Replicação do vírus Oropouche em células de glioblastoma

Felipe Rabelo Santos*, Pierina L. Parise, Daniel A. T. Teixeira, Mariene R. Amorim, Guilherme P. Milanez, José Luiz Proença-Módena.

Resumo

Oropouche (OROV) é um vírus transmitido por insetos associado a complicações neurológicas em humanos. OROV é detectado no líquido cefalorraquidiano de pacientes com meningite asséptica e induz sintomas neurológicos, como nistagmo, diplopia e perda de equilíbrio, em até 5% dos pacientes sintomáticos. Os mecanismos de dano por esse vírus no Sistema Nervoso Central (SNC) ainda não são completamente entendidos, mas acredita-se que a inflamação gerada durante a infecção possa contribuir para esse fenômeno. Assim, pretendemos caracterizar a capacidade de OROV replicar e induzir a produção de quimiocinas e citocinas inflamatórias em células de glioblastoma.

Palavras-chave:

Oropouche, replicação, titulação.

Introdução

OROV é um arbovírus emergente, da família *Bunyaviridae*, transmitido por *Culicoides paraensis* que causa uma doença febril exantemática aguda, conhecida como febre do Oropouche, na região amazônica brasileira e de outros países da América Latina, como Peru, Trinidad, Venezuela e Suriname (1). Além disso, OROV é neurotrópico e alcança o SNC em parte dos pacientes infectados e em modelo animal (2, 3, 4). Embora esse vírus possa utilizar diversas vias para acessar o SNC, foi recentemente descrito que ele pode migrar da periferia por transporte retrogrado por nervos sensoriais (5). Uma vez no cérebro, OROV infecta neurônios. Entretanto, o papel da infecção por esse vírus e a produção de mediadores imunes em células da glia na migração leucocitária transendotelial não é completamente entendido. Deste modo, este trabalho pretende caracterizar a cinética de replicação de OROV e a produção de mediadores imunes em células de glioblastoma (U-251).

Resultados e Discussão

Para caracterizar a cinética de replicação de OROV em U-251, infectamos uma placa de 24 poços com $2,0 \times 10^5$ células por poço com MOI=1. O sobrenadante celular e as células aderidas foram coletadas nos tempos 0, 4, 12, 24, 36, 48 e 60 horas pós-infecção. O sobrenadante foi usado para titulação viral por ensaio de foco infeccioso, enquanto as células, coletadas em tampão de lise (RNeasy Mini Kit, Qiagen), serão utilizadas para as dosagens dos mediadores imunes por qRT-PCR. A titulação viral foi realizada em placa de 96 poços com 5×10^4 células VERO por poço, usando anticorpo anti-OROV 1:1000 (ATCC) e anticorpo secundário anti-murino 1:5000 marcado com peroxidase (Sigma). A leitura foi realizada após reação com um substrato (TrueBlue - KPL), que marcou as células infectadas de azul. A cinética de replicação pode ser observada na Figura 1. Os ensaios de quantificação relativa por qRT-PCR para os genes IFN- α , IFN- β , IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, CCL2, CCL3 e CCL4 estão em andamento.

Com esse resultado podemos demonstrar que células da glia oriundas de um glioblastoma são susceptíveis e permissivas à infecção por OROV. Desse modo, não seria incoerente pensar que a infecção

dessas células no SNC possa orquestrar a produção de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias que venham a recrutar células imunes periféricas, causando dano neurológico observado em animais e pacientes infectados com esse vírus.

Cinética de OROV

Figura 1. Titulação da cinética de replicação de OROV.

Conclusões

Este trabalho demonstrou que o vírus Oropouche se replica em células de glioblastoma, o que pode induzir um processo inflamatório no SNC, associado com dano neurológico e o desenvolvimento de encefalite observada em pacientes e animais infectados.

Agradecimentos

Financiado pelo PIBIC/CNPq.

1. Vasconcelos HB, Nunes MR, Casseb LM, Carvalho VL, Pinto da Silva EV, Silva M, Casseb SM, Vasconcelos PF. 2011. Molecular epidemiology of Oropouche virus, Brazil. *Emerging infectious diseases* 17:800-806.
2. Pinheiro FP, Travassos da Rosa AP, Travassos da Rosa JF, Ishak R, Freitas RB, Gomes ML, LeDuc JW, Oliva OF. 1981. Oropouche virus. I. A review of clinical, epidemiological, and ecological findings. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 30:149-160.
3. Pinheiro FP, Rocha AG, Freitas RB, Ohana BA, Travassos da Rosa AP, Rogerio JS, Linhares AC. 1982. [Meningitis associated with Oropouche virus infections]. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 24:246-251.
4. Proença-Módena JL, Hyde JL, Sesti-Costa R, Lucas T, Pinto AK, Richner JM, Gorman MJ, Lazear HM, Diamond MS. 2015. IRF-5-dependent signaling restricts Orthobunyavirus dissemination to the central nervous system. *Journal of virology*.
5. Santos RI, Almeida MF, Paula FE, Rodrigues AH, Saranzo AM, Paula AE, Silva ML, Correa VM, Acrani GO, Neder L, Arruda E. 2012. Experimental infection of suckling mice by subcutaneous inoculation with Oropouche virus. *Virus research* 170:25-33.

DOI: 10.19146/pibic-2017-78027