

AGUINALDO JOSÉ DO NASCIMENTO

ESTUDOS METABÓLICOS EM CORAÇÃO DE LÁPARIOS  
INFECTADOS COM VIRUS DA FEBRE AFTOSA

Tese apresentada ao Instituto de Bioquímica  
da Universidade Federal do Paraná para a  
obtenção do título de "Mestre em Bioquímica"

CURITIBA PARANÁ 1972

ESTUDOS METABÓLICOS EM CORAÇÃO DE LÁPAROS INFECTADOS COM VIRUS DA FEBRE AFTOSA.

I N T R O D U Ç Ã O

Conhece-se desde longa data (1) os agentes infecciosos invisíveis ao microscópio ótico comum, incultiváveis nos meios utilizados para o crescimento bacteriano, mesmo para as bactérias mais exigentes, e capazes de atravessar filtros capazes de reterem bactérias. A primeira etapa da descoberta dos vírus foi por Iwanowski, que indicou sua presença como causador de uma doença em planta de fumo. Como Iwanowski não estava totalmente certo de sua descoberta, coube a Beijerinck em 1898 comprovar a existência do TMV (vírus do mosaico do fumo) (2). Ainda em 1898, atribuindo natureza corpuscular ao agente causador da aftosa, Loeffler e Frosch pensaram que o líquido de uma vesícula aftósica, livre de germes, conteriam os elementos necessários para proteger os animais contra a enfermidade. Passaram êste líquido através um filtro Berkefeld e verificaram que o líquido continuava infeccioso para os bovinos. Foi assim descoberto o primeiro vírus dos animais (3).

Lwoff (4) define vírus como partículas infeccio -

sas possuindo um unico tipo de ácido nucleico e que se reproduz somente de seu material genético. O virus da febre aftosa é classificado segundo Iwoff e Tounier (5) como:

Família : Napoviridae  
Sub-família: Picornavirinae  
Gênero : Picornavirus  
Espécie : Aphthae

Picornavirus, de acordo com o Grupo Internacional de Estudos de Enterovirus em 1963 (6), são virus que:

- 1) São pequenos em tamanho (15 a 30 nm de diâmetro)
- 2) São insensíveis a inativação pelo éter etílico
- 3) Contém ácido ribonucleico (RNA).

Ele afeta todos os animais de patas fendidas, mas principalmente bovinos, suínos, ovinos e caprinos. Sua importância é devido a grandes perdas econômicas que resultam do decréscimo da produtividade e pelas restrições impostas pelo comércio internacional (7).

Nagel (8) em 1937 e posteriormente Hofmann (9) em 1941-1944, utilizaram o rato branco para rápida multiplicação em condições artificiais, porém Skinner (10) em 1951 demonstrou pela primeira vez que escolhendo o coração como tecido para passagem e a cavidade peritoneal com o via de inoculação, havia adaptação do vírus ao rato sem nenhuma dificuldade.

Garcia Mata (11) em 1951 verificou que inoculando

o vírus aftoso em ratos recém nascidos, observa-se morte dentro de breves horas. Verificou também que havia uma idade crítica no desenvolvimento dos ratos em que a inoculação não produzia nenhuma lesão, sendo êste momento mais precoce nas fêmeas.

Dacorso Filho e Cunha (12) em 1954 verificaram que em coelhos recém-nascidos havia morte dentro de 24 horas após a inoculação. Os sinais da doença manifestavam-se por paralisia dos membros. Em 1955, Garcia Mata (13) verificou em animais recém-nascidos de diversas espécies, que o vírus tinha predileção pelos tecidos do coração, e que a morte ocorria entre 30 a 60 horas após a infecção.

Os carboidratos desempenham papéis de fornecimento de energia e de precursor para o processo da replicação viral. As alterações na glicólise induzida por vírus foram observados em diversas ocasiões:

Kun e Smith (14) em 1950 e Smith e Kun (15) em 1954, verificaram um aumento na glicólise em membrana corioalantóica de embrião de galinha após infecção com vírus mixoma.

Racker (16) em 1954, observou uma inibição na glicólise em cérebro de rato infectados com vírus da poliomelite, tipo II e com vírus Theiler FA, da encefalomyelite de rato.

Levy e Baron (17) em 1956, afirmaram que em tecidos de rim de macaco infectado com vírus da poliomelite, ocorria aumento na glicólise.

Fisher e Ginsberg (18) em 1956 mostraram que vírus influenza inibe a glicólise em leucócitos de cobaia.

Fisher e Ginsberg (19) em 1957 mostraram que em cultura de células HeLa, infectadas com adenovírus, havia aumento na glicólise, bem como aumento na produção de ácido láctico, acético, pirúvico e aceto-glutárico nas células infectadas.

Green et al (20) em 1957, encontraram que cultura de células humanas infectadas com vírus da doença Newcastle exibiam aumento na glicólise, enquanto que o vírus mumps (da cachumba) não provocava nenhuma alteração na mesma.

Kit e Griffin (21) em 1958, concebem 4 aspectos do metabolismo de carboidratos, para o aumento da glicólise anaeróbica em células de mamíferos.

- 1) - A concentração e atividade de enzimas glicolíticas.
- 2) - Deficiências na cadeia do transporte de elétrons.
- 3) - Inabilidade relativa da mitocôndria em oxidar o piruvato pelo Ciclo de Krebs.
- 4) - Falha no mecanismo normal regulatório que controla a glicólise e respiração.

Polatinic e Bachrach (22) em 1960, em cultura de células de rim de bovino infectado com vírus aftoso, verificaram um aumento na glicólise durante a produção de vírus. Estes resultados foram confirmados por Rebenkov et al (23) em 1967, em cultura de células de rim de embrião de porco, e afirmando que a intensificação da glicólise parece preceder a acumulação vírica das células infectadas. Em 1969, Milsteins e Eligulashvili (24), verificaram que ocorre uma intensificação na glicólise em cultura -

de células do fibroblasto de embrião de hamster infectadas pelo adenovirus tipos I e 12. Eligulashvili (25) em 1970, observou também um aumento na glicólise em cultura de células infectadas com Vírus Sarcoma de Maloney.

Pledger e Polatinic (26) em 1963, em cultura de células de rim de bovino, verificaram que o ciclo das pentoses utilizara aproximadamente 4% do metabolismo total da glicose-<sup>14</sup>C, e que a via glicolítica utilizara 95%. Observaram também que somente 2,5% do substrato utilizado forneceu CO<sub>2</sub>. As células infectadas com vírus da febre aftosa mantiveram o mesmo padrão do metabolismo de glucose que as células normais.

O ácido pirúvico é um intermediário comum entre a respiração e a glicólise. Ele compete por elétrons mantidos pelo NADH<sub>2</sub> extramitocondrial, com os componentes da cadeia respiratória, que transportam os elétrons para o oxigênio. Esta competição, segundo Weinhouse (27) em 1956, seria o fator crucial na determinação do grau da glicólise anaeróbica.

Olson e Stare (28) em 1951 afirmaram que, em fatias de coração de pato respirando <sup>em</sup> salina-fosfato, 50% do piruvato que não era transformado em lactato, era descarboxilado. O restante era consumido via fosfoenolpiruvato para precursores de carboidratos. Miller e Olson (29) em 1952, verificaram que a utilização do piruvato por fatias de músculo cardíaco de pato era função da concentração do substrato e que a contribuição do piruvato adicionado para o consumo de oxigênio variava de 45% a 93%.

Pardee e Kunkee (30) em 1952, encontraram um decréscimo na atividade do consumo de oxigênio quando se usava piruvato como substrato em E. coli infectada com bacteriófago.

Levine et al (31) em 1956 verificaram que havia

um sinergismo quando se combinavam glicose e piruvato para síntese de vírus influenza em cultura de membrana corialantóica.

Spizizen (32) em 1957, verificou que E. coli infectada com bacteriófagos tinha sua capacidade de metabolizar o piruvato bastante reduzida. O vírus T<sub>7</sub> inibia quase completamente a utilização do piruvato, enquanto que o vírus T<sub>2</sub> reduzia apreciavelmente sua taxa de oxidação.

Polatinick e Pledger (33) em 1962, observaram que o piruvato era pouco metabolizado em culturas de rim de bovino infectado com vírus da febre aftosa.

Rebenkov et al (23) em 1967, em cultura de rim de embrião de porco, verificaram que o ácido pirúvico se forma mais intensamente em cultura normal que em cultura infectada com vírus aftoso.

A atividade metabólica do Ciclo de Krebs nas células hospedeiras, mostrou ser de grande importância para multiplicação do vírus influenza, quando Ackermann (34) em 1951 e Ackermann<sup>e</sup>/Francis (35) em 1954 testaram a privação de substrato, supressão da tensão de oxigênio e interrupção do sistema de transporte de hidrogênio e inibição das desidrogenases.

Pearson e Winzler (36) em 1949, usando cultura de cérebro de rato, não encontraram nenhuma troca na respiração, induzida pela propagação de vírus Theiler, nem alterações na via glicolítica em relação aos controles.

Ainslie (37) em 1952 verificou que o fluoroaceta

to, agente inibidor da aconitase do ciclo de Krebs, inibia o crescimento do vírus da poliomelite em ratos, (mostrando que o crescimento do vírus da poliomelite estava intimamente relacionado com o funcionamento do ciclo de Krebs). Cooper (38) em 1959 concluiu que a glicólise poderia ser usada como fonte de energia para a síntese de poliovirus, mas que a via oxidativa também tinha sua parcela de contribuição.

Polatinick e Bachrach (39) em 1960, trabalhando com venenos metabólicos em cultura de células de rim de bovino infectadas com vírus da febre aftosa, verificaram que a produção de virus era mais fortemente afetada por inibidores glicolíticos que por inibidores do Ciclo de Krebs e da cadeia de transporte de elétrons. Assinalaram também que a falta de oxigênio durante 5 horas, no período de produção vírica, não afetava a multiplicação do vírus aftoso. Isto é uma forte evidência que a sequência oxidativa não é vital para a produção do vírus aftoso.

Polatinick (40) em 1961, verificou que em cultura de células de rim de bovino, a produção de vírus aftoso era apenas levemente alterada pelo DNP (dinitrofenol), agente desacoplador da fosforilação oxidativa. A produção vírica manteve-se <sup>no</sup> mesmo nível que o controle, graças a energia fornecida pela fosforilação anaeróbica.

Planterose (41) em 1961, assinalou que cultura de células de rim de porco infectada com vírus aftoso, mostrava a via glicolítica convencional, ciclo de Krebs e via oxidativa terminal, no início da infecção. Porém, ocorria declínio do consumo de oxigênio e aumentava a via glicolítica dos 2 aos 9 dias de cultura. Ele concluiu que a via oxidativa podia fornecer energia pa

ra síntese viral, mas que podia também ser totalmente substituída pela glicolise.

Polatinick e Pledger (33) em 1962 observaram que em culturas de rim de bovino infectado com vírus da febre aftosa, a taxa do consumo do piruvato não era alterado como resultado da infecção. Observaram também que o mesmo não era consumido via ciclo de Krebs nem formava ácido láctico, mas que havia uma alta taxa de consumo de piruvato em cultura de células de rim de bovino. Concluíram que o piruvato era largamente consumido por outras vias não oxidativas.

Pledger e Polatinick (42) em 1962, estudando o meio de crescimento para o vírus aftoso em culturas de células de rim de bezerro, verificaram que o ciclo de Krebs não mantém a reprodução vírica. Dos substratos do ciclo de Krebs testados, somente Succinato, Isocitrato,  $\alpha$ -ceto-glutarato e piruvato foram capazes de mantê-la em alguma extensão. Os mesmos autores (43), trabalhando com cultura de rim de bovino, mostraram que após a adição de glicose, 80-90% da quantidade total de ácido produzido era ácido láctico. Após a infecção com vírus aftoso, as células produziram apenas quantidades insignificantes a mais. Não foi encontrado nenhum ácido do ciclo de Krebs.

Pledger e Polatinick (42) em 1962 estudaram a produção do vírus da febre aftosa, em meio com diferentes concentrações de ion fosfato. Verificaram que o ion fosfato é necessário, mas que somente uma pequena concentração era requerida para manter ativa a reprodução vírica. Rebenkov et al (23) em 1967 verificaram em cultura de células de embrião de porco, que o fósforo inorgânico era absorvido durante o período que antecedia a produ-

ção vírica, sem diferenças para células normais e infectadas. Após este período havia acumulação de fósforo inorgânico no meio de cultura, também sem nenhuma diferença para células normais e infectadas.

Takatsuki et al (44) em 1969, verificaram que os inibidores da cadeia respiratória, Ascochlorin e Rotenona, mostraram significativos efeitos inibitórios sobre o crescimento do vírus da doença Newcastle em cultura de células de fibroblastos de embrião de galinha.

Simanovskaya et al (45) em 1969 verificaram que a reprodução dos vírus mumps e vaccinia em fibroblastos de embrião de galinha, causavam um decréscimo na capacidade respiratória da mitocôndria.

Finalmente gostaríamos de citar um trabalho de revisão de Bachrach (46) em 1968, que descreve os mais recentes desenvolvimentos no campo do vírus da febre aftosa.

Foi mostrado em diversos trabalhos (como por exemplo Green et al (20) em 1957 e Polatinick e Bachrach (22) em 1960), que ocorre um decréscimo na reação de oxidação e um aumento na glicólise em culturas de células normais, e que a infecção vírica nestas células apenas acentua este caráter. O presente trabalho tem a finalidade de estudar o metabolismo oxidativo em fatias e mitocôndrias de coração de lâmparos normais e infectados, os quais não apresentam o inconveniente que se verifica em cultura de tecidos, qual seja a glicólise aeróbica aumentada, fato este que por certo, nos levam a interpretações duvidosas dos resultados.

MATERIAL E MÉTODOS

1 - LÁPAROS :

Os láparos de 4 a 12 dias de idade, provenientes do biotério do Instituto de Biologia e Pesquisas Tecnológicas do Estado do Paraná (I.B.P.T.), foram sacrificados 30 horas após a inoculação. Os animais normais também foram sacrificados após igual período de jejum.

2 - VÍRUS :

Os láparos foram inoculados com vírus da febre aftosa, tipo "O" Campos, proveniente do Laboratório de Virologia do I. B.P.T., adaptados a coelhos com 98 passagens, via intraperitoneal, com 0,5 ml de suspensão tratada com cloroformio, na concentração de 1 grama de tecido infectado para 10 ml de salina tamponada. O título vírico médio no músculo cardíaco foi da ordem de  $DL_{50} 10^{-6,8}$ .

3 - FATIAS DE TECIDOS :

Os láparos foram decapitados e o coração imediatamente removido e lavado em solução a 5° de Ringer-fosfato, pH 7,4, preparada segundo Krebs e Hansleit (47) em 1932 e modificado por Barron et al (48) em 1948. Adicionou-se 80 ml da solução de Ringer a 20 ml de tampão fosfato 0,1M pH 7,4. As soluções foram misturadas no momento do uso.

A solução de Ringer continha 876 ml de NaCl 0,154 M; 26 ml de KCl 0,154 M; 10 ml de  $\text{CaCl}_2$  0,11 M e 5 ml de  $\text{MgSO}_4$  0,154 M. O tampão fosfato continha  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,1 M e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,1 M pH 7,4.

As fatias foram obtidas com o aparelho descrito por Vianna (49) em 1967 e colocadas em placa de Petri contendo Ringer-fosfato a 5° e continuamente aeradas.

#### 4 - MITOCÔNDRIAS :

##### a) - Mitocôndrias intactas

Os láparos foram decapitados e o coração imediatamente removido e lavado em meio de extração a 5° (Voss et al (50)). O meio de extração continha; Manitol (0,20M), Sacarose (0,075 M), TRIS (0,01 M) e EDTA (0,1 mM) pH 7,4. O coração foi cortado em pequenos fragmentos suspensos no meio de extração e homogeneizados em homogeneizador de Potter-Elvehjem (51).

O material resultante foi centrifugado a 1.000 x g - por 10 minutos, para eliminar células intactas, restos de membrana e núcleos. O sobrenadante foi centrifugado a 12.000 x g por 10 minutos. As mitocôndrias sedimentadas foram resuspensas no mesmo meio e centrifugadas duas vezes a 8.000 x g para lavagem. Finalmente foram resuspensas em meio de extração suficientes para uma concentração de 6 mg de proteína por ml, dosadas pelo método de Lowry et al (52).

b) - Mitocôndrias rompidas

As mitocôndrias obtidas pela técnica descrita acima foram rompidas no homogeneizador Sorvall Omni-Mixer, em banho de gelo, por 30 segundos a 10.000 revoluções por minuto.

5 - R E S P I R A Ç Ã O :

a) - Fatias de coração

O consumo de oxigênio pelas fatias, foi avaliado pelo respirômetro de Warburg (Umbreit et al (53) em 1949), a 37° com 60 agitações por minutos. O sistema continha fatias de tecidos - (30 a 60 mg de peso seco (P.S.)); 2,5 ml de Ringer-fosfato; 100 µmoles de substrato e 0,15 ml de KOH 20%, que foi colocado no poço central do frasco de Warburg. Os substratos utilizados foram : Succinato, Isocitrato e α-ceto-glutarato. A determinação do peso seco foi feita mantendo-se as fatias de tecidos colhidas ao fim de cada experiência, em estufa a 100° até peso constante.

b) - Mitocôndrias de coração

O consumo de oxigênio pelas mitocôndrias foi avaliado pelo respirômetro de Warburg. O sistema continha 0,5 ml de suspensão de mitocôndrias, 2,0 ml de meio de reação (Voss et al (50)), 100 µmoles de substrato e 0,15 ml KOH 20% que foi colocado no poço

central do frasco de Warburg. O meio de reação continha, Manitol (0,025 M); TRIS (0,01 M); EDTA (0,2mM); KCl (0,01 M); tampão-fosfato pH 7,4 (0,005 M).

Os substratos utilizados foram os mesmos que para fatias. O consumo de oxigênio foi realcionado com mg de proteína do meio.

#### 6 - FOSFORILAÇÃO OXIDATIVA :

A razão ADP/O foi determinada pelo método de Chance e Williams (54) em 1955, utilizando o polarógrafo descrito por Voss et al (55). O coeficiente de controle respiratório (RC) foi calculado como razão entre a taxa respiratória com o ADP<sup>e</sup> a respiração controle após o ADP ter sido consumido. O sistema continha 2,35 ml de meio de reação de mitocôndrias; 100  $\mu$ moles de substrato ; - 0,1 ml de suspensão de mitocôndria (4 mg de proteína).

#### 7 - ATIVIDADE DE NADH-OXIDASE :

Partículas submitocondriais com atividade NADH-Oxidase (56), foram preparadas adotando o procedimento descrito por Danielson et al (57). As mitocôndrias foram resuspensas em 55 ml de tampão fosfato (0,003 M) pH 7,5, e tratada por 2 minutos em banho de gelo, com o homogeneizador Sorvall Omni-Mixer com 24.000 revoluções por minuto. As partículas maiores foram removidas por centrifugação em centrífuga Spinco modelo L, rotor nº 40 a 20.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi recentrifugado a 105.000 -

x g por 30 minutos. O sedimento foi resuspenso em tampão fosfato 0,003 M. pH 7,5. A velocidade de oxidação do NADH foi medida no espectrofotômetro modelo BECKMAN DB, a 340 nm, usando o seguinte sistema: Cubeta de Quartzo de 1 ml contendo 0,8 ml de tampão-fosfato 0,003 M pH 7,5; 0,2 ml de NADH  $3,3 \times 10^{-4}$  M e 20  $\mu$ l de enzima NADH-oxidase (aproximadamente 250  $\mu$ g de proteína). Mediu-se a velocidade específica da oxidação do NADH pelo desaparecimento da densidade ótica (D.O.) em 340 nm.

#### 8 - CONSUMO DE PIRUVATO-PRODUÇÃO DE ÁCIDO LÁTICO :

As fatias de coração foram incubadas durante 2 horas no respirômetro de Warburg a 37° com 50  $\mu$ moles de piruvato - mais 50  $\mu$ moles de malato (58). O filtrato do meio de incubação - foi analisado para piruvato (que restou sem ser consumido), pelo método de Long (59). As fatias foram homogeneizadas no Potter-Elvehjem e o material resultante foi centrifugado a 1.000 x g. No sobrenadante foi retirado uma alíquota para dosagem de ácido láctico pelo método de Baker e Summerson (60). Os valores das dosagens de piruvato e ácido láctico foram relacionados com o peso seco do homogenato.

Com a finalidade de verificarmos a quantidade de ácido láctico produzido após as 30 horas de inoculação, os corações dos láparos suspensos na solução de Ringer-fosfato foram picados e homogeneizados no homogeneizador Potter-Elvehjem. O material resultante foi centrifugado a 1.000 x g e o extrato obtido foi dosado para ácido láctico e relacionado com mg de proteínas do extrato.

R E S U L T A D O S

Tabela I

Dosagem do ácido láctico em extrato livre de células de coração de láparos normais e infectados com vírus da febre aftosa após 30 horas de inoculação.

Média de 5 repetições

Láparos Normais.....: 23,57  $\mu$ g de ác. láctico/mg de proteína.  
Láparos Infectados.....: 35,15  $\mu$ g de ác. láctico/mg de proteína.

Tabela II

Resultado da incubação de fatias de coração de láparos normais e infectados com vírus da febre aftosa com piruvato e dosagem do ácido láctico formado.

Média de 4 repetições

Consumo de Piruvato:

Normais.....: 32,56  $\mu$ g piruvato/mg Pêso Sêco.  
Infectados.....: 47,52  $\mu$ g piruvato/mg Pêso Sêco.

Acumulação de ácido láctico:

Normais.....: Endógeno 0,65  $\mu$ g ác. lát./mg Pêso Sêco  
2,26  $\mu$ g ác. lát./mg Pêso Sêco  
Infectados.....: Endógeno 0,72  $\mu$ g ác. lát./mg Pêso Sêco  
2,55  $\mu$ g ác. lát./mg Pêso Sêco

Tabela III

Fosforilação oxidativa medida polarograficamente pela razão ADP/O, em mitocôndria de coração de láparos normais e infectados com vírus da febre aftosa.

| SUBSTRATOS       | ADP/O   |     |            |     |
|------------------|---------|-----|------------|-----|
|                  | NORMAIS |     | INFECTADOS |     |
|                  | ADP/O   | RC  | ADP/O      | RC  |
| α-ceto-glutarato | 3,3     | 9,8 | 2,9        | 9,7 |
| Isocitrato       | 3,1     | 3,2 | 2,9        | 3,1 |
| Succinato        | 1,9     | 5,2 | 1,9        | 4,6 |

Proteína : 4 mg

Tabela IV

μl O<sub>2</sub> em 60 minutos consumido pelas mitocôndrias de coração de láparos normais e infectados com vírus da febre aftosa.

| SUBSTRATOS       | Mitocond.Intactas |            | Mitocond.Rompidas |            |
|------------------|-------------------|------------|-------------------|------------|
|                  | Normais           | Infectadas | Normais           | Infectadas |
| Succinato        | 113,8             | 167,5      | 141,0             | 156,8      |
| Isocitrato       | 35,5              | 43,5       | 18,8              | 20,0       |
| α-ceto-glutarato | 22,5              | 13,2       | 14,3              | 17,3       |

Proteína : 3 mg

Quadro de variância do Consumo de oxigênio por mitocôndrias de coração de lâmparos, analisados pelo delineamento estatístico fatorial 2 x 4 x 8 (valores F)

a) MITOCÔNDRIAS NORMAIS

| F. Variação    | G. L. | Succinato | Isocitrato | $\alpha$ -Ceto-glutarato |
|----------------|-------|-----------|------------|--------------------------|
| Repetição      | 3     | --        | 210**      | 28,96**                  |
| Tempo          | 7     | 283**     | 546**      | 112 **                   |
| Vírus          | 1     | 277**     | 546**      | 293 **                   |
| Tempo x Repet. | 21    | --        | 6,39**     | --                       |
| Tempo x Vírus  | 7     | 1,87      | 7,88       | 1,74                     |
| Repet. x Vírus | 3     | 16,5**    | 65**       | 10,06                    |
| Resíduo        | 21    | --        | --         | --                       |

b) MITOCÔNDRIAS ROMFIDAS

| F. Variação    | G. L. | Succinato | Isocitrato | $\alpha$ -ceto-glutarato |
|----------------|-------|-----------|------------|--------------------------|
| Repetição      | 3     | 17,2*     | 55**       | 2,27                     |
| Tempo          | 7     | 686**     | 334**      | 68**                     |
| Vírus          | 1     | 42**      | 44**       | 10,99**                  |
| Tempo x Repet. | 21    | --        | 1,41       | --                       |
| Tempo x Vírus  | 7     | --        | 4,35**     | 1,29                     |
| Repet. x Vírus | 3     | 10,00     | 59**       | 1,85                     |
| Resíduo        | 21    | --        | --         | --                       |

\* - Significativo ao nível de 5% de probabilidade  
 \*\* - Significativo ao nível de 1% de probabilidade

Quadro de variância do consumo de oxigênio por fatias de coração de láparos, analisados pelo delineamento estatístico fatorial 2 x 4 x 8 (valores F).

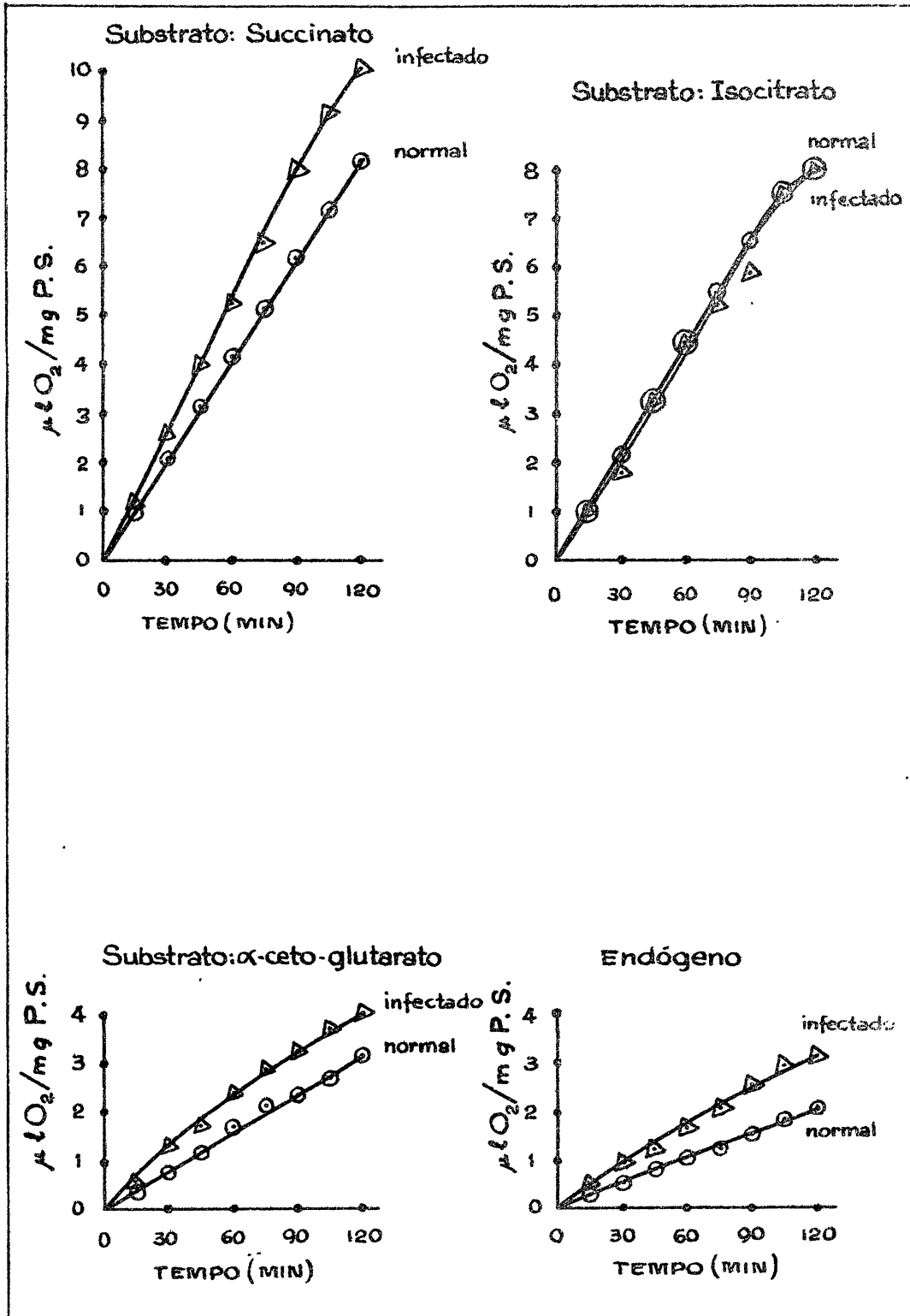
| F. Variação    | G.L. | Succinato | Isocitrato | $\alpha$ -ceto-glut. | Endógeno |
|----------------|------|-----------|------------|----------------------|----------|
| Repetição      | 3    | -         | 4,13*      | -                    | 13,35**  |
| Tempo          | 7    | 14,40**   | 46,31**    | 8,63**               | 18,68**  |
| Vírus          | 1    | 6,94*     | 7,49NS     | 5,68*                | 10,39**  |
| Tempo x Repet. | 21   | -         | -          | -                    | -        |
| Tempo x Vírus  | 7    | 1,90      | -          | 1,16                 | -        |
| Repet. x Vírus | 3    | 1,28      | 11,18**    | -                    | 1,56     |
| Resíduo        | 21   |           |            |                      |          |

\* - Significativo ao nível de 5% de probabilidade

\*\* - Significativo ao nível de 1% de probabilidade

Figura 1

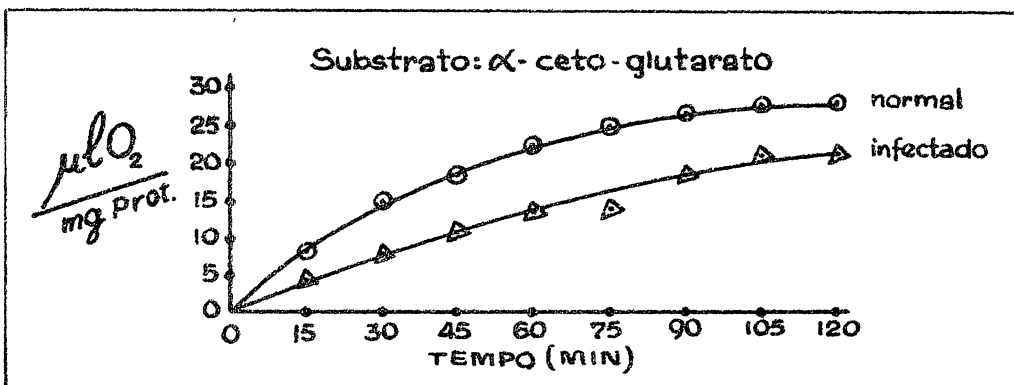
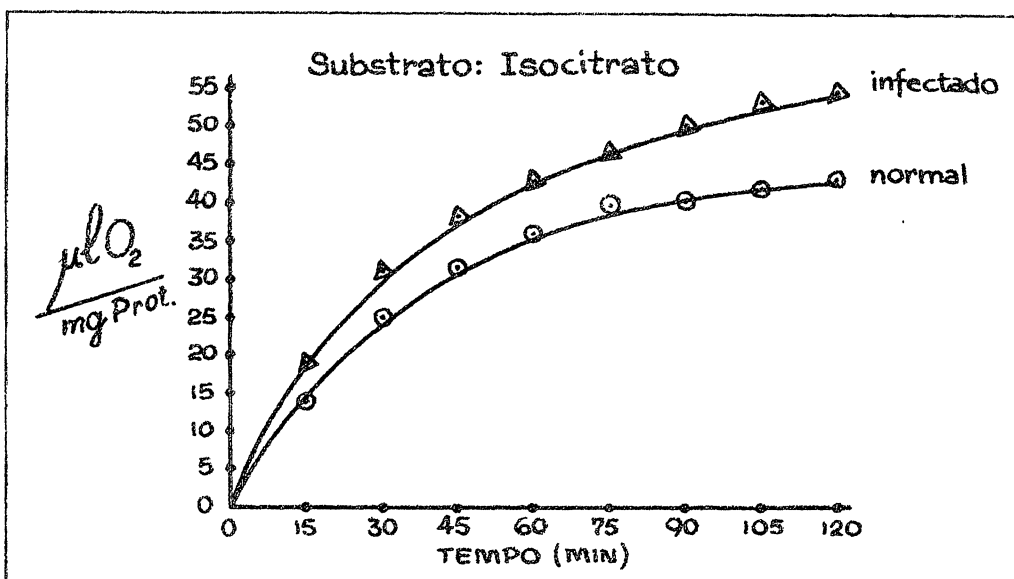
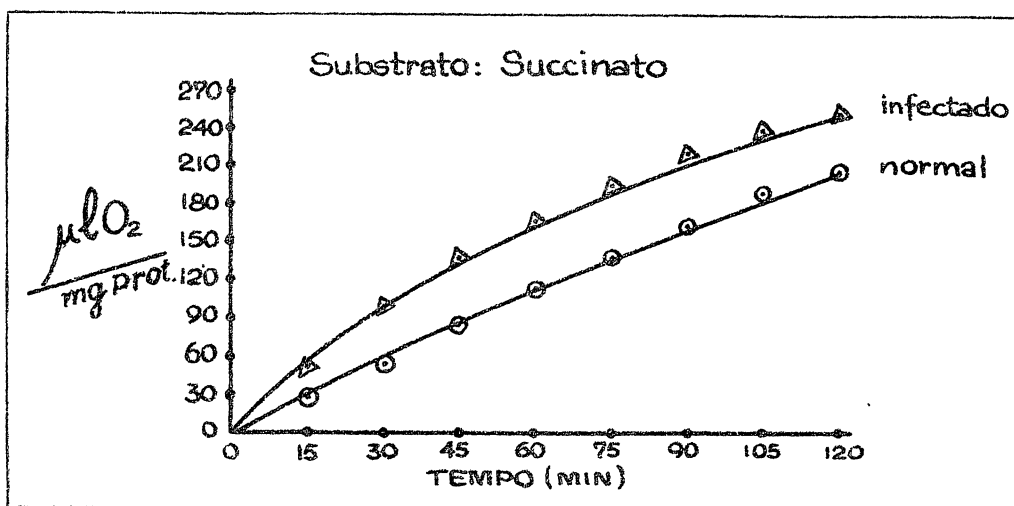
Consumo de oxigênio por fatias de coração de láparos infectados com vírus da febre aftosa  
Média de 4 repetições



Sistema: 2,50 ml de Ringer-fosfato, 100  $\mu\text{moles}$  de substrato, fatias e 0,15 ml de KOH 20% no poço central.

Consumo de oxigênio por mitocôndrias de coração de lâparos infectados com vírus da febre aftosa.

Média de 4 repetições

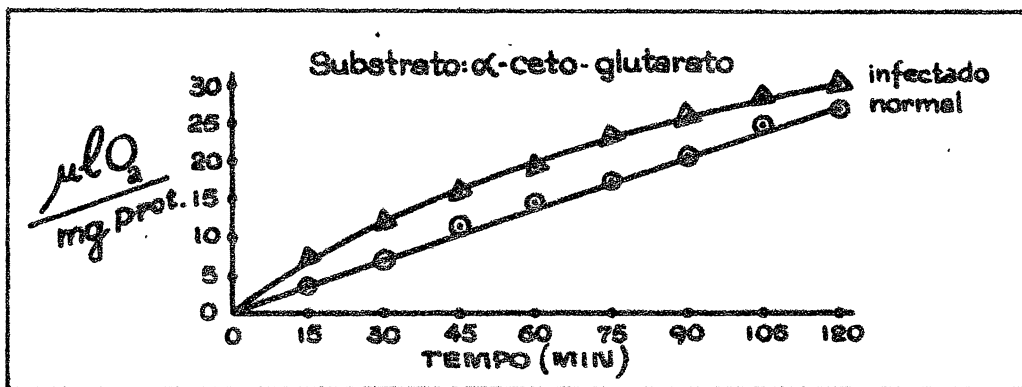
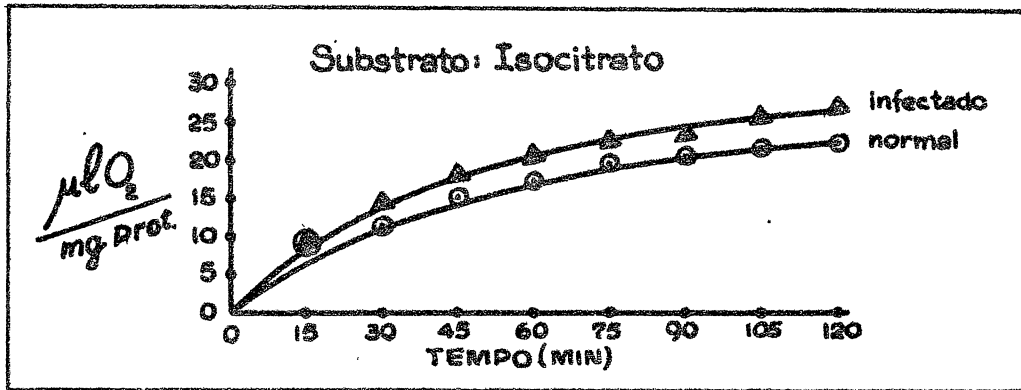
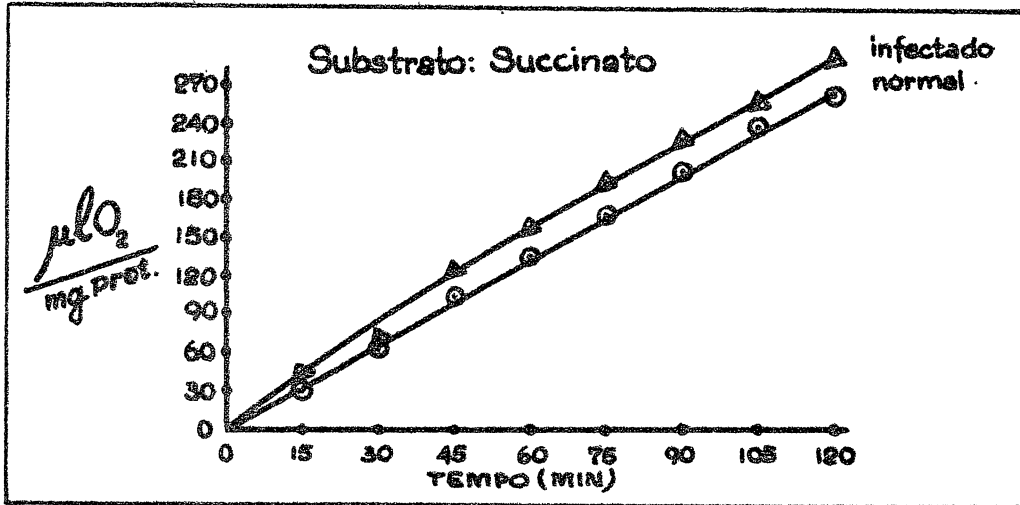


Sistema: 2,00 ml de meio de reação, 100 μmoles de substrato, 0,50 ml de suspensão de mitocôndria e 0,15 ml de KOH 20% no poço central.

Figura 3

Consumo de oxigênio por lisado de mitocôndrias de coração de léparos infectados com vírus da febre aftosa.

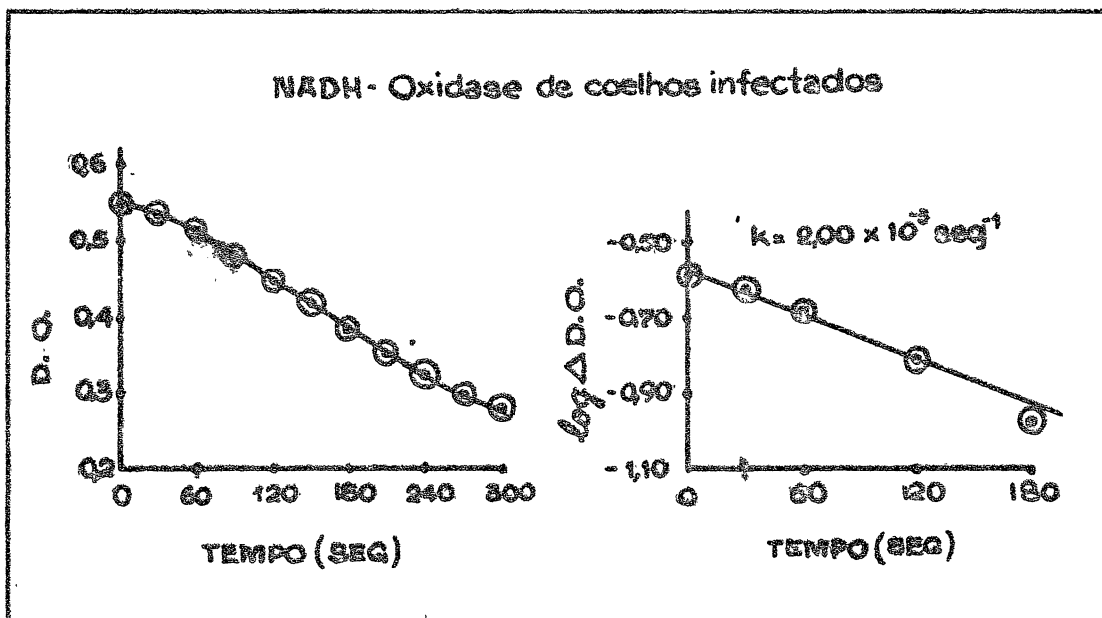
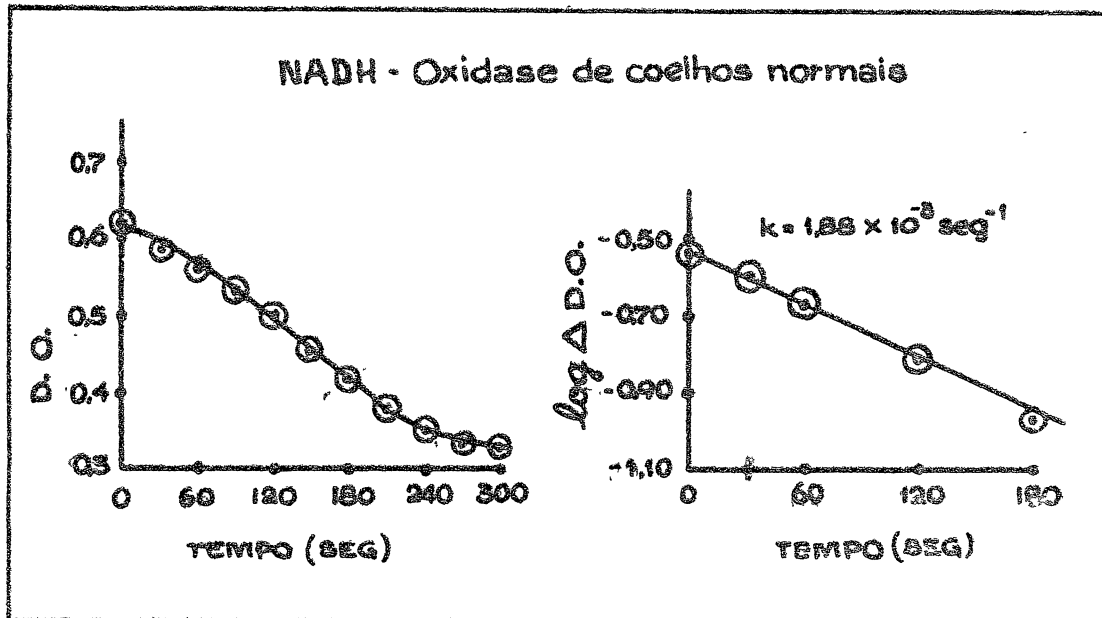
Média de 4 repetições



Sistema: 2,00 ml de meio de reação, 100 μmoles de substrato, .0,50 ml de lisado de mitocôndria e 0,15 ml de KOH 20% no poço central.

Figura 4

Determinação gráfica da velocidade específica da reação de oxidação do NADH pela NADH-oxidase, pelo desaparecimento da densidade ótica (D.O.) em 340 nm.



Sistema: 0,8 ml de tampão fosfato 0,003 M pH 7,5;  
0,2 ml de NADH  $3,3 \times 10^{-3}$  M; 20  $\mu$ l de  
enzima NADH-oxidase (~240  $\mu$ g de proteína)

D I S C U S S Ã O

Conforme se observa na tabela I, 30 horas após a inoculação, os láparos mostram que ocorre grande acumulação de ácido láctico no coração, evidenciando que a infecção com o vírus aftoso provoca um aumento na glicólise aeróbica "in vivo" no coração.

O consumo de oxigênio por fatias de coração usando o piruvato como substrato, não foi superior ao consumo de oxigênio endógeno. Porém, conforme mostra a tabela II, as células infectadas absorveram maior quantidade de piruvato do meio que as células normais. Analisando o ácido láctico produzido, verificou-se que não haviam diferenças entre as quantidades acumuladas pelos tecidos normais e infectados. Pode-se calcular pelos dados desta tabela que somente 5,2% do piruvato absorvido pelas células infectadas, produziram ácido láctico. Estes resultados concordam até certo ponto com os observados por Polatinick e Pledger (33), que verificaram que o ácido pirúvico não era oxidado a CO<sub>2</sub>, não acumulava como ácido láctico, não reciclava a intermediários glicolíticos, e não eram transaminados a alanina. Eles verificaram, porém, que a infecção com vírus aftoso em cultura de células de rim de bovino não alterava a absorção do piruvato, enquanto no presente trabalho verificou-se que, fatias de coração de láparos infectados com vírus aftoso absorviam maior quantidade de piruvato que as fatias provenientes de láparos normais.

O consumo de oxigênio por fatias de coração de láparos, conforme mostram a fig. 1, mostrou-se aumentado em fatias infectadas quando eram usados os substratos do Ciclo de Krebs, Succinato e  $\alpha$ -ceto-glutarato. Por sua vez, o isocitrato foi consu-

mido em igual quantidade para as células normais e infectadas. A nalizando estatisticamente os dados obtidos, verifica-se que o au mento observado é altamente significativo, conforme mostra o quadro de variância na tabela VI.

Os resultados de consumo de oxigênio por mitocô ndrias isoladas (fig. 2), mostram que a infecção viral provoca um aumento no consumo de oxigênio quando se usa o succinato, e isocitrato como substrato. Usando o  $\alpha$ -ceto-glutarato, ocorre uma diminuição do consumo de oxigênio em mitocôndrias de láparos infectados.

Com a finalidade de observar se o  $\alpha$ -ceto-glutarato, tinha sua permeabilidade à membrana mitocondrial diminuída co mo resultado da infecção do vírus aftoso, a experiência foi repetida usando-se mitocôndrias rompidas. Como se pode observar na fig. 3, sem a barreira de permeabilidade, os substratos utilizados apresentaram um aumento de consumo de oxigênio em mitocôndrias infectadas. As análises de variâncias apresentadas na tabela V mostram que estas diferenças são estatisticamente significativas.

Apesar do Ciclo de Krebs não ser inteiramente nece sários para a replicação viral, conforme assinalaram diversos autores, a infecção do vírus aftoso em coração de láparos, au menta as atividades das enzimas do Ciclo de Krebs, medidas como taxa de respiração. Os substratos assinalados por Pledger e Polatinick (43) que foram capazes de manter uma replicação viral em culturas de células, apresentaram um aumento no consumo de oxigênio em lisados de mitocôndrias, evidenciando suas importâncias como comb ústíveis no processo de oxidação aeróbica, em células hospedeiras do vírus.

A fosforilação oxidativa, medida como razão ADP/O, não é alterada como resultados da infecção viral, conforme mostra a tabela III. Os valores foram sensivelmente os mesmos para mitocôndrias normais e infectadas. A fosforilação oxidativa em mitocôndrias isoladas de células hospedeiras, foi também estudada por Golubev et al (61) em fibroblasto de embrião de galinha. Eles verificaram que a fosforilação era aumentada com o vírus Mumps e diminuída com o vírus Vaccinia.

A medida da velocidade específica de reação (k) - (fig. 4) não acusa diferenças entre as velocidades de reação catalizada pela NADH-oxidase de láparos infectados e normais. Assim, a cadeia de transporte de elétrons e fosforilação oxidativa parece não ser afetada pela infecção viral em células de coração de láparos.

### C O N C L U S Õ E S

1. Verificou-se que após a incubação com piruvato, as fatias de coração de láparos normais e infectados com vírus da febre aftosa não mostram diferenças entre as quantidades de ácido láctico acumuladas.

2. O consumo de oxigênio por fatias de coração de láparos mostrou-se aumentado em fatias infectadas quando se usava os substratos succinato e  $\alpha$ -ceto-glutarato. O consumo de oxigênio quando se usava o isocitrato como substrato não foi diferente para as fatias normais e infectadas.

3. O consumo de oxigênio por mitocôndrias isoladas de coração mostrou-se aumentado quando se usava o succinato e isocitrato como substrato. Este consumo mostrou-se diminuído quando se usava o  $\alpha$ -ceto-glutarato como substrato.

4. O consumo de oxigênio por mitocôndrias rompidas - proveniente de láparos infectados, mostrou-se aumentado quando se utilizava os substratos succinato, isocitrato e  $\alpha$ -ceto-glutarato.

5. A cadeia de transporte de elétrons e a fosforilação oxidativa parecem não serem afetadas pela infecção do vírus aftoso em mitocôndrias de coração de láparos.

AGRADECIMENTOS   E   DEDICATÓRIA

Agradecimentos ao Doutor ANNIBAL DE PAIVA CAMPELLO, pela orientação e apoio no desenvolvimento desta tese.

Ao Doutor CARLOS HENRIQUE MONTANHA VIANNA, pela colaboração e estímulo recebidos.

Aos componentes do Instituto de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná e Divisão de Bioquímica do Instituto de Biologia e Tecnologia do Estado do Paraná, pela colaboração e amizade recebidas.

Ao Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq), pela Bôlsa de Estudo concedida.

Dedico êste trabalho a minha espôsa, a quem ficarei eternamente grato pela dedicação e colaboração recebidas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - BUSBY, D. W. G. et al. Virological technique. London, J & A Churchill LTD., 1964
- 2 - BIER, O. Bacteriologia e Imunologia. São Paulo, Edições Melhoramento, 1970
- 3 - CUNHA, R. G. Avances en el estudio del virus de la fiebre aftosa. Revista de Medicina e Veterinária, Novembro-Dezembro, 1964
- 4 - LWOFF, A. From protozoa to bacteria and viruses. Fifty years with microbes. Ann Rev. Microbiol., 25:1-26, 1971
- 5 - LWOFF, A. & TOURNIER, P. The classification of viruses. Ann. Rev. Microbiol., 20:45-72, 1966
- 6 - MELNICK, J. L. et al. Picornavirus group. Virology , 19:114-116, 1963 in Rosen, L. Subclassification of Picornaviruses. Bacteriol. Rev., 29:173-184, 1965
- 7 - PALACIOS, C. et al. Live foot-and-mouth disease vaccines, with special reference to South America. Centro Pan Americano de Febre Aftosa, Rio de Janeiro , Publ. nº 39, 1971
- 8 - NAGEL, H. C. Dtsch. Tierarztl. Wschr. 45:625, 1937 in GARCIA MATA, E. et al. El cultivo del virus aftoso en el Ratón y en la Rata Blanca. Gaceta Veterinaria, Buenos Aires, nº 74, Nov-Dez., 1951

- 9 - HOFMANN, W. Zbl. Bakt., 148:69, 1941 e,
- 9a - HOFMANN, W. Zbl. Bakt., 151:161, 1944 in SKINNER, H.H. Propagation of strains of foot-and-mouth disease virus in unweaned white mice. Proc. R. Soc. Med., 44: 1041-1044, 1951
- 10 - SKINNER, H. H. Propagation of strains of foot-and-mouth disease virus in unweaned white mice. Proc.R.Soc. Med., 44:1041-1044, 1951
- 11 - GARCIA-MATA, E. et al. El cultivo del virus aftoso en el Ratón y en la Rata Blanca. Gaceta Veterinária , Buenos Aires, (74) Nov-Dez., 1951
- 12 - DACORSO FILHO, P. & CUNHA, R. G. Lesões observadas em coelhos recém-nascidos inoculados com amostras de três tipos de virus da febre aftosa. Rev. Bras.Biol., 14:343-358, 1954
- 13 - GARCIA-MATA, E. Pathogenic action of aphtous fever in newborn of different species. Gaceta Veterinária , 17:57-64, 1955
- 14 - KUN, E. & SMITH, M. H. D. Effect of infeccious Myxoma Virus on glicolysis of choriallantoic membrane of chick embryo. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 73:628 - 631, 1950
- 15 - SMITH, M. H. D. & KUN, E. Morphological and biochemical studies on the chorioallantois of the chick embryo following infection with certain viruses. Brit. J. Exptl. Pathol., 35:1-10, 1954 in GREEN, M. et al

- Respiration and glycolysis of human cells grown in tissue culture. Virology, 5:206-219, 1958
- 16 - RACKER, E. ed. in Cellular metabolism and infections New York, Academic Press, 1954, p. 138-148
- 17 - LEVY, H. B. & BARON, S. Some metabolic effects of poliomyelitis virus on tissue culture. Nature, 178:1230 - 1231, 1956
- 18 - FISHER, T. N. & GINSBERG, H. S. The reaction of influenza virus with guinea pig polymorphonuclear leucocytes. II. The reduction of white blood cells glycolysis by influenza viruses and receptor destroying enzyme. Virology, 2:637-655, 1956
- 19 - FISHER, T. N. & GINSBERG, H. S. Accumulation of organic acid by Hela cells infected with type 4 adenovirus . Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 95:47-51, 1957
- 20 - GREEN, M. et al, Respiration and glycolysis of human cells grown in tissue cultures. Virology, 5:206-219, 1958
- 21 - KIT, S. & GRIFFIN, A. C. Cancer Research, 18:621, 1958 in BOXER, G. E. & DEVLIN, T. M. Pathways of intracellular hydrogen. Science, 134:1495-1501, 1961
- 22 - POLATINICK, J. & BACHRACH, H. L. Metabolic studies of bovine kidney culture infected with foot-and-mouth disease virus. Virology, 12:450-452, 1960
- 23 - REBENKOV, A. G. et al. Carbohydrate exchange in epithel

- lial culture from pig embryo kidney, infected with foot  
-and-mouth disease virus. Veterinariya, Moscow, 43:  
20-24, 1967
- 24 - MILSTEINS, O. & ELIGULASHVILI, R. K. Accumulation of lac-  
tic acid by tissue cultures cells infected with adeno-  
virus tipe I and 12. Volp. Biol. Mater. Knrf., 1968 -  
p. 143-145 in C.A., 72:1539f
- 25 - ELIGULASHVILI, R. K. et al. Metabolic changes in cells  
infected with Maloney Sarcoma Virus. Rasprost. Viru -  
sol. Immunol. Leikogov. Cheloveka Zhivotn., 375-381 ,  
1970 in C.A., 75:1768a
- 26 - PLEDGER, R. A. & POLATINICK, J. Metabolism of glucose-14<sub>C</sub>  
in normal and foot-and-mouth disease virus infected bo  
vine kidney culture cells. Exptl. Cell Res., 32:448 -  
456, 1963
- 27 - WEINHOUSE, S. Advances in Cancer Research. Science, 124:  
267-268, 1956
- 28 - OLSON, R. E. & STARE, F. J. The metabolism in vitro of  
cardiac muscle in pantothenic acid deficiency. J. Biol.  
Chem., 190:149-164, 1951
- 29 - MILLER, O. N. & OLSEN, R. E. Metabolism of piruvate and  
D-L lactate by duck heart. J. Biol. Chem, 199:457-466,  
1952
- 30 - PARDEE, A. B. & KUNKEE, R. E. Enzyme activity and bacte-  
riophage infection. II. Activities before and after  
virus infection. J. Biol. Chem, 199:9-24, 1952
- 31 - LEVINE, A. S. et al. Modification of viral synthesis in

- tissue culture by substituting pyruvate for glucose in the medium. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 93:233-235, 1956
- 32 - SPIZIZEN, J. The effect of virus infection on pyruvate - metabolism. Bioch. Bioph. Acta, 23:333-341, 1957
- 33 - POLATINICK, J. & PLEDGER, R. E. Substrate utilization in bovine Kidney culture cells infected with FMDV. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 109:110-114, 1962
- 34 - ACKERMANN, W. W. Concerning the relation of the Krebs Cycle to virus propagation. J. Biol. Chem., 189:421-428, 1951
- 35 - ACKERMANN, W. W. & FRANCIS, T. Jr. In advances in virus research, New York, Academic Press, vol. 2, 1954 in POLATINICK, J. & BACHRACH, H. L. Action of foot-and-mouth disease virus and metabolic poisons on Bovine kidney - culture cells. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 105:110-114, 1962
- 36 - PEARSON, H. E. & WINZLER, R. J. Oxidative and glycolytic metabolism of minced day-old mouse brain in relation to propagation of Theiler's G.D. VII virus. J. Biol. Chem., 181:577-592, 1949
- 37 - AINSLIE, J. D. The growth curve of the lansing strain of poliomyelitis virus in mice. The effect of sodium monofluoroacetate and methionine sulfoximine on the early phase of growth of the virus. J. Exp. Med., 95:9-18, 1952

- 38 - COOPER, P. D. 9th Symp. Soc. Gen. Microbiol., 1959 p. 200  
in PLANTEROSE, D. N. Effects of inhibitors of the meta -  
bolism cells in tissue culture and foot-and-mouth disea -  
se virus synthesis. Bioch. Bioph. Acta, 53:186-194, 1961
- 39 - POLATINICK, J. & BACHRACH, H. L. Action of foot-and-mouth  
disease virus and metabolic poisons on bovine kidney -  
culture cells. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 105:110 -  
114, 1960
- 40 - POLATINICK, J. Effect of Dinitrophenol on bovine kidney -  
culture cells infected with foot-and-mouth disease vi -  
rus. Arch. Biochem. Biophys., 93: 316-320, 1961
- 41 - PLANTEROSE, D. N. Effect of inhibitors of the metabolism  
cells in culture and foot-and-mouth disease virus syn -  
thesis. Bioch. Bioph. Acta, 53: 186-194, 1961
- 42 - PLEDGER, R. & POLATINICK, J. Defined medium for growth of  
foot-and-mouth disease virus. J. Bacteriol., 83:579-  
583, 1962
- 43 - POLATINICK, J. & PLEDGER, R. A. Acid production in normal  
and FMDV infected bovine Kidney culture cells. Arch .  
Virusforsch, 12:69-75, 1962 in C.A., 57:15707i
- 44 - TAKATSUKI, A. et al. Antiviral and antitumor antibiotics.  
XIV Effects of ascochlorin and others respiration inhi -  
bitors on multiplication of Newcastle disease virus in  
cultured cells. Appl. Microbiol., 17:825-829, 1969
- 45 - SIMANOVSKAYA, V. K. et al. Functional state of tissue -

culture mitochondria during virus reproduction.

Mitokhondrii, Ferment. Protsessy Ikh. Regul. Mater. -  
Simp. 3rd Russia, 1967 p. 176-180 in C.A. 71:89378r

- 46 - BACHRACH, H. L. Foot-and-mouth disease. Ann. Rev. Microbiol., 22:201-244, 1968
- 47 - KREBS, H. H. & HENSELEIT, K. Die Bildung des Harustoff -  
Physiol. Chem., 210:33, 1932 in SILVEIRA, O. & CAMPES -  
LO, A. P. Aspectos do metabolismo oxidativo em rim de  
suino. Arquivos de Biologia e Tecnologia, Curitiba, 15:  
3-5, 1971
- 48 - BARRON, E. S. G. et al. The metabolism of skin. Effect  
of vesicant agents. J. Invest. Dermat., 11:97, 1948 in  
SILVEIRA, O. & CAMPESLO, A. P. Aspectos do metabolismo  
oxidativo em Rim de suino. Arquivos de Biologia e Tec -  
nologia, Curitiba, 15: 3-5, 1971
- 49 - VIANNA, C. H. M. Dispositivo para a obtenção de fatias -  
de tecidos para estudos respirométricos. Ciência e Cul -  
tura, 19: 574-577, 1967
- 50 - VOSS, D. O. et al. The respiratory chain and the oxidati -  
ve phosphorylation of rat brain mitochondria. Bioch .  
Bioph. Research Comm., 4: 48-51, 1961
- 51 - POTTER, V. R. & ELVEHJEM, C. A. A modified method for -  
the study of tissue oxidations. J. Biol. Chem., 114 :  
495-504, 1936
- 52 - LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin -  
phenol reagent. J. Biol. Chem., 193: 265-275, 1951

- 53 - UMBREIT, W. W. et al in Manometric techniques, Minneapolis Burgess Publishing Co., 1949
- 54 - CHANCE, B. & WILLIAMS, G. R. A simple and rapid assay of oxidative phosphorylation. Nature, 175: 1120-1121, 1955
- 55 - VOSS, D. O. et al. A new oxygen electrode model for polarographic assay of cellular and mitochondrial respiration. Anal. Biochem., 6: 211-222, 1963
- 56 - ERNSTER, L. in Symposium on Biological structure and function. Eds. GOODWIN, T. & LINDBERG, O. New York, Academic Press, vol 2, 1961 p. 139
- 57 - DANIELSON, L. et al. Selective extraction of DT Diaphorase from mitochondria and microsomes. Acta Chem. Scand. 14: 1837-1838, 1960
- 58 - PLAUT, G. W. E. & PLAUT, K. A. Oxidative metabolism of heart mitochondria. J. Biol. Chem., 199: 141-151, 1952
- 59 - LONG, C. A general method for the estimation of alpha-keto-acids metabolism in pigeon brain. Biochem. J., 36 : 806-814, 1942
- 60 - BAKER, S. B. & SUMMERSON, W. H. The colorimetric determination of lactic acid in biological material. J. Biol. Chem., 138: 535-554, 1941
- 61 - GOLUBEV, D. B. et al. Pathology of carbohydrate metabolism in virus infected cell culture. II- Permeability of cell and into membranes of chick embryo cells infected with mumps and vaccinia viruses. Acta Virol., Prague, 15: 272-279, 1971 in C.A., 75: 86406v