

RAFAEL MELO PALHARES

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Análise da influência dos inibidores farmacológicos das vias celulares de MEK/ERK, JNK e PI3K/AKT no ciclo de replicação do vírus da febre amarela

UFMG
2011

Rafael Melo Palhares

Análise da influência dos inibidores
farmacológicos das vias celulares de
MEK/ERK, JNK e PI3K/AKT no ciclo de
replicação do vírus da febre amarela

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

Orientador: Professor Dr. Cláudio Antônio Bonjardim

Belo Horizonte - 2011

AGRADECIMENTOS

A toda a minha família, em especial aos meus pais e minha irmã, que acompanharam com maior proximidade essa fase e forneceram a estrutura na qual minha vida foi e continua sendo estabelecida.

À Fernanda, a pessoa que representou a constante e a base da minha vida neste último ano; quem me ajudou, aconselhou e ouviu pacientemente e sempre com muito carinho soube dizer exatamente o que eu precisava ouvir para conseguir continuar.

Ao professor Cláudio, por ter aberto as portas que me trouxeram a esse momento, pela orientação, confiança, apoio e incentivo durante essa etapa.

Aos professores Paulo, Erna e Giliane, por estarem sempre disponíveis a ajudar no aprimoramento deste trabalho.

Ao professor Maurício, por toda a ajuda disponibilizada.

Ao João Rodrigues, pelos “puxões” de orelha, pelos conselhos, pelos palpites, pelas conversas e por todo o conhecimento passado.

À tia Ângela, por toda a sabedoria e por ser a pessoa sem a qual o laboratório não conseguiria funcionar.

À Ilda, à Andreza e à Rose, sem as quais ninguém no laboratório teria o material ou o tempo para trabalhar; sem as quais nenhum projeto sairia do papel.

Aos GTS (Fernanda, Bruno, Leonardo, Jonas, Luciana, Flávia, Alice, André e Paloma) que, em conjunto, trabalham sempre se ajudando e se complementando. Que estão sempre dispostos a ajudarem, seja na bancada, seja no aprimoramento teórico. O grupo que me puxou para cima, tanto pessoalmente quanto profissionalmente.

A todos os amigos do Lab vírus. Pelas festas, pela ajuda, pelas conversas e até mesmo pelas brigas, cobranças e desavenças, pois nem sempre tudo pode ser perfeito, e isso é o que traz a emoção e a alegria do dia a dia. Obrigado por fazerem parte da minha vida e por me deixarem participar das suas.

A toda a minha turma do mestrado, que manteve a alegria durante os períodos nos quais estudar era tudo o que devíamos fazer.

A toda a equipe do Centro de Microscopia da UFMG, em especial à professora Elizabeth Ribeiro, ao Kinulpe e à Roberta, que foram essenciais na finalização desse projeto.

A todos os amigos e amigas que estiveram presentes de qualquer modo que seja durante esse período.

Finalmente, a todos do Buraco. O grupo que faz parte da minha vida por quase metade dela e que com certeza persistirá nela para sempre. *Buraco rules.*

RESUMO

Durante o processo de coevolução com seus hospedeiros os vírus adquiriram a capacidade de interceptar, mimetizar e usurpar as várias vias sinalizadoras celulares de modo a gerar condições favoráveis a sua replicação e disseminação. Os flavivírus são vírus envelopados, de forma esférica, com aproximadamente 50 nm e capsídeo de simetria icosaédrica que possuem como material genético uma molécula de RNA fita simples e senso positivo. Dentro desse grupo encontramos o *Vírus da febre amarela* (YFV), um arbovírus causador da doença que leva o mesmo nome e que se encontra disseminada pelas regiões tropicais da África a da América do Sul criando uma zona de risco para aproximadamente 900 milhões de pessoas e tendo chegado, no passado, a se espalhar por diversas outras regiões do mundo. Ainda hoje não existe um tratamento específico para os seres humanos infectados, e a manutenção desse vírus em ciclos silvestres associada a campanhas intermitentes de combate ao vetor nas áreas urbanas leva ao surgimento periódico de surtos dessa doença que pode levar à morte. O objetivo desse trabalho foi de efetuar análise da utilização de vias celulares MEK/ERK, JNK e PI3K/AKT, relacionadas com eventos de crescimento, sobrevivência, diferenciação celular, evasão da apoptose e migração por esse vírus. O estudo demonstrou que as vias de JNK e PI3K/AKT, quando inibidas por seus inibidores farmacológicos específicos, não afetam de forma negativa a multiplicação do YFV em células Vero, chegando, por outro lado, a inibição de PI3K/AKT a aumentar sutilmente a multiplicação. Já a inibição da via de MEK/ERK, por seu inibidor UO126, afetou significativamente a capacidade de multiplicação do vírus. Posteriormente, análises de cinética de ativação de MEK/ERK, associadas a análises por microscopia eletrônica de varredura e visualização do processo de morfogênese viral, levaram à conclusão de que a etapa de replicação do material genético é uma das etapas críticas sendo fortemente afetada. Esse fato pôde ser concluído devido à ausência ou má formação dos complexos de replicação viral. Em conclusão, os dados encontrados apontam que a via MEK/ERK não só é ativada pela infecção por YFV, como sua inativação leva à diminuição acentuada da capacidade de replicação do vírus.

Palavras chave: *Vírus da febre amarela*, interação vírus-hospedeiro, vias sinalizadoras, MEK/ERK, JNK, PI3K/AKT.

ABSTRACT

During the process of co-evolution with their hosts, the viruses acquired the capacity of intercept, mimic and usurp several cellular signaling pathways in a way to generate favorable conditions to the replication and dissemination. The flaviviruses are enveloped, with spherical form, and approximately 50 nm in size. Their capsid has icosahedral symmetry and their genetic material is composed by a molecule of single stranded, positive sense RNA. Inside this group we found the *Yellow fever virus* (YFV), an arbovirus causer of the disease that has the same name and is disseminated in the tropical regions of Africa and South America creating an zone of risk to approximately 900 million people and, in the past having being able to spread throughout several other regions in the world. In spite of the advances in the medicine, there is not an specific treatment to infected humans, and the maintenance of this virus in sylvatic cycles associated with intermittent campaigns of combat to the vector in the urban areas leads to the periodic outbreaks of his disease that can leads to death. The objective of this work is to effectuate analysis of the utilization of cellular pathways MEK/ERK, JNK and PI3K/AKT related to events of growth, survival, cellular differentiation, evasion of apoptosis and migration by this virus. The study demonstrated that the JNK and PI3K/AKT pathways, when inhibited by their specific pharmacological inhibitors, do not affect in a negative way the YFV multiplication in Vero cells and that the inhibition of PI3K/AKT leads to an subtle augment in the multiplication. On the other hand, the inhibition of the MEK/ERK pathway, by its inhibitor UO126, affected significantly the capacity of multiplication of the virus. Later, analyses of kinetic of activation of the last pathway, associated to analysis of scanning electron microscopy and visualization of the process of viral morphogenesis, leaded to the conclusion that the period of replication of the genetic material is one of the critical period being strongly affected. This was concluded by the absence or the malformation of the viral replication complexes. In conclusion, the data encountered points that the MEK/ERK pathway not only is activated by the YFV, but this activation also leads to an accentuated diminution in the capacity of the replication of the virus.

Key words: *Yellow fever virus*, virus-host interaction, signaling pathways, MEK/ERK, JNK, PI3K/AKT.