

ESTUDO DO PROCESSO DE APOPTOSE INDUZIDO POR *FLAVIVÍRUS*

Daniel Sanches

Mestre em Ciências Biológicas

RESUMO

O vírus da febre amarela (YFV) é membro da família *flaviviridae* e possui relativa importância em países da América do Sul e da África. A infecção por membros da família *flaviviridae* induz apoptose *in vivo* e *in vitro*. A apoptose pode ser ativada por três diferentes vias efetoras: a via de receptor de morte celular, a via mitocondrial e a via de estresse de retículo endoplasmático (ERS). Durante a apoptose, alguns mecanismos celulares ocorrem, como a exposição de fosfatidilserina (PS), fragmentação de DNA e ativação de caspases. A via de ERS pode ser ativada pelo acúmulo de proteínas mal enoveladas, que induzem a dissociação da proteína chaperona BiP de ATF6, PERK e IRE1. Uma vez que esses fatores se dissociam de BiP, eles ficam ativos e passam a mediar o ERS; ATF6 é translocado para o Golgi, onde sofre uma clivagem. PERK fosforila e inativa eIF2a. IRE1 é uma RNase que faz a edição alternativa do RNAm de XBP1. A ativação dessas três vias leva à produção de fatores de resposta ao ERS, principalmente aumento dos níveis de CHOP, que é capaz de regular a ativação da via mitocondrial. Uma vez ativada a via mitocondrial, ocorre perda do potencial de membrana mitocondrial e liberação de fatores pró-apoptóticos através do canal aniônico dependente de voltagem (VDAC). Para investigar o processo de apoptose induzido pelo YFV, nós infectamos células Vero com o YFV, utilizando uma MOI=1. Analisamos a viabilidade celular a partir do ensaio de LDH e *LIVE/DEAD*. Observamos que 72 horas após a infecção as células apresentam um processo de morte celular. A indução de ERS pela infecção viral foi observada através da superexpressão de CHOP. Além disso, notamos a presença de eIF2a fosforilado, ATF6 clivado, por técnicas de western-blotting e RNAm de XBP1 editado pela eletroforese em agarose. Os níveis de expressão de BiP não se alteraram. Analisamos também, através da técnica TUNEL, o processo apoptótico induzido pela infecção viral 96 horas após a infecção. A ativação da via mitocondrial foi confirmada pelos ensaios de potencial de membrana mitocondrial, utilizando o marcador Dioc6, e pela inibição do translocador de nucleotídeo (ANT), que

impede a formação do VDAC. A ativação de caspases foi confirmada pelo ensaio com o inibidor z-VAD-fmk. A apoptose foi observada 72 horas após a infecção, com exposição de PS e fragmentação nuclear. A ativação do ERS foi observada após 24 horas de infecção com a fosforilação de eIF2 α e diminuição da forma citosólica de Bip. Após 48 horas de infecção, observamos a superexpressão de CHOP. Nós também notamos, 72 horas após a infecção, perda do potencial de membrana mitocondrial, a dependência do ANT e a dependência da ativação de caspases para indução de morte. Esses resultados sugerem que o ERS pode estar ativando a via mitocondrial durante a morte celular induzida pelo YFV.

Suporte: CNPq, CAPES, FAPERJ, INBEB, PRONEX

Palavras-chave: Febre-Amarela; Apoptose; Via de estresse de retículo endoplasmático; Via mitocondrial.