



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
LABORATÓRIO DE BIOLOGIA E TECNOLOGIA DE MICRO-ORGANISMOS

**Avaliação do estresse oxidativo e defesas antioxidantes em
células HepG2 infectadas pelo *Caraparu virus*
(*Bunyaviridae*)**

LETÍCIA TRINDADE ALMEIDA

**OURO PRETO
2016**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E BIOLÓGICAS
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
LABORATÓRIO DE BIOLOGIA E TECNOLOGIA DE MICRO-ORGANISMOS

**Avaliação do estresse oxidativo e defesas antioxidantes em
células HepG2 infectadas pelo *Caraparu virus*
(*Bunyaviridae*)**

LETÍCIA TRINDADE ALMEIDA

ORIENTAÇÃO: PROF(A) CINTIA LOPES DE BRITO MAGALHÃES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas. Área de Concentração: Bioquímica Estrutural e Biologia Molecular

**OURO PRETO
2016**

A447a Almeida, Leticia Trindade.
Avaliação do estresse oxidativo e defesas antioxidantes em células HepG2 infectadas pelo Caraparu virus (Bunyaviridae) [manuscrito] / Leticia Trindade Almeida. - 2016.
55f.: il.: color; grafis; tabs; mapas.

Orientadora: Profa. Dra. Cintia Lopes de Brito Magalhães.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Ciências Biológicas.
Área de Concentração: Bioquímica Estrutural e Biologia Molecular.

1. Stress (Fisiologia). 2. Antioxidantes. 3. Reação de oxidação-redução. I. Magalhães, Cintia Lopes de Brito. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU: 66.094.3

Catálogo: www.sisbin.ufop.br

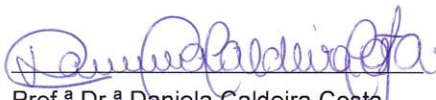


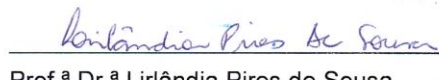
Ata da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação Intitulada:


"Avaliação do estresse oxidativo e defesas antioxidantes em células HEPG2 infectadas pelo Caraparú Virus (Bunyaviridae)"

Aos três dias do mês de março de 2016, às 13 horas e 30 minutos, na Sala de Multimídia do ICEB da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação da aluna Letícia Trindade Almeida. A defesa da dissertação iniciou-se pela apresentação oral feita pela candidata e, em seguida, arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por APROVAR a candidata. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

Membros da Banca Examinadora:


Prof.^a Dr.^a Daniela Caldeira Costa
Examinadora (UFOP)


Prof.^a Dr.^a Lirlândia Pires de Sousa
Examinadora (UFMG)


Prof.^a Dr.^a Cíntia Lopes de Brito Magalhães
Presidente (UFOP)

DATA DA DEFESA: **03/03/2016**



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS

NUPEB - Bloco I / Universidade Federal de Ouro Preto Campus Universitário
Morro do Cruzeiro / CEP 35.400-000 – Ouro Preto – MG – Brasil Tel: 55 (31) 3559-1681
E-mail: cbiol@nupeb.ufop.br / www.nupeb.ufop.br/cbiol

*Aos meus pais Mônica Trindade e
Wellington de Almeida pelo amor,
compreensão e suporte de sempre.*

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À professora **Cintia Lopes de Brito Magalhães**, pela oportunidade e exímia orientação.

Obrigada pela paciência com os erros cometidos, confiança em mim para a realização desse trabalho e por compartilhar seu conhecimento comigo. Seu apoio foi crucial para meu amadurecimento e crescimento profissional.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus por iluminar meu caminho e por me dar forças para eu agir com sabedoria quando a situação parecia desesperadora.

Ao meu pai, Wellington, que mesmo passando por um momento delicado e morando longe não mediu esforços para permitir a realização de mais esse sonho. A minha mãe, Mônica, que sempre esteve presente para me auxiliar nos momentos difíceis, dizendo sábias palavras, as quais me encorajam a continuar. Pai e mãe eu amo vocês!

À minha irmã, Ana Carolina (Nem), pela parceria incondicional e por sempre estar ao meu lado. Ao meu irmão Arthur que ainda tão pequenino me ajudou a superar os desafios com seu jeitinho sapeca. Vocês são meus amores.

À minha avó Lúcia que com suas lágrimas a cada reencontro me incentivava a seguir, e retornar com os frutos colhidos de mais essa etapa da minha vida. À minha Tia Mauricéa e aos meus primos Samuel, Camila e Alessandra, que apesar de não entenderem o meu trabalho nunca deixaram de se orgulhar e de me apoiar.

Aos colegas do LBTM, que tornaram a rotina no laboratório mais leve e divertida. Em especial, agradeço a Camila e a Fernanda que foram minhas companheiras durante esses dois anos e que me auxiliaram tanto na realização dos experimentos como na troca de conhecimentos. Muito obrigada meninas!

À FAPEMIG, ao CNPq e a CAPES pelo suporte financeiro.

À Universidade Federal de Ouro Preto e ao programa de mestrado em Ciências Biológicas pela oportunidade e ensino de qualidade.

À Ana Cláudia e Renatinha pela companhia diária, troca de experiências e muitas risadas. À querida Gabriela Faria (Brab) por sua paciência, tranquilidade, parceria e amizade. Gabi, aprendi muito com você em todos esses anos, obrigada.

Ao meu grande amigo Leonardo (Leleo) por sempre estar disponível quando precisei, seja nos momentos de “rocks” seja nos de desespero e tristeza.

Às minhas amadas Ana Maria Sampaio Rocha e Bruna Campideli, pela amizade de longa data. Cada uma com seu jeito diferente e especial me ensinaram muitas coisas. Juntas, vivenciamos várias “situações” que ficarão comigo para sempre. Vocês são inesquecíveis. Amo vocês.

Ao professor Fábio Silva pela amizade, inspiração, bom-humor e exemplo.

Agradeço também ao meu namorado, Tiago, por ser essa pessoa maravilhosa e que entrou na minha vida no momento certo. Obrigada por acreditar em mim, por sempre me aconselhar com sua maturidade, e dizer as palavras certas quando precisei, mesmo de tão longe. Essa conquista também é sua. Te amo muito.

E, por fim, agradeço a todos que torceram por mim... Muito obrigada!

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas e Siglas	ix
Lista de Tabelas	xi
Lista de Figuras	xii
Resumo	xiii
Abstract	xiv
1.Introdução	1
2.Revisão Bibliográfica	3
2.1. Arbovírus	3
2.2. Família <i>Bunyaviridae</i>	6
2.2.1. Morfologia das partículas virais	7
2.2.2. Ciclo de Replicação dos Bunyavírus.....	9
2.3. Gênero <i>Orthobunyavirus</i>	11
2.4. <i>Orthobunyavirus</i> do grupo C e o <i>Caraparu virus</i>	12
2.5. Estresse Oxidativo	15
3. Objetivos	20
3.1. Objetivo Geral	20
3.2. Objetivos Específicos	20
4. Material e Métodos	21
4.1. Multiplicação do CARV em células Vero.....	21
4.2. Titulação do CARV em células Vero.....	21
4.3. Caracterização do efeito citopático do CARV em células HepG2.....	22
4.4. Construção da curva de multiplicação do CARV em células HepG2.....	22
4.5. Dosagem das Espécies Reativas de Oxigênio.....	22
4.6. Dosagem de Malondialdeído (MDA).....	23
4.7. Dosagem da atividade total das enzimas SOD e CAT.....	25
4.7.1. SOD total.....	25
4.7.2. Catalase.....	25
4.8. Expressão do RNAm de SOD1, CAT, GAPDH e IL-6.....	26
4.8.1. Extração do RNA total e síntese do cDNA (RT-PCR).....	26
4.8.2. PCR em tempo real (qRT-PCR).....	26
4.9. Dosagem de Glutathiona total.....	27

4.10. Análise estatística.....	28
5. Resultados	29
5.1. Efeito citopático e curva de multiplicação do CARV em células HepG2.....	29
5.2. Avaliação da produção de Espécies Reativas de Oxigênio.....	31
5.3. Análise do biomarcador de estresse oxidativo Malondialdeído.....	31
5.4. Avaliação da enzima Superóxido Dismutase.....	32
5.5. Avaliação da enzima catalase.....	34
5.6. Avaliação do conteúdo celular de Glutathiona total.....	36
5.7. Avaliação da expressão do RNAm da Interleucina 6 (IL-6).....	37
6. Discussão e Conclusão	38
7. Referências	45
8. Anexos	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ALT** – Alanina Aminotransferase
AST – Aspartato Aminotransferase
BUNV – Vírus Bunyamwera
CARV – Vírus Caraparu
CAT – Catalase
CCHFV – Vírus da Febre Hemorrágica Criméia –Congo
CDC – *Centers for disease control*
CMC – Carboximetilcelulose
cDNA– DNA complementar
cRNA– RNA complementar
DMEM - Meio Dulbecco's Modified Eagle
DENV – Vírus da Dengue
ECP – Efeito Citopático
EROs – Espécies Reativas de Oxigênio
GPx – Glutaciona Peroxidase
GR – Glutaciona Redutase
GSSG – Glutaciona Oxidada
GSH – Glutaciona Total
H₂O₂ – Peróxido de Nitrogênio
HBSS – Solução Salina Equilibrada de Hanks
HBV – Vírus da Hepatite B
HCV – Vírus da Hepatite C
HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana
Hpi– horas pós- infecção
IEC– Instituto Evandro Chagas
IFNs – Interferons
MOI– Multiplicidade de Infecção
NADPH - Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NSs – Proteína não-estrutural do segmento S
NSm – Proteína não-estrutural do segmento M
OH• – Radical Hidroxil

- O₂^{•-}** – Ânion Superóxido
ORFs – *Open Reading Frame*
OROV – Vírus Oropouche
PBS – *phosphate buffered saline*
RdRp – RNA polimerase RNA dependente
RNAi – RNA de interferência
RSV – Vírus Respiratório Sincicial
RVFV – Vírus da Febre do Vale do Rift
SBV – Vírus Schmallerberg
SFB – Soro Fetal Bovino
SOD – Superóxido Dismutase
SSA – Ácido de sulfosalicílico
TBHP – Hidroperóxido *tert*- butil
TNF- α – Fator de Necrose Tumoral Alpha
UFP – Unidade Formadora de Placa
UTR – Regiões não traduzidas do genoma
vRNA – RNA viral

LISTA DE TABELAS

Tabela I – Classificação sorológica sorogrupo C.....13

Tabela II- Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores, tamanho esperado do amplificado e número de acesso no GenBank.....27

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo biológico dos arbovírus	3
Figura 2. Exemplos de surtos importantes causados por arbovírus no mundo.....	6
Figura 3. Representação esquemática das partículas virais dos integrantes da família <i>Bunyaviridae</i>	8
Figura 4. Ciclo de replicação dos Bunyavírus.....	11
Figura 5. Mapa mostrando a localização de parte do Estado do Pará, nos arredores da capital Belém, onde os <i>Orthobunyavirus</i> do grupo C foram isolados.....	14
Figura 6. Reações catalisadas pelas enzimas antioxidantes.....	16
Figura 7. Efeito citopático decorrente da infecção pelo CARV.....	30
Figura 8. Curva de multiplicação do CARV em células HepG2.....	30
Figura 9. Produção de EROs em células HepG2 após infecção pelo CARV.....	31
Figura 10. Níveis de MDA em células HepG2 infectadas pelo CARV.....	32
Figura 11. Atividade da SOD total após a infecção pelo CARV em células HepG2.....	33
Figura 12. Expressão do RNAm da SOD-1 após a infecção pelo CARV em células HepG2.....	34
Figura 13. Atividade da CAT após a infecção pelo CARV em células HepG2.....	35
Figura 14. Expressão do RNAm de CAT após infecção pelo CARV em células HepG2.....	35
Figura 15. Níveis de Glutaciona Total após a infecção pelo CARV em células HepG2.....	36
Figura 16. Expressão do RNAm da IL-6 após a infecção pelo CARV em células HepG2....	37

RESUMO

O *Caraparu virus* (CARV) é um arbovírus, membro do grupo C, da família *Bunyaviridae*. Em países da América do Sul, o CARV é um importante agente causador de doença febril em humanos e tem causado surtos múltiplos e notáveis nas últimas décadas. Entretanto, pouco se sabe sobre a patogênese característica desse vírus. Uma vez que estudos prévios têm sugerido que o estresse oxidativo, como parte da resposta celular do hospedeiro, pode desempenhar um papel importante na patogênese da infecção por uma variedade de vírus, esse trabalho teve como objetivo investigar se esse evento pode estar relacionado também a infecção pelo CARV. Para tal, foram utilizadas células humanas hepáticas (HepG2), uma vez que, em modelo animal, o CARV já se mostrou capaz de multiplicar em células do fígado e causar hepatite. Como esperado, as células HepG2 foram susceptíveis e permissivas à infecção pelo CARV. Em seguida, em células controles e infectadas, em diferentes tempos, foram avaliados os seguintes parâmetros: produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs); níveis do biomarcador de estresse oxidativo Malondialdeído (MDA); atividade e expressão gênica das enzimas antioxidantes Superóxido Dismutase (SOD) e Catalase (CAT); níveis de Glutathione total (GSH) e expressão gênica da citocina IL-6. Houve um aumento na produção das EROs nas células infectadas 15, 24 e 48 horas pós-infecção (hpi). Apesar desse aumento na produção de EROs, não houve alteração nos níveis de MDA nas células infectadas, nos diferentes tempos analisados. Por outro lado, a infecção pelo CARV alterou o status antioxidante celular, de diferentes maneiras, nos diferentes tempos. A atividade da enzima SOD mostrou-se aumentada no tempo de 6 hpi, diminuída no tempo de 15 hpi e novamente aumentada 48 hpi. Já a expressão gênica de SOD-1 aumentou nas células infectadas 48 hpi. A atividade da enzima CAT mostrou-se aumentada 24 hpi e diminuída 48 hpi e os níveis de expressão do seu RNAm não alteraram nos diferentes grupos. Ainda, níveis de Glutathione aumentaram 15 hpi e diminuíram 24 e 48 hpi. Com relação ao perfil inflamatório, a infecção causou um aumento na expressão gênica de IL-6, nos tempos de 15, 24 e 48 hpi. Assim, esse trabalho sugere que, nesse modelo de infecção pelo CARV, ocorre a produção de EROs e alteração no status antioxidante celular, mas sem dano oxidativo evidente.

ABSTRACT

Caraparú virus (CARV) is a member of group C of the *Bunyaviridae* family. In South American countries, CARV is among the common agents of human febrile illness and have been causing multiple outbreaks in recent decades. Nevertheless, there is few knowledge about the pathogenic characteristics of these viruses. Since previous studies has suggested that oxidative stress, as part of the host cell response, might play an important role in the pathogenesis of a variety of RNA viral infections, this study aimed to investigate whether this event can also be related to CARV infection. To achieve that, human liver cells were used (HepG2), given that an animal model has demonstrated that the CARV can multiply in liver cells and cause hepatitis. As expected, the HepG2 cells were susceptible to and permissive for CARV infection. Next, in control and infected cells at different times, the following parameters were evaluated: Reactive Oxygen Species Production (ROS); biomarker of oxidative stress levels malondialdehyde (MDA); activity and gene expression of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT); total glutathione levels (GSH) and gene expression of IL-6. ROS production increased in infected cells in times 12, 24 and 48 hours post infection (hpi), but any changes were noticed in the biomarker of oxidative stress (malondialdehyde) in infected cells. However, CARV infection altered cellular antioxidant status in different ways at different times. The SOD activity was increased 6 hpi, reduced at 15 hpi time and increased again 48 hpi, while the gene expression of SOD-1 in infected cells increased 48 hpi. The CAT activity was increased 24 hpi and decreased 48 hpi, plus their mRNA expression levels did not change in different groups. Still, glutathione levels increased 15 hpi and decreased 24 hpi and 48 hpi. Regarding the inflammatory profile, the infection caused an increase in IL-6 gene expression at 15, 24 and 48 hpi time. This work reveals that ROS production and changes the cellular antioxidant status occurs in this model of CARV infection without obvious oxidative stress.

1 - INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, várias doenças relacionadas a agentes etiológicos virais têm ganhado destaque. Muitas dessas doenças são ocasionadas por vírus até então desconhecidos ou por vírus cujas doenças haviam sido controladas ao longo dos anos. Um exemplo de virose emergente já bem consolidada entre a população humana é a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), causada pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). Dentre as viroses reemergentes destaca-se a Dengue, que é uma doença cosmopolita e que causa um grande número de óbitos todos os anos. Desse modo, as viroses emergentes e reemergentes chamam a atenção das autoridades sanitárias em todo o mundo, pois surgem como problemas de saúde pública importantes, tanto em áreas urbanas quanto em áreas rurais. Alterações no ecossistema e, principalmente, no comportamento humano podem propiciar a disseminação dessas viroses, que por sua vez, afetam toda a sociedade.

As doenças virais transmitidas por vetores artrópodes (arboviroses) estão entre as mais preocupantes, visto que elas apresentam grande capacidade de dispersão. Associado a isso, para muitas dessas doenças não há tratamento específico e/ou vacinas disponíveis. Além disso, o combate aos vetores é muito difícil, já que eles estão altamente adaptados não só ao ambiente urbano como também aos hábitos de vida humanos.

O ciclo natural dos arbovírus restringia-se ao ambiente silvestre, visto que a circulação dos vetores transmissores era restrita a esses ambientes. Entretanto, o desmatamento, uso inadequado do subsolo, construção de rodovias e o crescimento urbano desorganizado, dentre outros fatores, contribuíram para a exposição da população a um número considerável de patógenos emergentes.

No Brasil, durante a década de 1950, vários arbovírus foram isolados na Floresta Amazônica, mais precisamente, no Estado do Pará. Nessa época, houve um recrutamento de vários trabalhadores para a região com o objetivo de desmatar a floresta nativa e transformá-la em grandes plantações. Associado a isso, foram relatados vários surtos epidêmicos ocasionados por agentes virais, sendo relevantes os números de casos ocasionados por arbovírus, dentre eles, os bunyavírus do Grupo C.

O *Caraparu virus* (CARV BeAn 3994), um bunyavírus do Grupo C e objeto de estudo deste trabalho, foi isolado em 1956 na floresta de Utinga, no Estado do Pará, do soro de macacos

Cebus apella, e mais tarde, de seres humanos e de artrópodes, sendo assim denominado pelo nome do primeiro paciente do qual foi isolado.

Até pouco tempo atrás, acreditava-se que os bunyavírus do Grupo C se limitavam à região Amazônica brasileira. No entanto, sabe-se hoje que sua distribuição é subestimada tendo em vista o isolamento do CARV fora dos arredores da Amazônia. Desse modo, o aparecimento de vírus emergentes do Grupo C não seria surpreendente, uma vez que outras arboviroses que romperam a fronteira entre o ambiente silvestre e o urbano já foram registradas em nosso meio, como por exemplo, a dengue, febre amarela e a febre do oropouche.

A falta de estudos prévios associada à negligência das autoridades de saúde dificultam o controle e prevenção de arboviroses que até então estavam “escondidas”. Por isso, é de extrema importância o trabalho dos virologistas que dedicam seus estudos a esses vírus, visto que, conhecendo melhor como é o comportamento e as doenças por eles ocasionadas é possível impedir, ou, pelo menos, amenizar uma epidemia em um tempo reduzido.

O CARV foi, diversas vezes, isolado de seres humanos expostos na Amazônia brasileira, causando uma síndrome febril característica. Apesar da doença em humanos ser há tanto conhecida, foram poucos os estudos subsequentes pautando esse vírus no que diz respeito a sua patogenia. Assim, desde que inúmeros trabalhos vêm demonstrando que o estresse oxidativo desempenha um papel importante na patogênese de uma variedade de vírus e que a correlação desse evento na patogênese dos bunyavírus é muito pouco explorada, esse trabalho teve como objetivo investigar se esse evento poderia estar relacionado a infecção pelo CARV.

Para tal, avaliamos em células hepáticas humanas HepG2 o perfil oxidante e antioxidante após infecção pelo CARV. Os resultados obtidos até o momento nos permitem inferir que nesse modelo de infecção pelo CARV não há dano oxidativo evidente, apesar de ter ocorrido um aumento de substâncias pró-oxidantes (aumento de EROs) e um desbalanço no sistema antioxidante. No entanto, mais estudos são necessários para melhor compreender a homeostase oxidativa na infecção pelo CARV. Assim, ampliar os conhecimentos sobre os aspectos relacionados a patogênese do CARV é de importância primordial, visto que essa doença é um problema de saúde pública e potencialmente de caráter emergente.

2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 – Arbovírus

Os arbovírus (*arthropod-borne virus*) são vírus mantidos na natureza em ciclos complexos que envolvem vetores artrópodes, principalmente mosquitos e carrapatos. Tais vetores transmitem esses micro-organismos alimentando-se do sangue de animais infectados, sobretudo aves e mamíferos (MOURÃO et al., 2015). Entre os hospedeiros artrópodes, esses vírus podem ainda ser transmitidos pela via transovariana e venérea (CRUZ & VASCONCELOS, 2008), como mostrado na Figura 1.

Os arbovírus normalmente são mantidos no ambiente silvestre. Entretanto, o crescimento desordenado das cidades, e conseqüentemente da população, favoreceu a entrada dessas doenças nas áreas urbanas. Certas arboviroses têm surgido com mais frequência no ambiente urbano, sob forma epidêmica, tais como Febre do Dengue, Febre Oropouche, Febre Mayaro, Febre Amarela e Febre Chikungunya (DHANWANI et al., 2012; MOURÃO et al., 2015; SANTOS et al., 2014).

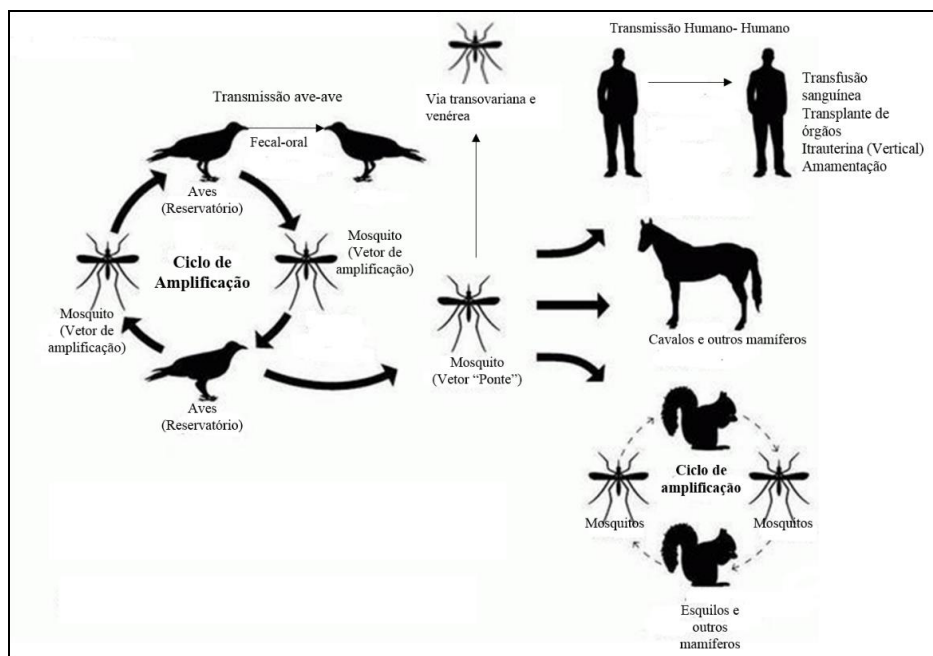


Figura 1: Ciclo biológico dos arbovírus. Os arbovírus são mantidos na natureza em ciclos complexos que envolvem vetores artrópodes e hospedeiros vertebrados. Durante o ciclo de amplificação, as fêmeas infectadas transmitem os vírus para aves e mamíferos durante o repasto sanguíneo. Entre os vetores artrópodes, a transmissão pode ocorrer via transovariana e venérea. Fonte: Adaptado de BLITVICH, 2008.

Os arbovírus estão presentes principalmente nas regiões tropicais e subtropicais, onde os mosquitos e outros vetores artrópodes são mais abundantes. Nessas localidades, o clima quente e úmido favorece a manutenção das arboviroses tornando-as um problema de saúde pública e de caráter emergente (FORSHEY et al., 2010). Entretanto, muitas arboviroses também circulam entre espécies distribuídas nas áreas temperadas do globo (LIANG et al., 2015).

A emergência e reemergência das arboviroses é um fenômeno comum e está relacionada com a capacidade de evolução e adaptação das espécies na natureza. Durante a infecção de múltiplos e distintos hospedeiros, os vírus podem ser selecionados culminando no surgimento de cepas mais virulentas ou melhor adaptadas (FIGUEIREDO, 2007).

O termo arbovírus não é um indicador taxonômico, e sim descreve a exigência de um vetor para sua transmissão (LIANG et al., 2015). Atualmente, estão registrados 547 vírus no *Catalogue of Arbovirus and Certain Other Viruses of Vertebrates* (<https://wwwn.cdc.gov/arbocat/VirusBrowser.aspx>, 2015), os quais estão distribuídos em 8 famílias e 14 gêneros. Desses 547 vírus, 140 causam doenças em humanos. Com relação a infecções humanas, os mais importantes arbovírus pertencem às famílias *Bunyaviridae*, *Flaviviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae* e *Togaviridae* (LIANG et al., 2015; MOURÃO et al., 2015). Vale lembrar ainda, que nem todos os vírus pertencentes às famílias supracitadas são necessariamente arbovírus.

Em sua maioria, os arbovírus causam uma doença com duração de 1-2 semanas e evolução benigna. Porém, alguns podem causar sérios quadros clínicos que podem culminar na morte ou incapacitação do paciente, desse modo, causando prejuízos tanto sociais quanto econômicos (LIANG et al., 2015).

As manifestações clínicas das arboviroses em humanos são divididas em quatro categorias: febre, febre exantemática, febre hemorrágica e encefalite. O que determina cada uma delas são fatores como inóculo, tempo de exposição, cepa do vírus e fatores do hospedeiro (GUBLER, 2002). É importante ressaltar que, um mesmo arbovírus pode causar diferentes sintomas e, por outro lado, a mesma sintomatologia pode ser causada por diferentes arbovírus.

As políticas de vigilância sobre os arbovírus variam de uma região para outra, sendo que em muitos locais há completa ausência dessa vigilância. A falta de conhecimento interdisciplinar sobre as doenças causadas por esses vírus, bem como sobre seus vetores e

epidemiologia fazem com que a real prevalência e distribuição das arboviroses seja subestimada (LIANG et al., 2015).

No Brasil, os arbovírus apresentam ampla distribuição geográfica, com predomínio nas regiões mais quentes e úmidas (CRUZ & VASCONCELOS, 2008). Mais de 200 espécies já foram isoladas e, aproximadamente 40 delas causam doenças em humanos (FIGUEIREDO, 2007). A região norte é a que apresenta uma maior concentração de estudos pautando os arbovírus. A partir do ano de 1954, aproximadamente 200 diferentes tipos de arbovírus, distribuídos em várias famílias foram isolados na Amazônia brasileira, sendo a maioria deles de patogenicidade desconhecida ao homem (CRUZ & VASCONCELOS, 2008).

As mudanças ambientais desencadeadas por modificações climáticas naturais cíclicas ou por implantação de projetos de extrativismo dos recursos naturais (desmatamento, construção de barragens e ferrovias, exploração de minérios) podem aumentar a prevalência dos vetores virais, criar novos reservatórios ou ainda, induzir os arbovírus a se adaptarem a novos ciclos de manutenção. Além disso, esses vírus podem viajar grandes distâncias e invadir outros países e até mesmo continentes, podendo ocasionar uma pandemia (CRUZ & VASCONCELOS, 2008; FIGUEIREDO, 2007; LIANG et al., 2015).

Dentre os arbovírus, os vírus da família *Bunyaviridae* são os únicos cuja gama de hospedeiros inclui invertebrados, vertebrados e plantas. Esse amplo espectro de possíveis hospedeiros, juntamente com as alterações no meio ambiente, contribuíram para a classificação dos bunyavírus na categoria A (alto risco) pelo comitê de medidas de prevenção a patógenos emergentes do “Centers for Disease Control” (CDC), muito embora alguns deles não tenham sido completamente caracterizados (BARR et al., 2005; WALTER & BARR, 2011).

A Figura 2 ilustra epidemias importantes causadas por arbovírus que acometeram a população mundial ao longo dos anos. Destacando, dentre elas, a epidemia ocasionada pelo *Rift Valley fever virus* (RVFV), um importante patógeno membro da família *Bunyaviridae*.

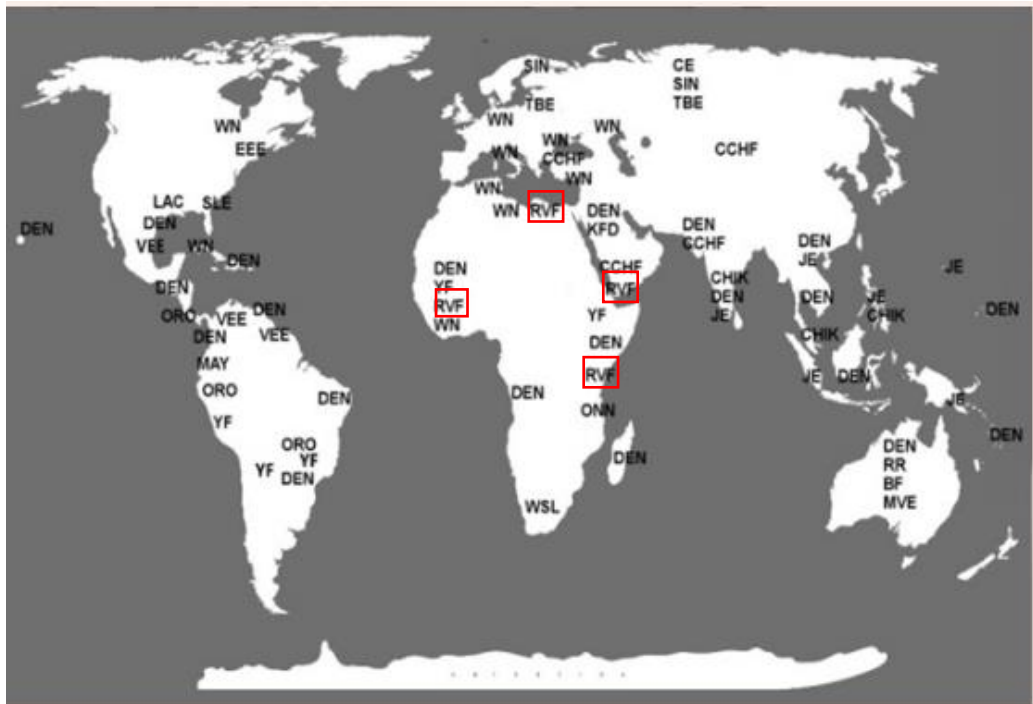


Figura 2: Exemplos de surtos importantes causados por arbovírus no mundo. Diagrama ilustrando vários surtos inesperados de arbovírus ocorridos em diversas regiões do globo. Em destaque, as epidemias ocasionadas pelo RVFV, um importante bunyavírus. É provável que nos próximos anos outras partes do mundo sejam afetadas, incluindo as regiões que se encontram fora da zona tropical. Fonte: PEGO et al., 2014.

2.2 - Família *Bunyaviridae*

A família *Bunyaviridae* é a maior e mais diversa dentre as famílias de vírus com genoma RNA (ELLIOTT, 2014). Foi formalmente estabelecida em 1975 e é formada por mais de 350 vírus, agrupados em cinco gêneros: *Orthobunyavirus*, *Hantavirus*, *Nairovirus*, *Phlebovirus* e *Tospovirus*. Juntos, esses vírus infectam uma variedade de animais e plantas, sendo que alguns deles são capazes de causar doenças graves em seus respectivos hospedeiros (WALTER & BARR, 2011) e são mantidos na natureza como zoonoses (FIGUEIREDO, 1999).

A espécie-tipo dessa família é o *Bunyamwera virus* (BUNV), o qual foi o primeiro bunyavírus a ser isolado e identificado em mosquitos do gênero *Aedes*, durante um surto de febre amarela em Uganda, no ano de 1943 (ELLIOTT, 2014). Além de nomear a família, o vírus Bunyamwera é utilizado como modelo para várias das patogêneses causadas por bunyavírus (BARR et al., 2005).

Com exceção dos *Hantavirus*, os quais são transmitidos através da inalação de aerossóis de excretas de roedores, os demais membros da família são arbovírus e são transmitidos por mosquitos, flebótomos, carrapatos, além de outros vetores artrópodes (FIGUEIREDO, 1999). Geralmente há uma especificidade entre vetor artrópode e hospedeiro vertebrado, porém alguns vírus, como por exemplo, o RVFV, são mais promíscuos, podendo infectar muitas espécies diferentes (ELLIOTT & WEBER, 2009).

Os bunyavírus apresentam ampla distribuição mundial. Podem ser encontrados em todos os continentes, em qualquer latitude, nas mais variadas condições ambientais e em diferentes organismos (SOLDAN & GONZÁLEZ-SCARANO, 2005). Muitos membros da família são considerados patógenos emergentes, visto que as mudanças no clima global têm proporcionado a migração e o estabelecimento dos vetores desses vírus em regiões setentrionais do globo, como a Europa. Já é amplamente aceito que quando um vetor se estabelece em um novo ambiente, os vírus a que é susceptível irão segui-lo. Desse modo, a exposição de novas populações humanas torna-se inevitável (WALTER & BARR, 2011).

As doenças causadas pelos bunyavírus apresentam um amplo espectro de sintomas. Na maioria dos casos, ocorre uma doença febril de curta duração ou assintomática, que, embora não leve o paciente ao óbito, pode ser economicamente significativa devido à incapacidade dos trabalhadores de exercerem suas funções. Entretanto, alguns desses vírus causam doenças graves, como febres hemorrágicas, encefalites, além de doenças renais e respiratórias (ELLIOTT & WEBER, 2009). No Brasil, já foram isolados vários vírus da família *Bunyaviridae*, sendo o mais importante deles, do ponto de vista epidemiológico, *Oropouche virus* (OROV), por causar epidemias frequentes na região Amazônica, ficando atrás apenas das epidemias ocasionadas pelo *Dengue virus* (DENV) (FIGUEIREDO, 1999).

É importante ressaltar que, a extensão real das doenças ocasionadas pelos bunyavírus não é conhecida, pois, na maioria das vezes, esses vírus circulam em regiões onde há também outras doenças como a Malária e a Dengue fazendo com que o diagnóstico correto não seja alcançado (ELLIOTT & WEBER, 2009).

2.2.1 - Morfologia das partículas virais

As partículas virais da família *Bunyaviridae* são esféricas e envelopadas, medindo de 80 a 100 nm de diâmetro, e apresentam projeções glicoproteicas na superfície do seu envelope. O

genoma é formado por três fitas de RNA com polaridade negativa, denominadas pelo seu tamanho: pequeno S (“small”), médio M (“medium”) e grande L (“large”). Normalmente, vírus do mesmo gênero compartilham o mesmo comprimento de cada segmento, sendo que a organização genética dos segmentos é semelhante em todos os gêneros. As sequências 5’ e 3’ terminais (UTR- regiões não traduzidas do genoma) fazem ligações estáveis, não covalentes, por meio do pareamento de bases, as quais permitem aos segmentos de RNA apresentarem-se na forma circular. Além disso, funcionam como promotores tanto para a transcrição quanto replicação de cada segmento (ELLIOTT, 2014; WALTER & BARR, 2011).

As proteínas estruturais dos vírus da família *Bunyaviridae* são a ribonucleoproteína N, que é codificada pelo segmento S do RNA viral; as glicoproteínas Gn e Gc, do envelope viral, as quais são codificadas pelo segmento M; e a RNA polimerase RNA dependente viral, que é codificada pelo segmento L (ELLIOTT, 2014). A Figura 3 mostra uma representação esquemática dos vírions da família *Bunyaviridae*.

Dentro da família, os gêneros *Tospovirus*, *Phlebovirus* e *Orthobunyavirus* codificam ainda, as proteínas não estruturais presentes no segmento M (NSm) ou no segmento S (NSs), por diferentes janelas abertas de leituras (ORFs) (WALTER & BARR, 2011).

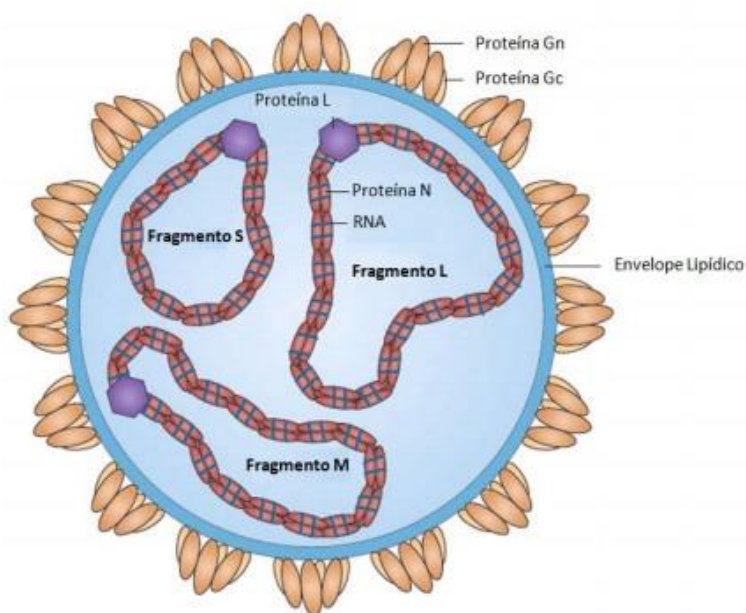


Figura 3: Representação esquemática das partículas virais dos integrantes da família *Bunyaviridae*. Os três segmentos genômicos de polaridade negativa (S, M e L) estão complexados com a proteína do nucleocapsídeo N para formar os ribonucleocapsídeos. O nucleocapsídeo e a polimerase viral L (RNA polimerase RNA dependente) estão empacotados dentro de um envelope lipídico contendo as glicoproteínas Gn (ou G2) e Gc (ou G1). Fonte: Adaptado de ELLIOTT, 2014.

A proteína N (20-50 KDa) tem como função envolver as três formas de RNA viral senso-negativo (vRNA), bem como o RNA antígenômico senso-positivo (cRNA), formando estruturas biologicamente ativas, as chamadas ribonucleoproteínas. Essas estruturas protegem o RNA viral da ação das RNAases presentes no citoplasma das células hospedeiras. Além disso, controla a atividade da polimerase viral durante os processos de transcrição e replicação. Desse modo, a proteína N tem papel importante na morfogênese e multiplicação dos bunyavírus (ELLIOTT, 2014; WALTER & BARR, 2011).

O segmento M codifica uma poliproteína que é clivada formando Gn e Gc, as quais são glicosiladas, passando então a serem chamadas de glicoproteínas. Tais proteínas apresentam domínios transmembrana, que indicam o local específico de ancoramento, bem como sequências hidrofóbicas e carboxi-terminais. Além de estarem relacionadas com a adsorção viral, essas duas glicoproteínas estão intimamente relacionadas com a montagem das partículas virais, visto que, esse processo só ocorre após o acúmulo de Gn e Gc no complexo de Golgi (FIGUEIREDO, 1999).

A proteína NSs está relacionada com a diminuição da síntese de RNA do hospedeiro e inibição da síntese e a resposta celular ao Interferons (IFNs), tendo um papel importante na patogênese viral, ou seja, pode ser considerada um fator de virulência. Além disso, essa proteína é capaz de inibir a síntese de RNAi (RNA de interferência) que poderia ser um mecanismo antiviral da célula hospedeira (ELLIOTT & WEBER, 2009; VAN KNIPPENBERG et al., 2013; WEBER et al., 2001).

A NSm se acumula no complexo de Golgi da célula infectada independentemente das demais proteínas virais. Como essa proteína se desloca para o local onde ocorre a maturação das partículas virais, sugere-se que ela pode estar relacionada com montagem e brotamento dos vírus. Estudos já apontaram que essa proteína não é essencial para a viabilidade dos vírus, entretanto, as partículas que apresentam a NSm modificada, multiplicam mais lentamente quando comparadas com os vírus selvagens (SALANUEVA et al., 2003).

A RNA polimerase RNA dependente (RdRp) promove a transcrição e replicação dos genomas dos vírus e estas funções dependem da produção de novas proteínas N durante o processo de replicação viral (ELLIOTT, 2014).

2.2.2- Ciclo de replicação dos Bunyavírus

Os bunyavírus se multiplicam exclusivamente no citoplasma das células infectadas (Figura 4). A infecção inicia-se com a interação entre as glicoproteínas presentes no envelope viral com os receptores das células hospedeiras (ainda não se sabe exatamente quais são esses receptores). Tal interação é realizada pela proteína Gn para células de vertebrados e pela Gc para células de artrópodes. Após a adsorção, os vírus invadem as células por meio do processo de endocitose e fundem seus envelopes com as membranas endossômicas, o que permite ao nucleocapsídeo viral chegar até o citoplasma. O genoma viral permanece na forma de ribonucleoproteína, sem o desnudamento total do capsídeo, o qual se apresenta no formato circular, associado a várias cópias da proteína N e poucas cópias da RNA polimerase viral (ELLIOTT, 2014; WALTER & BARR, 2011).

O processo denominado de transcrição primária inicia-se com o desnudamento do genoma viral. Nessa etapa, o RNA viral senso negativo (vRNA) é transcrito em mRNA, o qual será traduzido nas proteínas essenciais para a morfogênese dos novos vírus. Esse fenômeno só é possível se houver interação da RdRp com as ribonucleoproteínas virais. A polimerase viral, por sua vez, catalisa a transcrição dos mRNAs, a qual é ativada por iniciadores oriundos da célula hospedeira (ELLIOTT, 2014; WALTER & BARR, 2011).

Os segmentos S e L são traduzidos em ribossomos livres no citoplasma. Já o segmento M é traduzido em ribossomos associados ao retículo endoplasmático rugoso. Após a tradução, a proteína L não sofre nenhuma modificação pós traducional e a polimerase é liberada com suas atividades funcionais, ao passo que a proteína M é clivada formando Gn e Gc após a glicosilação (ELLIOTT, 2014).

O processo de replicação do genoma viral só inicia depois que a proteína N interage com o RNA complementar (cRNA) sintetizado a partir do vRNA. Nessa etapa, a polimerase sintetiza uma fita nova sem a necessidade de um iniciador, para que o transcrito formado tenha o mesmo tamanho do genoma. Após sua síntese, o RNA viral associa-se com as proteínas L e N formando os nucleocapsídeos que se acumulam no complexo de Golgi, ocorrendo então a morfogênese (ELLIOTT, 2014).

Após o processo de montagem, as novas partículas virais saem do complexo Golgi dentro de vesículas. Tais vesículas são transportadas para a periferia da célula onde a progênie viral é liberada para o meio extracelular através do processo de exocitose por meio da fusão das membranas das vesículas citoplasmáticas com a membrana da célula (ELLIOTT, 2014).

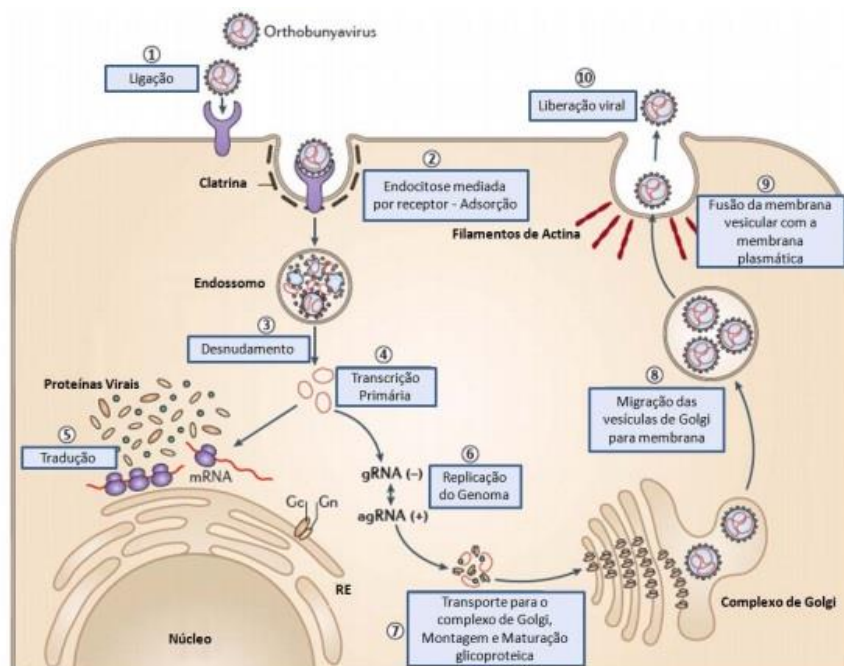


Figura 4: Ciclo de replicação dos Bunyavírus. (1) Ligação da partícula viral no receptor da célula hospedeira. (2) Internalização do vírus por endocitose. (3) A acidificação da vesícula endossomal permite o desnudamento do genoma e fusão das membranas viral e endossômica. (4) A RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) catalisa a transcrição primária. (5) Tradução do mRNA. (6) Os três segmentos de RNA de polaridade negativa são convertidos em RNAs de polaridade positiva para permitir a replicação do genoma viral. (7) As ribonucleoproteínas são transportadas para o complexo de Golgi (membranas) e modificadas pela inserção das glicoproteínas Gn e Gc; novas partículas virais começam a ser formadas. (8) As partículas recém formadas são transportadas dentro de vesículas oriundas do complexo de Golgi para a periferia celular. (9) Fusão das membranas das vesículas com a membrana celular, podendo ser facilitada por filamentos de actina. (10) Liberação dos vírions (partículas infecciosas) para o meio extracelular. Fonte: FERREIRA, 2015.

2.3 - Gênero *Orthobunyavirus*

O gênero *Orthobunyavirus* é o maior da família *Bunyaviridae*, incluindo 174 vírus, os quais estão subdivididos em 18 sorogrupos, classificados de acordo com os antígenos presentes na proteína N. Porém, a classificação dos *Orthobunyavirus* ainda é complexa, pois, pouco se sabe sobre os aspectos moleculares desses vírus. Além disso, os muitos eventos de recombinação ocorridos ao longo do processo evolutivo contribuem para aumentar a dificuldade na classificação/ taxonomia de tais vírus (HART et al., 2009; DE BRITO MAGALHÃES et al., 2011).

Os orthobunyavírus constituem um grupo de vírus emergentes capazes de causar danos à saúde humana e animal. Pelo menos 30 vírus pertencentes a esse gênero estão associados com doenças graves em humanos e, assim como os demais bunyavírus, causam em

seus hospedeiros uma variedade de sintomas, tais como febre (*Oropouche virus*), encefalite (*La Crosse virus*) ou febre hemorrágica (*Ngari virus*). Outros orthobunyavírus podem ainda causar aborto ou teratogênese no gado, como é o caso do *Akabane virus* e do *Cache Valley virus* (ELLIOTT, 2014; HART et al., 2009). Recentemente, no ano de 2011, o *Schmallenberg virus* (SBV) foi identificado pela primeira vez nas proximidades da fronteira alemã-holandesa, causando doença no gado. Posteriormente, a infecção pelo SBV alastrou-se por vários países da Europa, atingindo milhares de animais, apresentando os seguintes sinais clínicos: febre, redução na produção de leite e diarreia (ELLIOTT, 2014; WERNIKE et al., 2013).

A maioria dos orthobunyavírus são transmitidos pela picada de mosquitos e o ciclo natural desses vírus envolve hospedeiros vertebrados de sangue quente, os quais podem atuar como “hospedeiros amplificadores” ou ainda, auxiliar na disseminação desses vírus pelo planeta através de processos migratórios, muito comuns entre as aves (HART et al., 2009).

No Brasil, entre os orthobunyavírus, o mais importante é o OROV, pertencente ao sorogrupo Simbu, o qual é responsável por grandes e recorrentes epidemias, principalmente na região norte do país. Contudo, outros vírus desse gênero foram várias vezes isolados no território nacional e agrupados no sorogrupo C. Tais vírus, devido ao risco de se tornarem emergentes, vêm despertando interesse de pesquisadores brasileiros, engajados na desafiante tarefa de elucidar os mais diversos aspectos de sua biologia, epidemiologia e patogenicidade.

2.4 – *Orthobunyavirus* do grupo C e o *Caraparu virus*

O sorogrupo C é formado por 14 vírus classificados de acordo com suas características antigênicas, determinadas através de testes de fixação de complemento, soroneutralização e inibição da hemaglutinação (Tabela I) (NUNES et al., 2005). Esses vírus foram descritos pela primeira vez na Amazônia brasileira durante os anos de 1950-1960. Nesse período, no Estado do Pará, ocorriam intensos processos migratórios de trabalhadores que se deslocavam para esse estado a fim de transformar a floresta nativa em grandes áreas de plantações. Vários surtos e epidemias virais foram reportados a cercania da cidade de Belém, sendo relevantes os números de casos atribuídos a arboviroses inespecíficas ou não caracterizadas (CAUSEY et al., 1961).

Tabela I: Classificação sorológica sorogrupo C

Classificação sorológica	Espécies
Complexo Caraparu	<i>Caraparu virus</i> (CARV)
	<i>Ossa virus</i> (OSSAV)
	<i>Apeu virus</i> (APEUV)
	<i>Vinces virus</i> (VINV)
	<i>Bruconha virus</i> (BRCV)
Complexo Madrid	<i>Madrid virus</i> (MADV)
Complexo Marituba	<i>Marituba virus</i> - BeAn15 (MTBV)
	<i>Marituba virus</i> - 63U-11 (MTBV)
	<i>Murucutu virus</i> (MURV)
	<i>Restan virus</i> (RESV)
	<i>Nepuyo virus</i> (NEPV)
Complexo Oriboca	<i>Gumbo limbo virus</i> (GLV)
	<i>Oriboca virus</i> (ORIV)
	<i>Itaqui virus</i> (ITQV)

Fonte: Adaptado de (NUNES, 2005)

Assim, o Laboratório de Vírus de Belém, localizado no Instituto Evandro Chagas (IEC), em associação com a Fundação Rockefeller (Nova Iorque, EUA), isolaram e identificaram os vários arbovírus circulantes naquela região da Amazônia brasileira (Figura 5). O projeto teve início em 1954 e os vírus foram isolados de amostras obtidas de pacientes com doença febril, de animais sentinelas, bem como de animais selvagens e vetores artrópodes. No total foram isoladas 451 amostras de arbovírus entre os anos de 1951 a 1959 (CAUSEY et al., 1961).

As amostras dos vírus isoladas foram liofilizadas e, juntamente com os anticorpos neutralizantes correspondentes, enviadas para a Fundação Rockefeller. Na ocasião, estudos de soroneutralização foram realizados com as amostras brasileiras e de isolados de outras partes do mundo. Desse modo, os 451 isolados foram agrupados em 18 sorogrupos, sendo 11 desses correlacionados ao gênero *Orthobunyavirus* (CAUSEY et al., 1961).

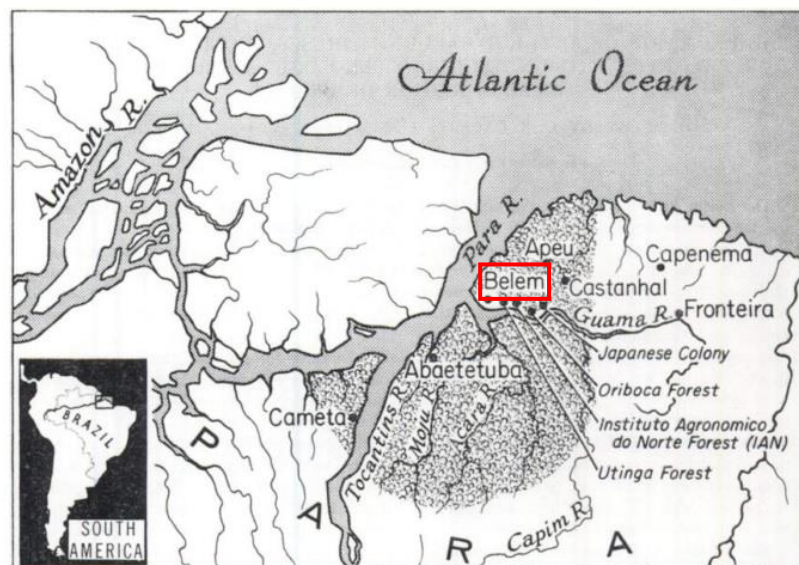


Figura 5: Mapa mostrando a localização de parte do Estado do Pará, nos arredores da capital Belém, onde os *Orthobunyavirus* do grupo C foram isolados. A área em destaque corresponde à região estudada por Shope e sua equipe, de onde foram isoladas as 451 amostras de arbovírus entre os anos de 1951-1959. Fonte: CAUSEY et al., 1961.

O CARV, amostra BeAn3994, foi isolado pela primeira vez em 1956, na floresta de Utinga (Pará, Brasil), do soro de macacos da espécie *Cebus apella*. Subsequentemente, na mesma região, o vírus foi isolado do sangue de trabalhadores florestais febris e artrópodes (CAUSEY et al., 1961).

Apesar de ter sido isolado originalmente no Pará, o CARV foi isolado mais tarde de mosquitos da espécie *Culex sacchettiae* e de um caso clínico de um paciente na região do Vale do Ribeira no Estado de São Paulo, no sudeste do Brasil. O caso descrito foi de um biólogo que conduzia estudos entomológicos na região, em 1987, que após infectar-se apresentou febre alta, cefaleia, mialgia e prostração. Após 48 horas, o paciente foi tratado com ácido acetilsalicílico e os sintomas desapareceram. A investigação epidemiológica nessa região mostrou alta taxa de soropositividade para esse vírus em humanos e animais, como roedores, marsupiais e pássaros (IVERSSON et al., 1987).

Em humanos, a chamada “febre Caraparu” causa no paciente febre alta, cefaleia e mialgia, ainda, podem ocorrer náuseas, vômitos, fraqueza e fotofobia. A doença normalmente tem uma evolução benigna, com 4-5 dias de duração (CAUSEY et al., 1961; IVERSSON et al., 1987).

Apesar de já ter sido isolado diversas vezes de pacientes humanos e apresentar uma alta soropositividade em moradores da região norte do Brasil, pouco se sabe sobre a

patogênese desencadeada pós-infecção pelo CARV. Em animais foi demonstrado que o CARV apresenta hepatotropismo. Brinton e colaboradores (1993) mostraram que, após a infecção intracerebral com o CARV em camundongos neonatos (2 a 3 dias de vida), os animais desenvolvem hepatite e encefalite.

Em um outro estudo, realizado pelo nosso grupo de pesquisa, camundongos BALB/c infectados com o CARV via subcutânea desenvolveram hepatite aguda, com aumento sérico das transaminases hepáticas. Ainda, nesse mesmo trabalho, nós demonstramos que o estresse oxidativo não estava presente no fígado dos animais infectados, mas por outro lado, um desbalanço no *status* antioxidante celular foi encontrado nesse mesmo órgão (CAMINI et al., 2014).

2.5 - Estresse Oxidativo

O termo “Espécies Reativas de Oxigênio” (EROs) refere-se a uma gama de metabólitos derivados do oxigênio molecular (O_2). O radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) é o principal produto formado da redução do O_2 por meio da transferência de um único elétron. As EROs são produzidas no metabolismo celular normal. Cerca de 1 a 2% do oxigênio utilizado na respiração mitocondrial é convertido nessas espécies, durante a fosforilação oxidativa (cadeia transportadora de elétrons), que ocorre na membrana interna das mitocôndrias (KOWALTOWSKI & VERCESI, 1999).

A geração regulada das EROs tem papel importante em várias funções vitais, como por exemplo, na resposta do sistema imune do hospedeiro frente a infecções virais e bacterianas e nos mecanismos de sinalização celular (AGUIRRE & LAMBETH, 2010; GEISZT & LETO, 2004). Entretanto, quando são produzidas em excesso, as EROs causam várias formas de danos teciduais, incluindo danos às proteínas, aos lipídios das membranas celulares, e até mesmo ao DNA. Entre esses efeitos deletérios destacam-se o envelhecimento, apoptose e necrose. Além disso, as EROs estão relacionadas com a patogênese de uma ampla gama de doenças infecciosas e não infecciosas (HALLIWELL & CROSS, 1994).

Em indivíduos saudáveis, os níveis das EROs são controlados pela ação dos sistemas antioxidantes enzimáticos e/ou não enzimáticos. Define-se como antioxidante “qualquer substância que previna, atrase, ou remova o dano oxidativo de uma molécula alvo”

(HALLIWELL, 2007). O sistema antioxidante enzimático é caracterizado pelas enzimas Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT) e Glutathiona Peroxidase (GPx).

A primeira ERO produzida é o $O_2^{\cdot-}$, o qual é metabolizado a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pelas enzimas SOD1, 2 ou 3, dependendo do sítio primário de produção do $O_2^{\cdot-}$. As enzimas CAT e GPx, por sua vez, detoxificam o H_2O_2 pela geração de água e oxigênio molecular (Figura 6) (HALLIWELL, 2007; HOSAKOTE et al., 2009).

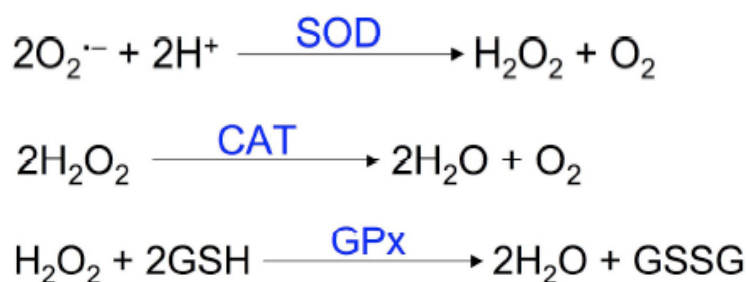


Figura 6: Reações catalisadas pelas enzimas antioxidantes. A enzima Superóxido Dismutase (SOD) converte o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Enquanto as enzimas Catalase (CAT) e Glutathiona Peroxidase (GPx) detoxificam H_2O_2 em água e oxigênio molecular.

As enzimas SOD são as mais importantes do sistema antioxidante enzimático. Essas metaloenzimas são as primeiras a entrar em ação no combate aos efeitos oxidantes do $O_2^{\cdot-}$. Estão presentes em todas as células do corpo e apresentam três isoformas: a citoplasmática Cu/ZnSOD (ou SOD1), a mitocondrial MnSOD (ou SOD2) e a extracelular Cu/ZnSOD (ou SOD3) (PERRY et al., 2010). Todas as três isoformas atuam na dismutação do ânion superóxido, produzindo como produto final, peróxido de hidrogênio.

Outra importante enzima antioxidante é a CAT, a qual é uma proteína homotetramérica (240kDa) e está presente tanto em plantas quanto animais, como também em algumas bactérias aeróbicas. Sua concentração é mais elevada nos eritrócitos e nas células do fígado (MASTERS et al., 1986). Tal enzima está presente principalmente nos peroxissomos, mas também pode ser encontrada nas mitocôndrias e no núcleo. Ela promove a conversão do H_2O_2 em água e oxigênio molecular. Essa reação é de extrema importância, visto que impede a formação do radical hidroxil (OH^{\cdot}) o qual é altamente prejudicial as células. Uma molécula de CAT é capaz de metabolizar aproximadamente 6 milhões de moléculas de H_2O_2 por minuto (VALKO et al., 2006). A CAT é mais eficaz quando há concentrações elevadas de H_2O_2 , em baixas concentrações deste composto ou outros peróxidos, o sistema de defesa da Glutathiona entra em ação.

A Glutathione é um tripeptídeo linear (γ -glutamil-cisteinil-glicina), o qual é o tiol não proteico mais abundante nas células dos mamíferos. O sistema Glutathione corresponde um mecanismo importante de defesa endógeno, relacionado com a modulação do sistema imune e com as respostas inflamatórias (DRÖGE et al., 1994). Como exemplos dessa modulação, destacam-se a sinalização redox, regulação da proliferação celular, apoptose e respiração mitocondrial (BROWN, 1994; EVANS et al., 1991).

Mais de 98% da Glutathione total se apresenta na forma de Glutathione reduzida (GSH), e o restante na forma de Glutathione oxidada (GSSG). A conversão da GSH em GSSG é catalisada pela enzima Glutathione peroxidase (GPx) durante os períodos de estresse oxidativo (MAISTER & ANDERSON, 1983). Essa reação está acoplada à redução do H_2O_2 em água.

As células hepáticas sintetizam as moléculas de Glutathione e a sua forma exógena pode ser absorvida pelo intestino, além disso ela pode ser sintetizada *de novo*, podendo então, ser considerada um antioxidante endógeno e exógeno (FANG et al., 2002).

A reciclagem das moléculas de Glutathione, ou seja, a redução da GSSG, é realizada pela enzima glutathione redutase (GR). Essa enzima não atua diretamente no sistema antioxidante, porém é responsável pela regeneração da Glutathione na presença de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH), tendo como objetivo impedir a paralisação do ciclo metabólico da Glutathione (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989).

Desse modo, a atividade das enzimas CAT e GPx converte o H_2O_2 em água. Essa reação é muito importante, pois a molécula de H_2O_2 também constitui uma importante ERO, embora não apresente elétrons desemparelhados. Além disso, um aumento na concentração do H_2O_2 inativa lentamente a SOD. Baixos níveis da CAT, GPx e SOD, assim como de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, são mantidos por um mecanismo de feedback, em organismos normais (RAHMAN et al., 2006).

Na presença de um desequilíbrio entre a produção de EROs e a capacidade de ação dos sistemas de defesa antioxidantes ocorre o chamado estresse oxidativo. Assim, para que prevaleça a homeostase e as funções biológicas sejam preservadas, é necessário que o organismo controle continuamente a concentração de ambos, agentes oxidantes e antioxidantes. Estudos mostram que no balanço entre a produção de oxidantes e as defesas antioxidantes *in vivo*, parece prevalecer um equilíbrio relativo, no qual há uma ligeira tendência para produção de oxidantes, de forma que níveis baixos de estresse oxidativo contínuos são controlados pelos sistemas de reparo. Porém, isso não ocorre quando o estresse

oxidativo é intenso, o que pode resultar em dano até morte celular (HALLIWELL & CROSS, 1994; HALLIWELL, 2007).

Dados da literatura apontam o estresse oxidativo como um fator chave na progressão da patogênese causada por vários vírus, como os vírus da Hepatite C (HCV), vírus Influenza, vírus da Encefalite Japonesa, vírus da Dengue (DENV), vírus HIV, vírus Respiratório Sincicial (RSV) e vírus da Hepatite B (HBV) (AKAIKE et al., 1996; CAI et al., 2015; HOSAKOTE et al., 2009; et al., 2015; KHADEM et al., 2015; OLAGNIER et al., 2014; PAL et al., 2010; SCHWARZ, 1996; ZHANG et al., 2014).

Baixos níveis de EROs ativam a proliferação celular e a maioria dos vírus multiplica-se melhor em células que estão em mitose (PETERHANS, 1997). Uma vez que os vírus necessitam de células vivas para sua replicação, as EROs têm um papel chave nesse processo. No entanto, com o progresso da infecção, mais EROs são formadas a fim de conter a multiplicação viral, assim, um aumento na produção dessas espécies culmina no estresse oxidativo e seus efeitos tóxicos para o hospedeiro.

Já foi demonstrado que a infecção de fagócitos pelos vírus Influenza e *Paramyxovirus* ativa a geração do O_2^- por um mecanismo que envolve a interação entre as glicoproteínas de superfície viral e a membrana plasmática da célula do fagócito (PETERHANS, 1997).

O estresse oxidativo é visto também em infecções virais crônicas, como a AIDS e nas hepatites virais. Humanos infectados com o HIV estão sob efeito constante do estresse oxidativo, com alterações nas defesas antioxidantes, incluindo alterações na SOD e GPx. Além disso, apresentam no soro, níveis elevados de hidroperóxidos e malondialdeído (MDA)-aldeído mais abundante gerado pelo ataque dos radicais livres aos ácidos graxos polinsaturados das membranas celulares - (DRÖGE et al., 1994). Assim, na AIDS ocorre um aumento no estresse oxidativo, onde as defesas antioxidantes estão presentes, mas são incapazes de neutralizar as ações prejudiciais das EROs, contribuindo para a evolução da doença (COACCIOLI et al., 2010).

Nas hepatites virais, como aquelas causadas pelo HCV e HBV, a produção de espécies oxidantes contribui para o aparecimento de carcinoma hepatocelular, um tumor observado em pacientes após anos de inflamação crônica no fígado (ABEL et al., 2009). Ou seja, o estresse oxidativo contribui para o agravamento das hepatites em pacientes infectados com os vírus supracitados.

Em casos humanos de infecção pelo DENV, as alterações no estado redox encontradas sugerem que o estresse oxidativo tem papel importante na patogênese desse vírus. Além disso, estudos têm demonstrado que alguns marcadores do dano oxidativo apresentam-se alterados em diferentes fases da infecção, fase febril e fase convalescente, podendo funcionar como marcadores da evolução da doença (GIL et al., 2004; KLASSEN et al., 2004; SEET et al., 2009). Em 2013, Wang e colaboradores mostraram que a administração de Glutathione exógena, uma das mais importantes substâncias antioxidantes intracelulares, pode prevenir o estresse oxidativo e a injúria hepática em modelo animal experimental de DENV-2, chamando atenção para o possível uso da Glutathione no tratamento das infecções por esse vírus.

Ainda, um estudo realizado por Narayanan e colaboradores (2011) abordou a importância do estresse oxidativo na patogênese de um importante membro da família *Bunyaviridae*, o *Rift Valley Fever virus* (RVFV). Tal trabalho mostrou que uma baixa expressão de SOD1 estava relacionada com o estresse oxidativo em células humanas infectadas com o RVFV.

Recentemente, nosso grupo de pesquisa avaliou se a infecção de camundongos BALB/c pelo CARV poderia causar estresse oxidativo e alterar as defesas antioxidantes no fígado de animais infectados, já que o fígado é um sítio ativo da replicação viral. Após a infecção subcutânea dos camundongos, o CARV foi detectado no fígado e a histopatologia revelou hepatite aguda. Níveis séricos elevados de aspartato e alanina aminotransferases (AST/ALT) e alta expressão hepática da citocina pró-inflamatória Fator de Necrose Tumoral Alfa (TNF- α) foram encontrados nos animais infectados. A infecção pelo CARV não alterou os biomarcadores de estresse oxidativo (Malondialdeído e Proteína Carbonilada), mas aumentou o conteúdo de Glutathione e alterou a expressão e atividade das enzimas SOD e CAT (CAMINI et al., 2014). Este trabalho foi o primeiro a mostrar alterações na homeostase oxidativa após infecção por um *Orthobunyavirus*.

Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi dar continuidade aos estudos anteriores desenvolvidos por nosso grupo e assim elucidar se a infecção pelo CARV em células humanas hepáticas também é capaz de causar alteração na homeostase oxidativa, e quais os prováveis mecanismos moleculares associados a tais alterações. Ampliar os conhecimentos sobre os aspectos relacionados a patogênese do CARV é de primordial importância, visto ser essa doença um problema de saúde pública e potencialmente de caráter emergente.

3- OBJETIVOS

3.1- Objetivo geral

Avaliar o estresse oxidativo e as defesas antioxidantes em células HepG2 infectadas pelo *Caraparu virus*.

3.2- Objetivos específicos

3.2.1- *Multiplicar e titular o CARV em células Vero.*

3.2.2- *Caracterizar a infecção pelo CARV em células HepG2:*

- Avaliar o efeito citopático (ECP);
- Construir uma curva de multiplicação.

3.2.3- *Avaliar o perfil oxidante da infecção pelo CARV em células HepG2:*

- Medir a produção de “Espécies Reativas de Oxigênio” (EROs);

3.2.4- *Avaliar o estresse oxidativo após a infecção pelo CARV em células HepG2:*

- Medir os níveis de Malondialdéido (marcador de peroxidação lipídica).

3.2.5- *Avaliar o perfil antioxidante da infecção pelo CARV em células HepG2:*

- Medir a atividade e expressão gênica das enzimas Superóxido Dismutase (SOD) e Catalase (CAT);
- Medir os níveis de Glutathiona total.

3.2.6- *Avaliar o perfil inflamatório:*

- Medir a expressão gênica de IL-6.

4- MATERIAL E MÉTODOS

4.1- Multiplicação do CARV em células Vero

A amostra do CARV (BeAn3994) foi gentilmente cedida pelo Prof. Paulo César Peregrino Ferreira, do Laboratório de Vírus, localizado no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). A amostra foi levada para a Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) e mantida em freezer -80°C até o momento do uso.

Para produção dos estoques, o CARV foi multiplicado em garrafas médias (182cm^2) contendo monocamada de células Vero. A adsorção foi feita adicionando-se $100\mu\text{L}$ do CARV em 2mL de DMEM (Meio Mínimo de Eagle Modificado por Dulbecco, *Cultilab*, Brasil), a 37°C , em atmosfera de 5% de CO_2 , com homogeneização constante durante 1 hora. Após essa etapa, meio DMEM contendo 1% de Soro Fetal Bovino (SFB, *Cultilab*, Brasil), gentamicina ($50\mu\text{g}/\text{mL}$), penicilina potássica ($200\text{U}/\text{mL}$) e fungizona ($2,5\mu\text{g}/\text{mL}$) foi acrescido para um volume final de 25mL , sendo a garrafa incubada até o efeito citopático (ECP) atingir cerca de 90%. O sobrenadante da infecção celular foi transferido para tubos e centrifugado em centrífuga Sorvall RC-5B rotor SS34 (4°C) por 5min a 5000rpm. O sobrenadante clarificado foi alíquotado em microtubos, contendo $100\mu\text{L}$. Esse material foi mantido a -80°C para posterior titulação e uso.

4.2- Titulação do CARV em células Vero

Células Vero foram cultivadas em placas de seis poços (1×10^6 células/poço) e, após 90% de confluência, foram adicionados a 5 poços $200\mu\text{L}$ de diluições seriadas do CARV feitas em DMEM 0% SFB, deixando um poço como controle negativo, no qual foram adicionados $200\mu\text{L}$ de DMEM 0% SFB. Após 1h de adsorção, com homogeneização constante, o meio foi removido e a cada poço foram adicionados 2mL de DMEM 2% SFB acrescido de carboximetilcelulose (CMC) a 2%, seguindo nova incubação a 37°C , 5% CO_2 . Após 5 dias, as células foram fixadas em solução 10% de formol por 2h. Após o descarte e lavagem do formol, a monocamada foi corada com solução de cristal violeta. O título foi expresso pelo número de unidades formadoras de placas (UFP) obtido nas câmaras cujas diluições

apresentaram entre 30 e 300 placas de lise, multiplicado pelo inverso da diluição, e convertido para UFP/mL.

4.3- Caracterização do efeito citopático do CARV em células HepG2

Células HepG2, derivadas de carcinoma hepático humano, foram crescidas em garrafas pequenas (75cm²), contendo meio DMEM 5% SFB. As células foram incubadas a 37°C, em atmosfera umidificada com 5% de CO₂, até que atingissem confluência de 90%. Após atingida essa confluência, as células foram infectadas ou não (controles) com o CARV em uma multiplicidade de infecção (moi) de 5, ou seja, 5 vírions para cada célula. Para a adsorção viral, as placas foram mantidas a 37°C na presença de CO₂, por uma hora, e homogeneizadas em intervalos regulares de 10 minutos. Após esse período, as células foram lavadas com solução salina PBS (*phosphate buffered saline*) e foram adicionados 15mL de meio DMEM 5% SFB. As garrafas foram incubadas em estufa úmida 37°C e 5% CO₂, observando-as diariamente até a detecção do efeito citopático, que ocorreu 48 horas pós-infecção (hpi).

4.4- Construção da curva de multiplicação do CARV em células HepG2

Para caracterização da curva de ciclo único do CARV em células HepG2, essas foram implantadas em placas de 6 poços e infectadas com o CARV numa moi de 5. Após 1 hora de adsorção, retirou-se o sobrenadante, lavou-se a monocamada celular por duas vezes com PBS 1x e adicionou-se a cada poço 2mL de DMEM 2% SFB. Nos tempos de 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96 e 120 hpi, alíquotas dos sobrenadantes das células foram coletados. Posteriormente, essas alíquotas foram tituladas em células Vero, conforme o item 4.2 e com os resultados obtidos foi traçada uma curva de ciclo único da multiplicação viral.

4.5- Dosagem das Espécies Reativas de Oxigênio

A produção de EROs intracelular foi mensurada através do Kit Image-iT™ LIVE Green Reactive Oxygen Species (Invitrogen®), que permite a detecção de EROs intracelular por fluorescência. A técnica utiliza um marcador fluorogênico (5-ou-6)-carboxy-2',7' dichlorodihydro fluorescein diacetate (carboxy-H2DCFDA), que quando quebrado por

esterases intracelulares não específicas gera a molécula carboxy-DCFH que reage com as EROs tornando-se fluorescente.

O ensaio foi realizado em uma placa branca de poliestireno de 96 poços, na qual cerca de $2,5 \times 10^4$ células foram adicionadas em cada cavidade e deixadas por cerca de 45min para aderência. Após a aderência, as células foram lavadas 2x com tampão de Solução Salina Equilibrada de Hanks (HBSS – KCl, Na_2HPO_4 , CaCl_2 , MgCl_2 , glicose, NaHCO_3 , NaCl, KH_2PO_4 – PH 7,4) e carregadas com 100 μL da sonda durante 45min a 37°C, 5% de CO_2 , no escuro. Após a incubação, descartou-se o meio e lavou-se 1x com HBSS. Então adicionou-se 100 μL de meio de cultura sem vermelho de fenol nos poços do controle negativo, 100 μL de hidroperóxido *tert*-butil (TBHP - um indutor da produção de ERO) nos poços do controle positivo e 100 μL do CARV, em uma moi de 1, nos poços destinados à infecção. Em seguida as células foram incubadas em estufa à 37°C, 5% CO_2 , no escuro.

Após os tempos de 6, 15, 24 e 48 horas foram feitas leituras da intensidade de fluorescência à 485/535nm (excitação/transmissão). O aparelho utilizado foi o leitor de microplaca tipo VICTOR™ X3 Multilabel (Perkin Elmer), com os softwares Perkin Elmer 2030 workstation e workout 2.5.

4.6- Dosagem de Malondialdeído (MDA)

Os níveis Malondialdeído, marcador de peroxidação lipídica, foram mensurados utilizando um protocolo padrão.

PREPARO DA AMOSTRA BIOLÓGICA

Células HepG2 foram cultivadas em placas de 6 poços (1×10^6 células/mL) e infectadas (moi 1) ou não (controles). Nos tempos de 6, 15, 24 e 48 hpi, os sobrenadantes das placas foram descartados, os poços lavados com PBS 1x e as células foram “descoladas” dos poços com espalhadores tipo *scrapers*. Adicionou-se 350 μL de DMEM 0% SFB e centrifugou-se a 400 xg por 15min. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e ressuspenso com 400 μL de PBS 1x. Procedeu-se então o congelamento e descongelamento dessas amostras, 3 x para a lise celular. Em seguida, centrifugaram-se as células lisadas a 10.000 xg por 15 min, em temperatura ambiente. E então, os sobrenadantes foram coletados e armazenados no freezer -80°C para o ensaio de Malondialdeído.

PROCEDIMENTO DA DOSAGEM:

1) Curva padrão:

Tubos	MDA (μL)	Água destilada (μL)	SDS 8.1% (μL)	Ác. Acético 2,5M pH 3.4 (μL)	TBA 0.8% (μL)
1	3,125	496,875	50	200	250
2	6,25	493,75	50	200	250
3	12,5	487,5	50	200	250
4	25,0	475,0	50	200	250
5	50,0	450,0	50	200	250

2) Dosagem com as amostras:

Tubo	Células (μL)	Água (μL)	SDS 8,1% (μL)	Ác. Acético 2,5M pH 3.4 (μL)	TBA 0.8% (μL)
Amostra	400	0	100	250	250
Branco	-	400	100	250	250

- 3) Após as pipetagens, incubou-se todos os microtubos por 90 minutos a 95°C;
- 4) Centrifugou-se por 5 min. a 5000 rpm;
- 5) Deixou-se esfriar;
- 6) Em seguida, pipetou-se o branco, a curva padrão e as amostras em triplicata em microplaca transparente (96 poços), 250 μL em cada poço.
- 7) Fez-se a leitura no modo fotométrico em 532 nm.
- 8) Cálculos para determinação da concentração de MDA nas amostras.

8.1) Cálculo do Fator de Correção Molecular (FCM) da curva padrão:

$$\text{FCM: } [(0,09375/\text{Abs.1}) + (0,1875/\text{Abs.2}) + (0,375/\text{Abs.3}) + (0,75/\text{Abs.4}) + (1,5/\text{Abs.5})] / 5$$

8.2) Determinação da concentração de MDA nas amostras:

$$\text{TBARS: } (\text{Abs. amostra} \times \text{FCM}) / (\text{quant. de células} \times \text{vol. amostra pipetado}) = \text{nmol de MDA} / 2,5 \times 10^6 \text{ células/mL.}$$

4.7- Dosagem da atividade total das enzimas SOD e CAT

4.7.1- SOD total:

Para essa dosagem foi utilizado o kit Cayman Chemical Company (MI, USA), o qual usa um sistema de geração de ânions superóxido, xantina e xantina oxidase. Esse kit avalia a capacidade da solução teste inibir a reação do ânion superóxido com o WST (2-(4-iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio). A reação quando ocorrida forma um composto denominado formazan, o qual absorve luz a 450nm.

Células HepG2 foram cultivadas em placas de 6 poços (1×10^6 células/poço) e infectadas com o CARV numa moi de 1. Nos tempos de 6, 15, 24 e 48 hpi os sobrenadantes das placas foram descartados e os poços lavados com PBS 1x. Após a lavagem, foram adicionados 300 μ L de DMEM 0% SFB aos poços, as células foram raspadas com espalhadores tipo “scrapers” e centrifugadas a 1500g por 10min, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o “pellet” ressuspendido com uma solução de homogeneização (20mM Hepes, pH 7,2; 1mM EGTA; 210mM Manitol; 70mM Sacarose). Após a homogeneização centrifugou-se a 1500g por 5min, a 4°C. O sobrenadante foi aliqotado e armazenado no freezer -80°C até o momento do uso. A dosagem foi feita conforme recomendações do fabricante e a atividade de SOD expressa como U/mL.

4.7.2- Catalase:

Para esta dosagem foi utilizado o kit ECAT-100 da *BioAssay Systems*, o qual apresenta um sistema que mede diretamente a degradação de H₂O₂ utilizando um corante redox. A alteração na intensidade de cor é diretamente proporcional à atividade da CAT na amostra.

As células HepG2 foram cultivadas em placas de 6 poços (1×10^6 células/mL) e infectadas (moi 1) ou não (controles). Nos tempos de 6, 15, 24 e 48 hpi os sobrenadantes das placas foram descartados, os poços lavados com PBS 1x e então se adicionou em cada poço 200 μ L do Assay Buffer do kit. As células foram “descoladas” dos poços com espalhadores tipo *scrapers*, centrifugadas a 14,000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi então aliqotado e armazenado no freezer -80°C até a realização da dosagem que foi feita conforme as recomendações do fabricante e a atividade de CAT foi expressa como U/mL.

4.8 – Expressão do RNAm de SOD1, CAT, GAPDH e IL-6

4.8.1- Extração do RNA total e síntese do cDNA (RT-PCR)

Células HepG2 foram cultivadas em placas de 6 poços (1×10^6 células/poço) e infectadas com o CARV numa moi de 1. Nos tempos de 6, 15, 24 e 48 hpi os sobrenadantes das placas foram descartados e os poços lavados com PBS 1x. O RNA total foi extraído utilizando-se o reagente Brazol (LGC Biotecnologia), conforme recomendações do fabricante. Em seguida, o RNA foi quantificado em espectrofotômetro NanoVue (GE Healthcare, Reino Unido) e estocado no freezer -80°C até o uso. Para a síntese do cDNA, $2\mu\text{g}$ do RNA total foram usados como molde e as reações feitas para um volume final de $20\mu\text{L}$, utilizando-se a enzima MultiScribeTM ($50\text{U}/\mu\text{L}$) e oligos randômicos (GeneAmp^R RNA PCR, Applied Biosystems, EUA), nas concentrações indicadas pelo fabricante.

4.8.2- PCR em tempo real (qRT-PCR)

O nível de expressão do mRNA de SOD1, CAT, IL-6 e GAPDH foi avaliado pela técnica de PCR em tempo real (qRT-PCR). Os cDNAs obtidos pela RT-PCR foram usados como moldes nas reações de PCR em tempo real, que foram realizadas com o kit SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, EUA), conforme recomendações do fabricante. As reações foram feitas a 95°C 15seg e 60°C 1min, 40 vezes. O aparelho ABI 7500 Real Time PCR Instrument (Applied Biosystems, EUA) foi utilizado e os valores de ΔCt foram corrigidos pelo valor do gene normalizador GAPDH (gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase). O valor $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ de cada amostra foi calculado e utilizado para expressão dos resultados.

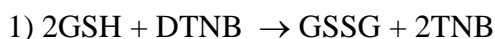
As sequências dos oligonucleotídeos iniciadores são mostradas abaixo (Tabela II) e foram desenhadas com base nas sequências de nucleotídeos para humanos, disponíveis no banco de dados GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). As construções foram feitas com o auxílio do programa Primer-Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

Tabela II. Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores, tamanho esperado do amplificado e número de acesso no GenBank

Gene	Foward (5' – 3')	Reverse (5' – 3')	Amplicon	GenBank
SOD1	GAAGGTGTGGGGAAGCATT	ACATTGCCCAAGTCTCCAAC	174 pb	NW_004078109.1
CAT	GGAGATTCAACTGCCAATG	TCTGTTCTTCATTCAGCACG	78	NG_013339.1
IL-6	CCACTCACCTCTTTCAGAACG	CATCTTTGGAAGGTTTCAGGTTG	184	XM_011515391.1
GAPDH	TGGGTGTGAACCATGAGAAG	GAGTCCTTCCACGATACCAAAG	125	NG_007073.2

4.9 – Dosagem de Glutathiona total

O conteúdo de Glutathiona total (GSH) foi determinado em células hepáticas utilizando o método de reciclagem com o ácido 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico], DTNB – GSSG proposto por GRIFFITH (1980). Este ensaio utiliza um método cinético baseado na redução do DTNB a TNB (ácido 5-tio-2-nitrobenzóico) que pode ser detectado espectrofotometricamente a 412nm conforme descrito na reação abaixo:



PREPARO DA AMOSTRA

As células HepG2 foram cultivadas em placas de 6 poços (1×10^6 células/mL) e infectadas com o CARV (moi 1) ou não (controles). Nos tempos de 6, 15, 24 e 48 hpi os sobrenadantes das placas foram descartados, os poços lavados com PBS 1x e então se adicionou em cada poço 1mL de PBS. As células foram “descoladas” dos poços com espalhadores tipo *scrapers*, centrifugadas a 600g por 5 min. O sobrenadante foi descartado e então adicionou-se 120 µL de ácido de sulfosalicílico 5% (SSA) ao pellet. Essa suspensão foi congelada e descongelada 2x para lise celular e deixadas por 5min no gelo. Após esse tempo centrifugou-se a 10000g, por 10 min à 4°C. O sobrenadante foi aliquoteado e armazenado no freezer -80°C até o momento do uso.

PROCEDIMENTO DA DOSAGEM

Para a determinação de GSH foram adicionados 10 µL da amostra em uma microplaca, em seguida adicionaram-se 150 µL da mistura de trabalho composta por 95 mM de tampão

fosfato, pH 7,0, 0,95 mM de EDTA, 48 μ M de NADPH, 0.031 mg/ml de DTNB, 0.115 unidades/mL de glutathione redutase, e 0.24% de ácido sulfosalicílico. As amostras foram então incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, 50 μ L de NADPH 0,16mg/mL foram adicionados às mesmas e o cronômetro disparado. As absorbâncias das amostras foram lidas durante 5 minutos a cada minuto, no leitor de ELISA à 412 nm.

As absorbâncias de diluições seriadas de soluções padrão de Glutathione foram determinadas separadamente para obtenção das curvas de calibração. Após análise de regressão linear, foi determinado a equação da reta. Esta equação foi utilizada para determinar as concentrações em nmoles de Glutathione total por mL de amostra.

4.10 - Análise Estatística

Os dados foram analisados pelo programa GraphPad Prism, versão 5.01. De acordo com o teste de normalidade Kolmogorov- Smirnov, as diferenças entre os grupos infectados e controles de cada tempo foram consideradas significantes quando o valor de p foi menor ou igual a 0,05, através do teste t-Student, com *, ** e *** representando diferenças significativas com $p \leq 0.05$, $p \leq 0.01$ and $p \leq 0.001$, respectivamente.

5- RESULTADOS

5.1- Efeito citopático e curva de multiplicação do CARV em células HepG2

Antes de se iniciar os estudos da infecção do CARV em células HepG2, primeiramente foram preparados os estoques virais. Para tal, o CARV foi multiplicado e titulado em células Vero, que sabidamente são suscetíveis e permissivas a multiplicação desse vírus. O título obtido foi de 4×10^7 UFP/mL. A partir daí todos os demais estudos foram feitos em células HepG2.

A fim de verificar se o CARV seria capaz de infectar e se multiplicar em células HepG2, primeiramente foi realizada a caracterização do efeito citopático (ECP). O ECP é um evento relacionado as alterações morfológicas ocorridas em células individuais ou grupos de células decorrentes de uma infecção viral. Tais alterações podem ser visualizadas ao microscópio óptico. A caracterização do ECP permite a avaliação da susceptibilidade e da permissibilidade celular a um agente viral.

Como mostrado na Figura 7a, células HepG2 controles cresceram em toda superfície da garrafa, formando uma monocamada homogênea. Já nas células infectadas com o CARV (moi 1), após 48 horas, foram observadas áreas de lise translúcidas e circulares, que são chamadas de placas de lise (Figura 7b). Ainda, foram visualizadas células arredondadas e soltas da monocamada, com citoplasma de caráter refringente (Figura 7c,d).

Em seguida, a fim de elucidar a eficiência da produção de partículas do CARV nas células HepG2, foi construída uma curva de multiplicação. Para tal, células HepG2 foram infectadas com uma moi de 5. Em seguida, amostras do sobrenadante foram obtidas em diferentes hpi e tituladas em células Vero. Com os resultados foi traçada uma curva de multiplicação, que reflete as diferentes fases do ciclo replicativo viral em uma população de células. Como pode ser observado na Figura 8, quantidades significativas de vírus ($\sim 2 \times 10^4$ UFP/mL) foram detectadas 12 hpi, sendo a produção máxima observada 24 hpi, com títulos virais de 7×10^5 UFP/mL. O ECP de 100% foi observado 72 hpi, quando os títulos virais começaram a diminuir.

Assim, esses resultados nos mostram que células hepáticas humanas HepG2 são suscetíveis e permissivas à multiplicação pelo CARV, e que esse vírus é capaz de se multiplicar de forma eficiente, alcançando títulos satisfatórios.

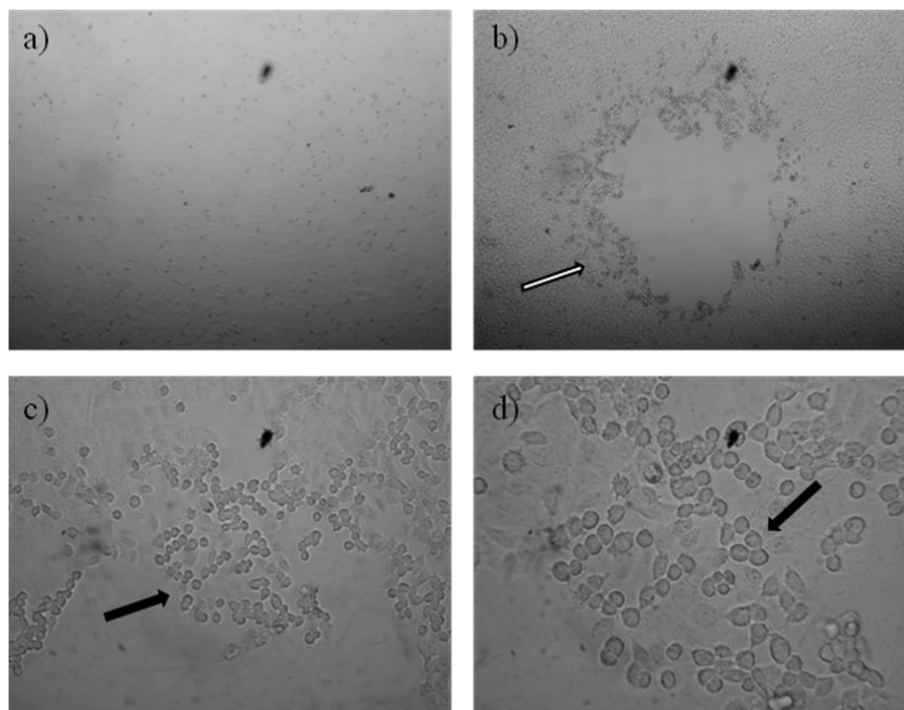


Figura 7: Efeito citopático decorrente da infecção pelo CARV. a) Células HepG2 não infectadas (controles), aumento 10x. b) Placas de lise formadas na monocamada de células 48 horas após infecção pelo CARV - seta branca (aumento 10x). c) e d) Aspecto arredondado e refringente das células infectadas pelo CARV 24 horas após infecção - setas pretas (aumento 40x e 50x, respectivamente).

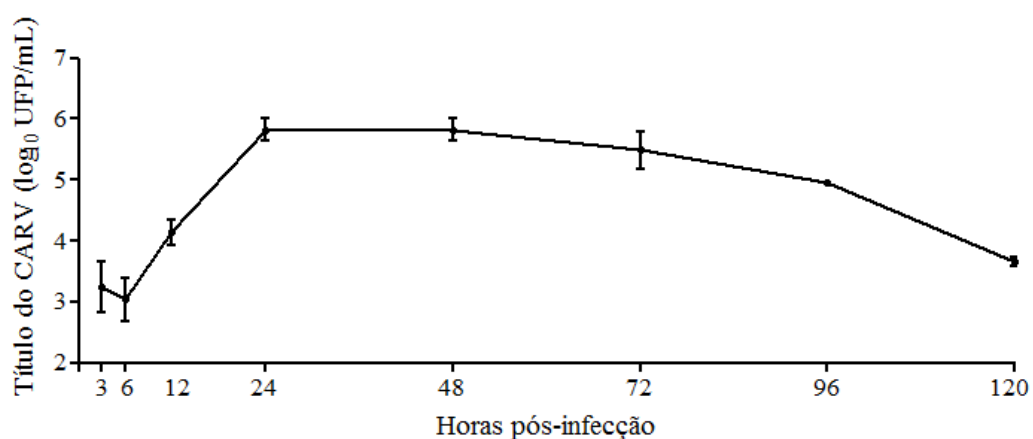


Figura 8: Curva de multiplicação do CARV em células HepG2. Células HepG2 foram infectadas com o CARV com uma MOI de 5. Alíquotas do sobrenadante foram coletadas 3, 6, 12, 24, 48, 72, 96 e 120 hpi e os títulos virais determinados em células Vero, por contagem das Unidades Formadoras de Placas. Os títulos foram expressos como \log_{10} UFP/mL.

5.2- Avaliação da produção de Espécies Reativas de Oxigênio

O estímulo para a produção de EROs é um fenômeno muito comum em infecções virais e tem como objetivo conter a multiplicação dos vírus dentro das células infectadas. Assim, para determinar se o CARV é capaz de induzir a formação de EROs, avaliou-se a produção dessas espécies em células infectadas ou não, em diferentes tempos. A substância hidroperóxido *tert*-butil (TBHP) foi utilizada como controle positivo desde que sabidamente induz a formação de EROs. Como pode ser visto na Figura 9, nas células HepG2 infectadas com o CARV houve um aumento significativo na produção dessas espécies 15, 24 e 48 hpi, quando comparadas as células controles.

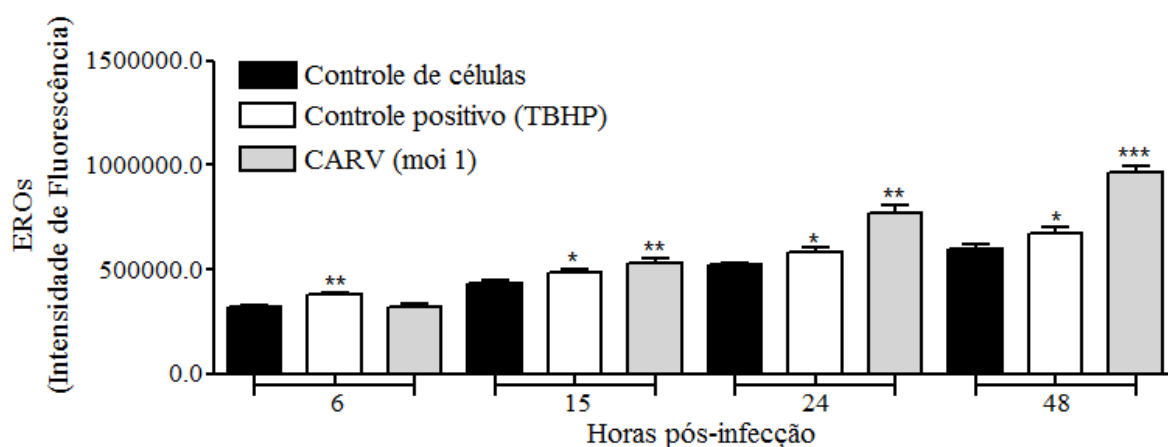


Figura 9: Produção de EROs em células HepG2 após infecção pelo CARV. Células HepG2 foram tratadas com a sonda 5- (e-6)-carboxi-2', 7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato (carboxi-H₂DCFDA) durante 45 minutos. Em seguida, as células foram tratadas com TBHP ou infectadas com o CARV numa moi de 1. Os controles de células receberam apenas meio de cultura. Em diferentes hpi, a fluorescência das amostras foi medida. Dados são expressos em porcentagens relativas e expressos como a média \pm desvio padrão ($n = 8$ por grupo), * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$ e *** $p \leq 0,001$ em comparação às respectivas células controles de cada tempo (teste t-Student).

5.3- Análise do biomarcador de estresse oxidativo Malondialdeído

Para avaliar se o aumento da produção de EROs após infecção pelo CARV era capaz de induzir nas células o estresse oxidativo, foi feita a dosagem de Malondialdeído (MDA), um produto final da peroxidação lipídica e, portanto, um biomarcador desse evento.

Como pode ser observado na Figura 10, os níveis de MDA foram iguais em todos os grupos analisados, sugerindo assim que, apesar do aumento observado nas EROs, não houve um aumento na oxidação das membranas celulares após infecção pelo CARV.

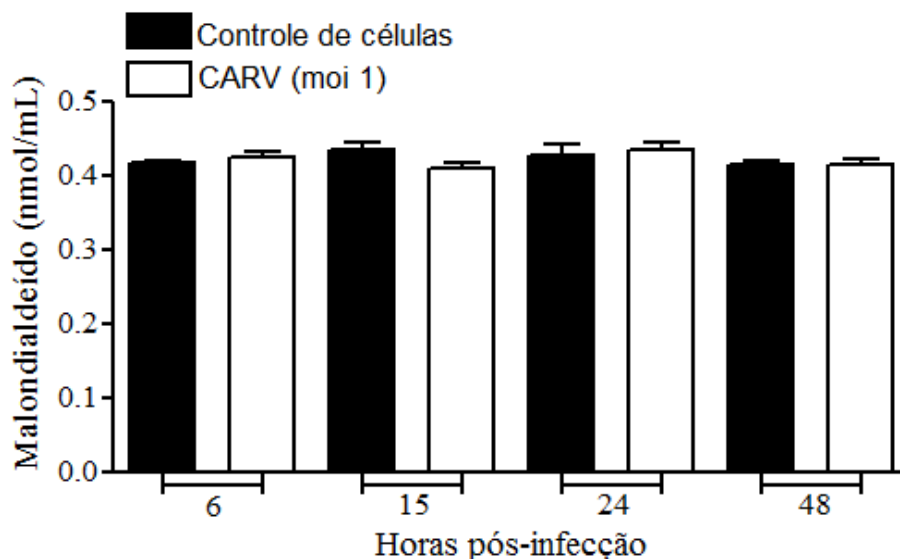


Figura 10: Níveis de MDA em células HepG2 infectadas pelo CARV. Células HepG2 foram infectadas com o CARV (moi 1). Os sobrenadantes das células foram coletados em diferentes hpi e utilizados para mensurar a concentração de Malondialdeído. Os resultados estão expressos como média \pm desvio padrão ($n=6$ por grupo). Não houve diferença significativa entre os grupos controles e infectados de cada tempo analisado (teste t- Student).

5.4- Avaliação da enzima Superóxido Dismutase

Uma vez que observamos que a infecção pelo CARV induziu a formação de EROs mas que esse aumento não foi suficiente para alterar os níveis de MDA, ou seja, não resultou em estresse oxidativo evidente, nossa próxima abordagem foi avaliar se a infecção pelo CARV seria capaz de alterar o status antioxidante celular.

A primeira ERO produzida é o ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o qual é metabolizado a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pelas enzimas superóxido dismutases. Diante disso, a atividade e expressão gênica da enzima SOD foi medida nas células HepG2, a fim de verificar se a infecção pelo CARV poderia modular de alguma forma essa enzima.

Como mostrado na Figura 11, nas células infectadas com o CARV a atividade da SOD aumentou significativamente 6 hpi, em relação ao seu controle. Em contrapartida, nos tempos 15 e 24 hpi a atividade dessa enzima diminuiu nas células infectadas quando comparadas com

seus respectivos controles. Já no tempo de 48 hpi, a atividade da SOD no grupo infectado foi maior que no grupo controle.

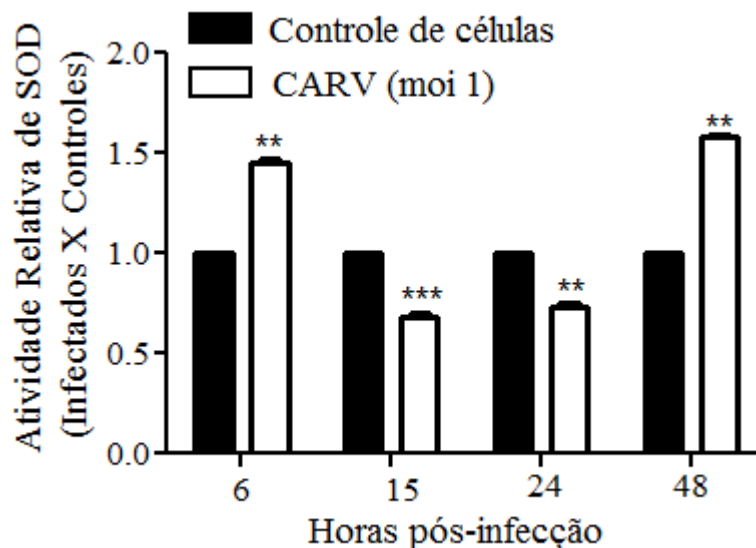


Figura 11: Atividade da SOD total após a infecção pelo CARV em células HepG2. Células HepG2 foram infectadas com o CARV (moi 1). Os sobrenadantes das células foram coletados em diferentes hpi e utilizados na dosagem da atividade total da SOD. Resultados são expressos como a média \pm desvio padrão ($n = 8$ por grupo), onde $**p \leq 0,01$ e $***p \leq 0,001$ em comparação às respectivas células controles de cada tempo (teste t-Student).

Uma vez que a infecção pelo CARV causou uma alteração na atividade da enzima SOD, nosso próximo passo foi verificar se a alteração observada na atividade dessa enzima poderia ter ocorrido devido a uma alteração na expressão do seu RNAm em decorrência da infecção. Assim, avaliamos por qRT-PCR a expressão do RNAm da enzima SOD-1, que é a isoforma citoplasmática e a mais abundante.

Como mostrado na Figura 12, a infecção pelo CARV causou um aumento significativo na expressão do RNAm de SOD-1 no tempo de 48 hpi, quando comparado com as células controles. Nos tempos anteriores, nenhuma alteração na expressão do RNAm de SOD-1 foi observada nos grupos infectados quando comparados com seus respectivos controles.

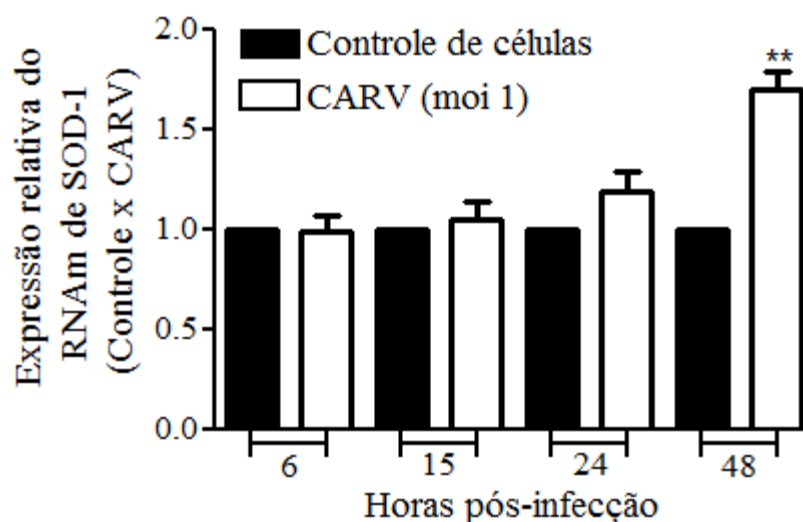


Figura 12: Expressão do RNAm da SOD-1 após a infecção pelo CARV em células HepG2. Células HepG2 foram infectadas ou não com o CARV (moi 1) e 6, 15, 24 e 48 hpi o RNA total foi extraído. A expressão do RNAm de SOD-1 foi avaliada por qRT-PCR e os valores normalizados pela expressão de GAPDH. Resultados são expressos como a média \pm desvio padrão ($n = 8$ por grupo), onde $**p \leq 0,01$ em comparação às respectivas células controles de cada tempo (teste t-Student).

5.5- Avaliação da enzima Catalase

A Catalase é outra enzima antioxidante importante, a qual reduz o H_2O_2 em água, contribuindo dessa forma, para a manutenção do equilíbrio redox intracelular. Uma vez que a atividade e expressão de SOD foram alteradas frente a infecção pelo CARV, nossa próxima abordagem foi verificar se o CARV também poderia alterar a atividade e expressão de CAT.

A Figura 13 mostra que a atividade da enzima CAT aumentou 24 hpi e voltou aos valores basais 48 hpi nas células HepG2 infectadas com o CARV, em comparação com seus respectivos controles. Nos tempos de 6 e 15 horas não houve diferença significativa entre os grupos controles e infectados. Com relação a expressão do RNAm de CAT, a Figura 14 mostra que não houve diferença entre os grupos analisados, nos diferentes tempos.

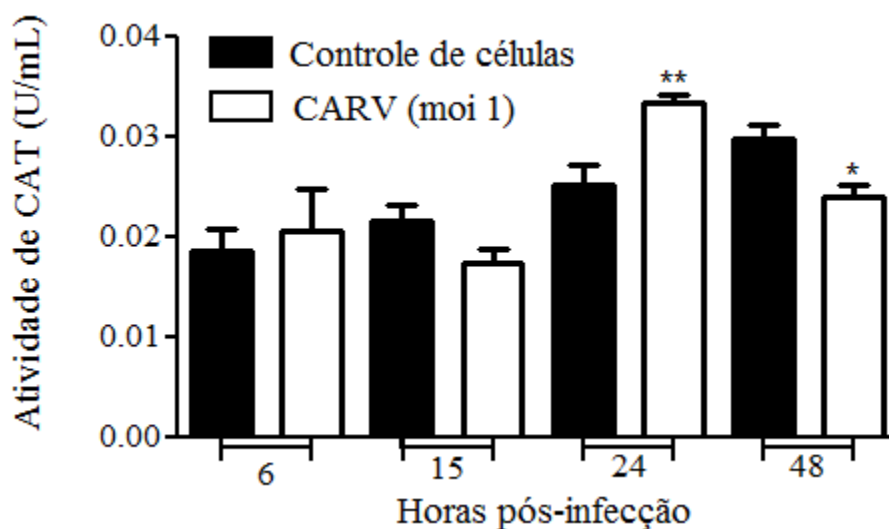


Figura 13: Atividade da CAT após a infecção pelo CARV em células HepG2. Células HepG2 foram infectadas com o CARV (moi 1). Os sobrenadantes das células foram coletados em diferentes hpi e utilizados na dosagem da atividade de CAT. Resultados são expressos como a média \pm desvio padrão ($n = 8$ por grupo), onde $*p \leq 0,05$ e $**p \leq 0,01$ em comparação às respectivas células controles de cada tempo (teste t-Student).

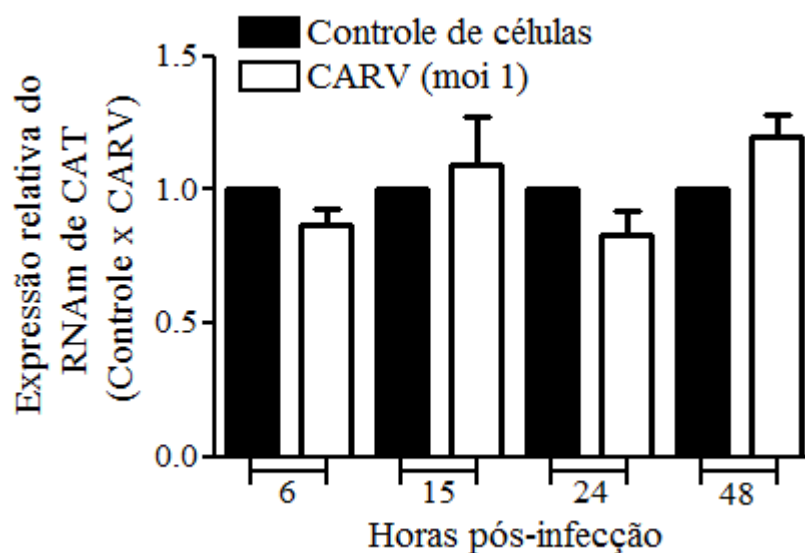


Figura 14: Expressão do mRNA de CAT após infecção pelo CARV em células HepG2. Células HepG2 foram infectadas ou não com o CARV (moi 1) e 6, 15, 24 e 48 hpi o RNA total foi extraído. A expressão do RNAm de CAT foi avaliada por qRT-PCR e os valores normalizados pela expressão de GAPDH. Resultados são expressos como a média \pm desvio padrão ($n = 8$ por grupo). Não houve diferença estatística entre os grupos controles e infectados em cada tempo analisado.

5.6- Avaliação do conteúdo celular de Glutathione Total

A Glutathione é uma das principais substâncias envolvidas no controle do estado redox celular. Associado a isso, dados da literatura mostraram que na progressão de várias infecções virais há uma depleção nos níveis de Glutathione intracelular relacionada com o aumento da geração de EROs. Desse modo, avaliamos os níveis dessa substância em células infectadas ou não com CARV.

Como pode ser observado na Figura 15, o conteúdo intracelular de Glutathione aumentou nas células infectadas com o CARV 15 hpi, comparando-se com as células controles. Por outro lado, houve uma diminuição nos níveis de Glutathione nas células infectadas, nos tempos de 24 e 48 hpi, em relação aos seus respectivos controles.

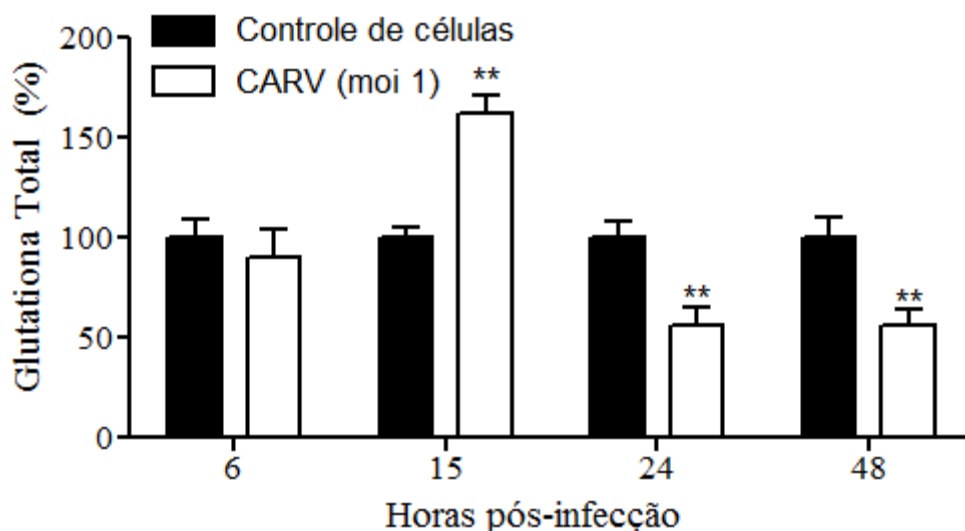


Figura 15: Níveis de Glutathione Total após a infecção pelo CARV em células HepG2. Células HepG2 foram infectadas com o CARV (moi 1). Os sobrenadantes das células foram coletados em diferentes hpi e utilizados na dosagem dos níveis de Glutathione Total. Porcentagens foram calculadas considerando o controle de células como 100%. Os resultados estão expressos como média +/- desvio padrão ($n = 8$ por grupo), onde $**p \leq 0,01$ em comparação às respectivas células controles de cada tempo (teste t-Student).

5.7- Avaliação da expressão do RNAm da Interleucina 6 (IL-6)

A resposta imune celular e humoral mediada por IL-6 desempenha um papel crucial na determinação do resultado de uma infecção viral. Para analisar a importância de IL-6 na infecção pelo CARV, a expressão gênica dessa citocina foi avaliada por qRT-PCR. A infecção pelo CARV foi capaz de causar um aumento na expressão de IL-6 nos tempos de 15, 24 e 48 hpi. Ainda, esse aumento foi de cerca de 40X no tempo de 24 e de mais de 100X no tempo de 48 horas (Figura 16).

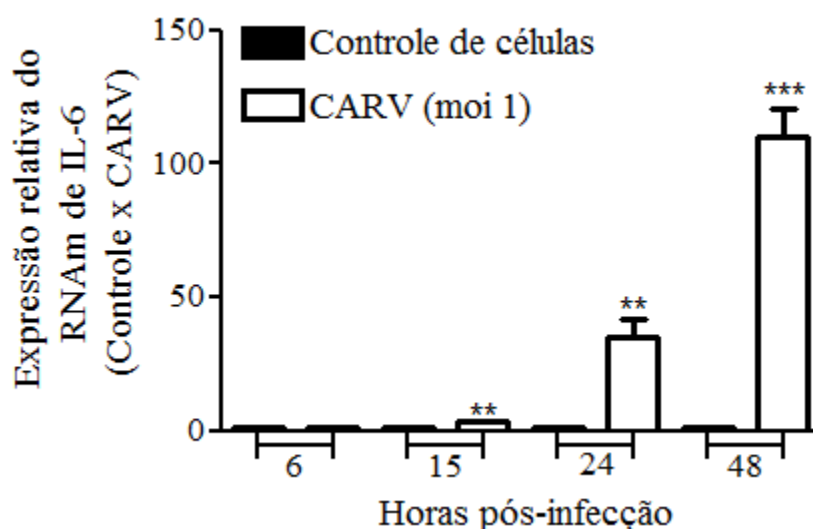


Figura 16: A infecção pelo CARV altera a expressão do RNAm da IL-6 em células HepG2. Células HepG2 foram infectadas ou não com o CARV (moi 1) e 6, 15, 24 e 48 hpi o RNA total foi extraído. A expressão do RNAm de IL-6 foi avaliada por qRT-PCR e os valores normalizados pela expressão de GAPDH. Resultados são expressos como a média \pm desvio padrão ($n = 8$ por grupo), onde ** $p \leq 0,01$ e *** $p \leq 0,001$ em comparação às respectivas células controles de cada tempo (teste t-Student).

6- DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Os vírus do Grupo C foram alguns dos primeiros arbovírus descritos na região Amazônica brasileira durante a década de 1950. Tais vírus circulam nas regiões tropicais e subtropicais das Américas e estão associados a doenças tanto em humanos quanto em animais silvestres (CAUSEY et al., 1961; FORSHEY et al., 2010; NUNES et al., 2005; SOLDAN et al., 2005; SHOPE et al., 1988). O CARV, um importante membro desse grupo, já foi isolado várias vezes na região da Floresta Amazônica como também na região sudeste do Brasil (Vale do Ribeira - São Paulo) de um paciente que conduzia estudos naquela região (IVERSSON et al. 1987). Entretanto, as características epidemiológicas e distribuição geográfica precisa de tal vírus ainda permanecem incertas.

Em seres humanos, o CARV causa uma infecção sistêmica com sintomas inespecíficos como febre, mialgia, calafrios e mal estar (IVERSSON et al. 1987; SHOPE et al. 1988; ELLIOT, 2014). Pacientes infectados pelo CARV normalmente se recuperam após 2-5 dias, sem apresentar nenhuma sequela ou mortalidade. Tais sintomas inespecíficos associado ao fato de a doença apresentar evolução benigna contribuem para a subnotificação dos casos da “Febre Caraparu”.

Embora ainda não haja relatos sobre hepatite desencadeada pelo CARV em seres humanos, acredita-se que o fígado possa ser um local para a replicação viral. Estudos prévios mostraram que camundongos neonatos (B6C3F1) infectados via intraperitoneal com o CARV desenvolvem encefalite e hepatite, levando todos os animais ao óbito cerca de 5 dias após a inoculação (BRINTON et al., 1993). Recentemente, nosso grupo de pesquisa mostrou que camundongos BALB/c adultos jovens (5-6 semanas de vida) infectados com o CARV desenvolvem sinais clínicos como perda de peso, piloereção e protação, mas sem óbito. Nesse estudo, o CARV foi detectado no fígado e a histopatologia revelou hepatite aguda. Ainda, níveis séricos elevados de aspartato e alanina aminotransferases (AST/ALT) foram encontrados nos animais infectados (CAMINI et al., 2014). Assim, estudos em animais apontam o hepatotropismo do CARV. No entanto, em humanos não há nenhuma evidencia que o CARV também cause injúria hepática. Como pacientes com a “Febre Caraparu” recuperam-se rapidamente, nenhum exame posterior a doença ou de biomarcadores de danos hepáticos, como ALT e AST, são feitos.

Na busca do entendimento de como os vírus desenvolvem doença em seus hospedeiros, diversos trabalhos têm demonstrado que o estresse oxidativo, como parte da resposta da célula frente às infecções virais, desempenha um papel importante na patogênese de uma variedade de vírus (NARAYANAN et al., 2011; WANG et al., 2013). Até o momento a correlação desse evento na patogênese dos bunyavírus é muito pouco explorada.

Assim, na tentativa de entender um pouco mais sobre a patogênese do CARV, recentemente nosso grupo de pesquisa tentou correlacionar o estresse oxidativo com a patogênese hepática do CARV em modelo animal. No mesmo trabalho onde demonstramos que o CARV causa hepatite aguda em camundongos BALB/c, verificamos que o estresse oxidativo não contribui para esse evento. Por outro lado, a infecção altera o *status* antioxidante no fígado dos animais, o que pode contribuir para a contenção do estresse oxidativo. Esse foi o primeiro trabalho que mostrou alterações na homeostase oxidativa após infecção pelo CARV (CAMINI et al., 2014). Portanto, o presente estudo teve o intuito de dar prosseguimento ao estudo da patogênese hepática causada pelo CARV. Para tanto, foram utilizadas células HepG2, as quais são um bom modelo estudo para infecções virais *in vitro*.

Inicialmente, caracterizamos o efeito citopático do CARV em células HepG2. Dependendo do vírus e do tipo de cultura celular, o ECP pode ser caracterizado por uma série de alterações morfológicas distintas. As células HepG2 infectadas com CARV apresentaram aspecto arredondado e refringente. Além disso, as células se soltaram da monocamada o que foi demonstrado pela formação de placas de lise, aproximadamente 48 hpi (Figura 7). Em seguida, caracterizamos a curva de multiplicação do CARV em HepG2, que mostra a eficiência da produção de novas partículas de vírus.

Resumidamente, a primeira etapa no ciclo de multiplicação viral é a adsorção, caracterizada pela ligação dos vírus a receptores específicos na superfície das células. Essa etapa é rápida e ocorre normalmente na primeira hora pós-infecção. A partir daí os vírus atingem o ambiente intracelular, por um processo chamado de penetração. Após penetração, os vírus prosseguem para as etapas de biossíntese, morfogênese e liberação, quando então novas partículas virais saem da célula e atingem o ambiente extracelular. O tempo em que cada vírus leva desde a adsorção até a liberação de novas partículas depende do vírus e da célula.

Assim, as primeiras horas pós-infecção (momento desde a penetração até liberação de novas partículas) são definidas como período de eclipse, momento no qual os vírus

encontram-se dentro da célula e nenhuma partícula infecciosa produzida pela multiplicação viral é detectada no ambiente extracelular. Como resultado, nenhum vírus infeccioso pode ser detectado nesses tempos iniciais. Esse período de eclipse pode variar de 3-12 horas, dependendo da família de vírus (ENQUIST & RACANIELLO, 2013).

No entanto, como observado na Figura 8, partículas infecciosas foram detectadas no sobrenadante de células HepG2 nos tempos de 3 e 6 horas, com títulos médios de 2×10^3 UFP/mL. Uma provável explicação é que os vírus infecciosos detectados nesses tempos precoces não refletem a progênie viral produzida pela infecção, mas simplesmente são partículas infecciosas que permaneceram aderidas às membranas celulares e não penetraram na célula. Esse evento pode ser favorecido desde que o inoculo de vírus adicionado a monocamada de células é grande (moy de 5, ou seja, 5 vírions para cada célula), favorecendo um excesso de partículas virais que não atingem o ambiente intracelular.

A partir de 12 hpi, os títulos virais começam a aumentar e atingem o seu máximo nos tempos de 24 e 48 hpi (média de 7×10^5 UFP/mL). Portanto, esse aumento exponencial na quantidade de vírus é reflexo da multiplicação efetiva e produção da progênie viral. A partir de 72 hpi, os títulos virais começam a decair devido à morte de toda monocamada de células.

Em células Vero, a maior produção do CARV ocorre no tempo de 24 horas, atingindo títulos 10^7 UFP/mL. Em células HepG2, o maior título obtido foi também no tempo de 24 horas, mas valores menores foram alcançados, cerca de 10^6 UFP/mL. Provavelmente essa maior produção do CARV em células Vero decorre do fato de que tais células possuem uma deleção cromossômica para os genes que codificam os Interferons, sendo, portanto, incapazes de sintetizar essa potente citocina antiviral (DIAZ et al., 1988).

Uma vez que o CARV foi capaz de multiplicar nas células HepG2, nosso próximo passo foi verificar a produção das EROs por essas células frente à infecção viral. Nas células infectadas com CARV houve uma maior produção de EROs nos tempos de 15, 24 e 48 hpi (figura 9). Esse foi o primeiro trabalho que mostrou que a infecção pelo CARV estimula a produção de EROs. De forma semelhante, um estudo de Narayanan e colaboradores (2011) mostrou que a infecção em células do epitélio respiratório pelo RVFV, também membro da família *Bunyaviridae*, induz a produção de EROs com maior intensidade a partir de 12 hpi. Ainda, a presença de EROs também já foi observada nas infecções por vários outros vírus, tais como DENV, RSV e HCV (CASOLA et al., 2001; HOSAKOTE et al., 2009; IVANOV et al., 2015; OLAGNIER et al., 2014; PAL et al., 2010).

Sabe-se que as EROs estão intimamente envolvidas na regulação do metabolismo e na fisiologia celular, o que é muito relevante no contexto das infecções pelos vírus, os quais dependem dos mecanismos de biossíntese das células do hospedeiro. Assim, baixos níveis de EROs ativam a proliferação celular e a maioria dos vírus multiplica-se melhor em células que estão proliferando. No entanto, com o progresso da infecção, mais EROs são formadas afim de conter a multiplicação viral, podendo que culminar com o estresse oxidativo e seus efeitos tóxicos para o hospedeiro (PETERHANS, 1997).

Dessa forma, para avaliar se a infecção pelo CARV seria capaz de causar dano oxidativo devido ao aumento na produção de EROs, os níveis do biomarcador indireto desse evento, MDA, foram mensurados. Tal biomarcador se apresenta elevado quando há um aumento intracelular de EROs e consequente peroxidação das membranas lipídicas celulares. Nossos resultados mostraram que não houve alterações desse biomarcador nos diferentes grupos e tempos analisados (Figura 10), indicando que a infecção nas células pelo CARV não necessariamente acarreta dano oxidativo. Esse dado corrobora com resultados anteriores obtidos por nosso grupo, que demonstrou que o estresse oxidativo não está presente na patogênese hepática do CARV em modelo animal (CAMINI et al., 2014).

Diante da observação que a infecção pelo CARV aumentou a produção de EROs mas não causou peroxidação lipídica das membranas celulares, levantamos a hipótese de que algum(ns) antioxidante(s) poderia(m) ter neutralizado essas espécies a tempo de não originar o estresse oxidativo. Para checar essa hipótese, avaliamos alguns dos principais antioxidantes celulares, incluindo a Glutathione e as enzimas SOD e CAT.

A enzima SOD é uma das mais importantes enzimas antioxidantes visto que é a responsável pela metabolização do radical superóxido a H_2O_2 . Alterações nos níveis de SOD têm sido relacionadas a complicações de algumas doenças virais, como as causadas pelo HCV, HBV, vírus influenza, HIV, DENV, dentre outras. Então, nossa próxima abordagem foi investigar se poderia haver alguma alteração nessa enzima em células HepG2 infectadas pelo CARV. Com relação a atividade total de SOD, nas células infectadas houve um aumento no tempo de 6 horas, seguido de uma diminuição nos tempos de 15 e 24 horas, e novamente um aumento no tempo de 48 horas (Figura 11). De acordo com a expressão do mRNA, houve um aumento de SOD1 (isoforma citoplasmática) na fase mais tardia da infecção (48h), corroborando com o aumento da atividade dessa enzima nesse mesmo tempo (Figura 12).

Com esses resultados, podemos inferir que uma baixa atividade total de SOD, observada 15 e 24 hpi, pode estar relacionada à ativa multiplicação viral em tais tempos, já que a partir de 12 hpi o vírus entra na fase ativa de multiplicação e atinge seu pico de produção de novas partículas 24 hpi. Sabe-se que, ao multiplicar na célula hospedeira, o vírus é capaz de modificar toda a fisiologia da célula, alterando componentes celulares importantes. Assim, uma diminuição na atividade da SOD pode ser resultado dessa multiplicação viral ativa. Em contrapartida, o aumento na atividade dessa enzima 48 hpi pode ser explicado pelo máximo de produção de EROs nesse tempo. Como citado anteriormente, com o processo infecção, mais EROs são produzidas a fim de conter a intensa multiplicação viral. O aumento nos níveis de mRNA da SOD-1 observado 48 hpi também pode também estar relacionado com o aumento da atividade da SOD nesse mesmo tempo, visto que a demanda celular dessa enzima aumentou.

Narayanan e colaboradores (2011) mostraram que a infecção de células epiteliais de pulmão humano pelo RVFV (também membro da família *Bunyaviridae*) provoca uma diminuição da SOD e conseqüente estresse oxidativo. Ainda, da mesma forma que no presente trabalho, a infecção pelo CARV em camundongos também diminuiu a atividade dessa mesma enzima no fígado, nas fases iniciais pós-infecção, com posterior aumento nas fases mais tardias (CAMINI et al., 2014).

Um outro importante componente do sistema antioxidante enzimático é a CAT, que catalisa a redução do H_2O_2 a H_2O e O_2 . Assim, a CAT tem uma grande importância desde que elimina o excesso de H_2O_2 evitando que esse, por meio das reações de Fenton e Haber-Weiss, produza o radical hidroxil que é altamente reativo e tóxico.

Nossos resultados mostram que ocorreu uma alteração na atividade de CAT nas células infectadas com CARV, de diferentes maneiras, nos diferentes tempos. Houve um aumento da atividade dessa enzima 24 hpi, seguida de uma diminuição 48 hpi (Figura 13). No entanto, essa diminuição de CAT 48 hpi também não foi suficiente para provocar um estresse oxidativo evidente. Com relação a expressão gênica dessa enzima, não observamos nenhuma diferença entre os diferentes grupos e tempos analisados (Figura 14). Assim, podemos sugerir que, no tempo de 24 hpi, a CAT pode ter sido a responsável pelo combate às EROs, visto que tanto a SOD quanto a Glutathione estavam diminuídas nesse tempo, apesar da grande produção de EROs (Figura 9).

De forma parecida com os resultados encontrados aqui, no fígado de camundongos infectados pelo CARV, a atividade de CAT aumentou no 3º dia e diminuiu no 7º dia (CAMINI, 2014), indicando que CAT pode ser importante nos tempos iniciais pós-infecção, mas que, com o passar do tempo, uma vez que não é mais produzida, o conteúdo de CAT diminui no interior da célula, e dessa forma ocorre uma diminuição de sua atividade.

Hosakote e colaboradores (2011) mostraram que a infecção pelo RSV reduziu a expressão e atividade da CAT em pulmões de camundongos e nas vias aéreas de crianças com bronquiolite severa, colaborando para o estresse oxidativo observado no estudo. Yahya e colaboradores (2013) demonstraram que pacientes infectados pelo vírus da hepatite C (HCV), com hepatocarcinoma hepático, apresentaram níveis séricos de CAT mais baixos que seus controles e um aumento das espécies reativas. Entretanto, Duygu e colaboradores (2012) encontraram níveis elevados de CAT em pacientes com hepatite B crônica e aumento no estresse oxidativo.

Além de SOD e CAT, avaliamos o conteúdo intracelular de Glutathione após infecção pelo CARV, já que ela é considerada a principal substância antioxidante endógena produzida pelas células. Nossos resultados mostram que houve um aumento nos níveis de Glutathione total nas células infectadas com o CARV 15 hpi (Figura 15). Esse aumento pode estar relacionado com o aumento da atividade da enzima SOD 6 hpi, visto que a catálise dessa enzima gera como produto H_2O_2 e, a oxidação da molécula de Glutathione está acoplada à conversão do H_2O_2 em água, ou seja, nos tempos iniciais da infecção pelo CARV a Glutathione pode ter sido fundamental para conter o estresse oxidativo. Por outro lado, com o progresso da infecção, os níveis de Glutathione diminuíram nas células infectadas.

Tian e colaboradores (2010) demonstraram que a infecção pelo DENV2 diminuiu significativamente os níveis da Glutathione total endógena em células HepG2. Ainda, eles demonstraram que o tratamento suplementar com a forma exógena dessa molécula não só inibe o estresse oxidativo como também diminuiu a produção de novas partículas virais. Hosakote e colaboradores (2009) mostraram que após a infecção pelo RSV, em modelo celular, os níveis de Glutathione total reduzem com o progresso da infecção, sobretudo, a partir de 24 hpi. Em contrapartida, nos camundongos infectados pelo CARV houve um aumento no conteúdo de Glutathione total no fígado de todos os animais infectados, nos diferentes dias analisados (CAMINI et al., 2014). Esse resultado indica que, no modelo animal, a Glutathione endógena pode estar envolvida na neutralização das EROs e constitui um importante sistema celular que

neutraliza a oxidação e desempenha um papel importante na manutenção de um ambiente redox intracelular. No entanto, *in vitro*, por algum motivo, há uma depleção no conteúdo de Glutationa com o progresso da infecção. Mais estudos deverão ser realizados para confirmar o resultado aqui obtido e melhor elucidar o papel de Glutationa na infecção pelo CARV *in vitro*.

Por fim, como no modelo animal de infecção pelo CARV foi observado um quadro inflamatório agudo no fígado, com aumento na expressão gênica de TNF- α , nós avaliamos em células HepG2 infectadas com o CARV o perfil de expressão gênica de outra citocina, IL-6. De acordo com a literatura, IL-6 exibe funções pró e anti-inflamatórias na imunidade inata. Devido a essa capacidade bidirecional, o efeito de IL-6 é dependente do seu nível de expressão em um dado tecido (LAN et al., 2015). Níveis fisiológicos de IL-6 contribuem para uma homeostase imunológica, enquanto a produção excessiva dessa citocina pode causar uma série de lesões inflamatórias (LAN et al., 2015). Em células HepG2 infectadas pelo CARV houve um aumento na expressão do RNAm de IL-6 nos tempos de 15, 24 e 48 hpi (Figura 16), sendo esse aumento de cerca de 40X no tempo de 24 e de mais de 100X no tempo de 48 horas.

Vários estudos relacionam o aumento dessa citocina com a doença causada por diversos vírus. Morichi e colaboradores (2016) mostraram que os níveis de IL-6 estavam aumentados no soro de pacientes hospitalizados com a doença característica causada pelo RSV. De forma semelhante, Kwok e colaboradores (2016) relataram um aumento dessa citocina em células endoteliais de pulmão humano a partir de 8 hpi pelo vírus Influenza A. Vale destacar também um trabalho realizado por Kaya e colaboradores (2014) no qual os autores observaram um aumento de IL-6 no soro de pacientes infectados pelo *Crimean-Congo hemorrhagic fever virus* (CCHFV), um outro membro relevante da família *Bunyaviridae*. Tal aumento foi ainda mais exarcebado naqueles pacientes cujas manifestações da doença foram mais graves e que evoluíram para o óbito.

Assim, podemos concluir que a infecção de células hepáticas humanas HepG2 com o CARV não resulta em dano oxidativo evidente, apesar da formação de EROs e da modulação no sistema de defesa antioxidante. Esses resultados corroboram com os obtidos em fígado de camundongos infectados pelo CARV. Entretanto, mais estudos são necessários para a melhor compreensão da relação entre a infecção hepática pelo CARV com os parâmetros oxidantes e antioxidantes celulares, bem como com outros mediadores pró-inflamatórios.

7- REFERÊNCIAS

ABEL, S. et al. Altered lipid profile, oxidative status and hepatitis B virus interactions in human hepatocellular carcinoma. **Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids**, v. 81, n. 5-6, p. 391–9, 11 jan. 2009.

AGUIRRE, J.; LAMBETH, J. D. Nox enzymes from fungus to fly to fish and what they tell us about Nox function in mammals. **Free radical biology & medicine**, v. 49, n. 9, p. 1342–53, 15 nov. 2010.

AKAIKE, T. et al. Pathogenesis of influenza virus-induced pneumonia: involvement of both nitric oxide and oxygen radicals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 93, n. 6, p. 2448–2453, 1996.

BARR, J. N.; RODGERS, J. W.; WERTZ, G. W. The Bunyamwera virus mRNA transcription signal resides within both the 3' and the 5' terminal regions and allows ambisense transcription from a model RNA segment. **Journal of virology**, v. 79, n. 19, p. 12602–7, 2005.

BLITVICH, B. J. Transmission dynamics and changing epidemiology of West Nile virus. **Animal Health Research Reviews**, v. 9, n. 01, p. 71–86, 2008.

BRINTON, M. A. et al. Characterization of murine Caraparu Bunyavirus liver infection and immunomodulator-mediated antiviral protection. **Antiviral Res**, v. 20, n. 2, p. 155–171, 1993.

BROWN, L. A. Glutathione protects signal transduction in type II cells under oxidant stress. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 266, n. 2, p. L172–177, 1 fev. 1994.

CAI, J. et al. Biomarkers of oxidation stress, inflammation, necrosis and apoptosis are associated with hepatitis B-related acute-on-chronic liver failure. **Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology**, 2015.

CAMINI, F.C. Avaliação dos marcadores de estresse oxidativo e defesas antioxidantes em fígado de camundongos após infecção pelo vírus *Caraparu*. 83f. Dissertação. Núcleo de pesquisa em Ciências Biológicas. Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2014.

CAMINI, F. C. et al. Caraparu virus induces damage and alterations in antioxidant defenses in the liver of BALB/c mice after subcutaneous infection. **Archives of Virology**, v. 159, n. 10, p. 2621–2632, 2014.

CASOLA, A et al. Oxidant tone regulates RANTES gene expression in airway epithelial cells infected with respiratory syncytial virus. Role in viral-induced interferon regulatory factor activation. **The Journal of biological chemistry**, v. 276, n. 23, p. 19715–22, 2001.

CAUSEY O.R., CAUSEY C.E., MAROJA O.M., MACEDO D.G. The isolation of arthropod-borne viruses, including members of two hitherto undescribed serological groups, in the Amazon region of Brazil. **Am J Trop Med Hyg**, v. 10, p. 227-249, 1961.

CAUSEY, O.R., CAUSEY C.E. MAROJA O.M, M. D. G. Wild life and mosquitoes of the area. The most remote of the forests is the Oriboca virgin forest, where swamps and woodland. **Viruses**, p. 227–249, 1961.

COACCIOLI, S. et al. Oxidant/antioxidant status in patients with chronic HIV infection. **Clin Ter** 161:55-58, 2010.

CRUZ, A. C. R.; VASCONCELOS, P. F. D. C. Arbovírus No Brasil. **Biológico**, v. 70, n. 2, p. 45–46, 2008.

DE BRITO MAGALHÃES, C.L. et al. Identification of a phylogenetically distinct orthobunyavirus from group C. **Arch Virol**, v. 7, p. 1173-1184, 2011.

DHANWANI, R. et al. Characterization of Chikungunya virus infection in human neuroblastoma SH-SY5Y cells: Role of apoptosis in neuronal cell death. **Virus Research**, v. 163, n. 2, p. 563–572, 2012.

DIAZ, M.O et al. Homozygous deletion of the α and β_1 - interferon genes in human leukemia and derived cells lines. **Medical Sciences**, v.85, p. 5259-5263, 1988.

DRÖGE, W.; ECK, H.-P.; MIHM, S. **Oxidant-antioxidant status in human immunodeficiency virus infection**. [s.l.] Elsevier, 1994. v. 233

DUYGU F, *et al.* Relationship of Oxidative Stress in Hepatitis B Infection Activity with HBV DNA and Fibrosis. **Ann Lab Med**; 32:113-118 <http://dx.doi.org/10.3343/alm.2012.32.2.113>. 2012.

ELLIOTT, R. M. Orthobunyaviruses: recent genetic and structural insights. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 10, p. 673–685, 2014.

ELLIOTT, R. M.; WEBER, F. Bunyaviruses and the type I interferon system. **Viruses**, v. 1, n. 3, p. 1003–21, 2009.

ENQUIST L.W. & RACANIELLO V.L.. General Virology. Virology: From Contagium Fluidum to Virome. **In Fields Virology, 6th ed.**, D.M. Knipe, P.M. Howley (eds.), Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, p. 1-20, 2013.

EVANS, M. D.; CHURCH, D. F.; PRYOR, W. A. Aqueous cigarette tar extracts damage human alpha-1-proteinase inhibitor. **Chemico-Biological Interactions**, v. 79, n. 2, p. 151–164, 1991.

FANG, Y.-Z.; YANG, S.; WU, G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. **Nutrition**, v. 18, n. 10, p. 872–879, 10 out, 2002.

FERREIRA, J.G.G., Análise de Alterações Na Expressão de Genes Relacionados Com A Imunidade Inata Em Células Humanas Infectadas com *Apeu virus*. 2015. 94 f. Dissertação. Fundação Oswaldo Cruz. Instituto de Pesquisas René Rachou, Belo Horizonte. 2015

- FIGUEIREDO, L. T. M. Vírus brasileiros da família bunyaviridae. **Medicina**, n. 6875, p. 154–158, 1999.
- FIGUEIREDO, L. T. M. Emergent arboviruses in Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 40, n. 2, p. 224–229, 2007.
- FORSHEY, B. M. et al. Arboviral Etiologies of Acute Febrile Illnesses in Western South America, 2000–2007. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 8, p. e787, 2010.
- GEISZT, M.; LETO, T. L. The Nox Family of NAD(P)H Oxidases: Host Defense and Beyond. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, n. 50, p. 51715–51718, 2004.
- GIL, L. et al. Oxidative stress in adult dengue patients. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, n. 5, p. 652–657, 2004.
- GRIFFITH O.W. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. **Anal Biochem**. Jul 15;106(1):207-12, 1980.
- GUBLER, D. J. The Global Emergence / Resurgence of Arboviral Diseases As Public Health Problems. **Archives of Medical Research**, v. 33, p. 330–342, 2002.
- HALLIWELL, B. Biochemistry of Oxidative Stress. **Angewandte Chemie International Edition in English**, v. 25, n. 12, p. 1058–1071, 2007.
- HALLIWELL, B.; CROSS, C. E. Oxygen-derived species: their relation to human disease and environmental stress. **Environ.Health.Perspect.**, v. 102 Suppl, n. 2, p. 5–12, 1994.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Free Radicals in Biology and Medicine. **Clarendon Press**, Oxford.1989.
- HART, T. J.; KOHL, A.; ELLIOTT, R. M. Role of the NSs Protein in the Zoonotic Capacity of Orthobunyaviruses. **Zoonoses and Public Health**, v. 56, n. 6-7, p. 285–296, 2009.
- HOSAKOTE, Y. M. et al. Respiratory syncytial virus induces oxidative stress by modulating antioxidant enzymes. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 41, n. 3, p. 348–57, 2009.
- HOSAKOTE, Y.M. *et al.* Viral-mediated inhibition of antioxidant enzymes contributes to the pathogenesis of severe respiratory syncytial virus bronchiolitis. **Am J Respir Crit Care Med.**, v. 183, p. 1550-1560. 2011.
- IVANOV, A. et al. HCV Core Protein Uses Multiple Mechanisms to Induce Oxidative Stress in Human Hepatoma Huh7 Cells. **Viruses**, v. 7, n. 6, p. 2745–2770, 2015.
- IVERSSON, L.B. et al. Human disease in Ribeira Valley, Brazil caused by Caraparu, a group C arbovirus- report of a case. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 29, p.112-117. 1987.

- KAYA, S. et al. Sequential determination of serum viral titers, virus-specific IgG antibodies, and TNF- α , IL-6, IL-10, and IFN- γ levels in patients with Crimean-Congo hemorrhagic fever. **BMC infectious diseases**, v.14, n. 1, p. 416, 2014.
- KHADEM ANSARI, M. H.; OMRANI, M.-D.; KHERADMAND, F. Oxidative Stress Response in Patients Infected by Diverse Hepatitis C Virus Genotypes. **Hepatitis Monthly**, v. 15, n. 2, p. 1–5, 2015.
- KLASSEN, P. et al. Classic dengue fever affects levels of circulating antioxidants. **Nutrition (Burbank, Los Angeles County, Calif.)**, v. 20, n. 6, p. 542–7, 6 jun. 2004.
- KOWALTOWSKI, A. J.; VERCESI, A. E. Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 3-4, p. 463–471, fev. 1999.
- KWOK, H.; POON, P.; FOK, S. et al. Anti-inflammatory effects of indirubin derivatives on influenza A virus-infected human pulmonary microvascular endothelial cells. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1-8, jan. 2016.
- LAN, T. et al. IL-6 Plays a Crucial Role in HBV Infection. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*, v. 3, p. 271–276, 2015.
- LIANG, G.; GAO, X.; GOULD, E. A. Factors responsible for the emergence of arboviruses; strategies, challenges and limitations for their control. **Emerging Microbes & Infections**, v. 4, n. 3, p. e18, 2015.
- MASTERS, C.; PEGG, M.; CRANC, D. On the multiplicity of the enzyme catalase in mammalian liver. **Mol Cell Biochem**, V.70, P.113–120, 1986.
- MEISTER, A.; ANDERSON, M.E. Glutathione. **Annual Reviews of Biochemistry**, v.45, p. 711-760, 1983.
- MORICHI, S.; MORISHITA, Y.; ISHIDA, Y. et al. Examination of neurological prognostic markers in patients with respiratory syncytial virus-associated encephalopathy. **International Journal of Neuroscience**, v. 7454, p. 1-23, jan. 2016.
- MOURÃO, M. P. G. et al. Arboviral diseases in the Western Brazilian Amazon: a perspective and analysis from a tertiary health & research center in Manaus, State of Amazonas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 48 Suppl 1, n. August 2013, p. 20–26, 2015.
- NARAYANAN, A. et al. Alteration in superoxide dismutase 1 causes oxidative stress and p38 MAPK activation following RVFV infection. **PLoS ONE**, v. 6, n. 5, p. e20354, 2011.
- NUNES, M. R. T. et al. Molecular epidemiology of Group C viruses (Bunyaviridae , Orthobunyavirus) isolated in the Americas. **Journal of Virology**, v. 79, n. 16, p. 10561–10570, 2005.
- OLAGNIER, D. et al. Cellular oxidative stress response controls the antiviral and apoptotic

- programs in dengue virus-infected dendritic cells. **PLoS pathogens**, v. 10, n. 12, p. e1004566, 2014.
- PAL, S. et al. Hepatitis C virus induces oxidative stress, DNA damage and modulates the DNA repair enzyme NEIL1. **Journal of gastroenterology and hepatology**, v. 25, n. 3, p. 627–634, 2010.
- PEGO, P.N. et al. Mayaro Virus Disease. **Journal of Human Virology & Retrovirology**, v.1, n.3, p.1-11, 2014
- PERRY, J. J. P. et al. The structural biochemistry of the superoxide dismutases. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1804, n. 2, p. 245–62, fev. 2010.
- PETERHANS, E. Reactive oxygen species and nitric oxide in viral diseases. **Biol Trace Elem Res**, v. 56, p.107-116. 1997.
- RAHMAN, I.; BISWAS, S. K.; KODE, A. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. **European journal of pharmacology**, v. 533, n. 1-3, p. 222–39, 8 mar. 2006.
- SALANUEVA, J. et al. Polymorphism and Structural Maturation of Bunyamwera Virus in Golgi and Post-Golgi Compartments In. v. 77, n. 2, p. 1368–1381, 2003.
- SANTOS, R. et al. Spread of Oropouche Virus into the Central Nervous System in Mouse. **Viruses**, v. 6, n. 10, p. 3827–3836, 2014.
- SCHWARZ, K. B. - ~ Review Article. v. 21, n. 5, p. 641–649, 1996.
- SEET, R. C. S. et al. Oxidative damage in dengue fever. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 47, n. 4, p. 375–380, ago. 2009.
- SHOPE, R. E.; WOODALL, J. P.; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A. The epidemiology of disease caused by viruses in group C and Guama' (*Bunyaviridae*). In **T. P. Monath (ed.), The arboviruses: epidemiology and ecology**. p.37–52.CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla, 1988.
- SOLDAN, S. S.; GONZÁLEZ-SCARANO, F. Emerging infectious diseases: The *Bunyaviridae*. **Journal of Neurovirology**, v. 11, n. 5, p. 412–423, 2005.
- VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-biological interactions**, v. 160, n. 1, p. 1–40, 10 mar. 2006.
- VAN KNIPPENBERG, I.; FRAGKLOUDIS, R.; ELLIOTT, R. M. The Transient Nature of Bunyamwera Orthobunyavirus NSs Protein Expression: Effects of Increased Stability of NSs Protein on Virus Replication. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, p. e64137, 2013.
- WALTER, C. T.; BARR, J. N. Recent advances in the molecular and cellular biology of bunyaviruses. **Journal of General Virology**, v. 92, n. 11, p. 2467–2484, 2011.

WANG, J. et al. Inhibitory effect of glutathione on oxidative liver injury induced by dengue virus serotype 2 infections in mice. **PloS one**, v. 8, n. 1, p. e55407, 2013.

WEBER, F. et al. The Bunyamwera virus nonstructural protein NSs inhibits viral RNA synthesis in a minireplicon system. **Virology**, v. 281, n. 1, p. 67–74, 2001.

WERNIKE, K. et al. Inactivated Schmallenberg virus prototype vaccines. **Vaccine**, 2013.

YAHYA, RS *et al.* Role of interleukin-8 and oxidative stress in patients with hepatocellular carcinoma. **Clin Lab.**, v.59, p. 969-76, 2013.

ZHANG, Y. et al. Antioxidants: potential antiviral agents for Japanese encephalitis virus infection. **International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases**, v. 24, p. 30–36, 2014.

1) Publicação de artigo científico

Arch Virol (2014) 159:2621–2632
 DOI 10.1007/s00705-014-2123-2

ORIGINAL ARTICLE

Caraparu virus induces damage and alterations in antioxidant defenses in the liver of BALB/c mice after subcutaneous infection

Fernanda Caetano Camini · Letícia Trindade Almeida · Carolina Silva Bernardes ·
 Maísa Silva · Maria Lúcia Pedrosa · Daniela Caldeira Costa · Wanderson Geraldo de Lima ·
 Carla do Amaral Pinto · Paulo César Peregrino Ferreira · José Carlos de Magalhães ·
 Cintia Lopes de Brito Magalhães

Received: 18 September 2013 / Accepted: 14 May 2014 / Published online: 27 May 2014
 © Springer-Verlag Wien 2014

Abstract Oxidative stress is a disturbance in the oxidant-antioxidant balance leading to potential cellular damage. Most cells can tolerate a mild degree of oxidative stress because they have a system that counteracts oxidation that includes antioxidant molecules such as glutathione (GSH) and superoxide dismutase (SOD). Disruption of the host antioxidant status has been recognized as an important contributor to the pathogenesis of many viruses. Caraparu virus (CARV) is a member of group C of the *Bunyaviridae* family of viruses. In South American countries, group C bunyaviruses are among the common agents of human febrile illness and have caused multiple notable outbreaks of human disease in recent decades; nevertheless, little is known about the pathogenic characteristics of these viruses. The purpose of this study was to examine the hepatic

pathogenesis of CARV in mice and the involvement of oxidative stress and antioxidant defenses on this pathology. Following subcutaneous infection of BALB/c mice, CARV was detected in the liver, and histopathology revealed acute hepatitis. Increased serum levels of aspartate and alanine aminotransferases (AST/ALT) and greater hepatic expression of the proinflammatory cytokine tumor necrosis factor- α (TNF- α) were found in infected animals. CARV infection did not alter the biomarkers of oxidative stress but caused an increase in GSH content and altered the expression and activity of SOD. This is the first report of an alteration of oxidative homeostasis upon CARV infection, which may, in part, explain the hepatic pathogenesis of this virus, as well as the pathogenesis of other *Bunyaviridae* members.

F. C. Camini · M. L. Pedrosa · D. C. Costa ·
 W. G. de Lima · C. L. de Brito Magalhães
 Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, NUPEB,
 Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais,
 Brazil

F. C. Camini · L. T. Almeida · C. S. Bernardes · M. Silva ·
 M. L. Pedrosa · D. C. Costa · W. G. de Lima ·
 C. L. de Brito Magalhães (✉)
 Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal de
 Ouro Preto, Campus Universitário Morro do Cruzeiro,
 Ouro Preto, Minas Gerais 35.400-000, Brazil
 e-mail: cintia.magalhaes@gmail.com

C. do Amaral Pinto · P. C. P. Ferreira
 Departamento de Microbiologia, Universidade Federal de Minas
 Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

J. C. de Magalhães
 Departamento de Química, Biotecnologia e Engenharia de
 Bioprocessos, Universidade Federal de São João del-Rei,
 Ouro Branco, Minas Gerais, Brazil

Introduction

Oxidative stress is an important contributor to pathogenesis in many viral diseases, such as hepatitis B, hepatitis C, Rift Valley fever, respiratory disease caused by respiratory syncytial virus, and dengue [7, 8, 10, 15–18, 21, 24, 39]. Reactive oxygen species (ROS) are highly unstable molecules that are involved in many forms of tissue damage, including the damage caused to cellular components such as lipids, proteins and DNA [14, 15]. However, cells are protected against ROS and oxidative damage by well-developed enzymatic and non-enzymatic antioxidant systems, including superoxide dismutase (SOD), catalase, glutathione-dependent enzymes, thioredoxin and peroxiredoxins [17]. Within cells, the redox potential is determined primarily by the total content of glutathione (GSH) [26]. GSH is particularly important in the liver, where it serves as the principal non-protein thiol involved in the cellular

2) Participação em congressos, seminários e simpósios







