, todas as coletas serão feitas com material estéril. Estes serão abertos e manipulados na presença dos sujeitos doadores. As coletas serão feitas por farmacêuticos experientes, participantes da equipe de coleta e análise, de forma a reduzir ao máximo qualquer risco de infecção e/ou traumas decorrentes do processo de coleta".

Quanto aos benefícios, "As amostras de sangue serão submetidas a um hemograma, realizado por farmacêuticos participantes da equipe de coleta e análise. O resultado deste hemograma poderá ser fornecido aos doadores, caso seja de interesse dos mesmos. Benefícios científicos relacionados com o conhecimento da biologia dos mimivírus também devem ser considerados".

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

"Estudos recentes demonstraram que pacientes que se encontram no ambiente hospitalar, principalmente imunodebilitados e respirando sob ajuda de aparelhos, representam um grupo de risco para micro-organismos patogênicos associados a amebas (MPPAs)". Segundo a justificativa do projeto, não existem dados acerca da relação entre mimivírus e o sistema interferon ou análise de genes de imunomodulação codificados por membros da família Mimiviridae.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Além do projeto de pesquisa, foram anexados o TCLE com riscos e benefícios e com direitos do participante da pesquisa (na nova versão está em forma de convite), o parecer consubstanciado de aprovação do Departamento de Microbiologia do ICB e a folha de rosto devidamente assinada pelo diretor do ICB.

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad Sl 2005
 Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901
 UF: MG Município: BELO HORIZONTE
 Telefone: (31)3409-4592 E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 329.543

Recomendações:

-Descrever a forma de recrutamento dos participantes da pesquisa, se são maiores de 18 anos de idade e o número (se 5 ou 10). foi respondido na nova versão do TCLE "Ao todo, 10 voluntários saudáveis, pertencentes à comunidade da UFMG, maiores de 18 anos, participarão da pesquisa."

-Mudar o texto inicial do TCLE, colocando-o em forma de convite. "O Sr. (Sra.) está sendo convidado pelo nosso grupo de pesquisa para participar deste estudo como voluntário na doação de sangue. Mais informações sobre a pesquisa seguem abaixo."

Adequar o cronograma.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Somos pela aprovação do projeto "Análise do perfil de expressão de mRNAs de interferons (IFNs) e de genes estimulados por IFNs (ISGs) em PBMCs humanos infectados com Acanthamoeba polyphaga mimivirus" do pesquisador Jônatas Santos Abrahão e da equipe Lorena Silva e Fábio Pio Dornas.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado conforme parecer.

BELO HORIZONTE, 09 de Julho de 2013

Assinador por:

Maria Teresa Marques Amaral
(Coordenador)

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II

CEP: 31.270-901

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br