

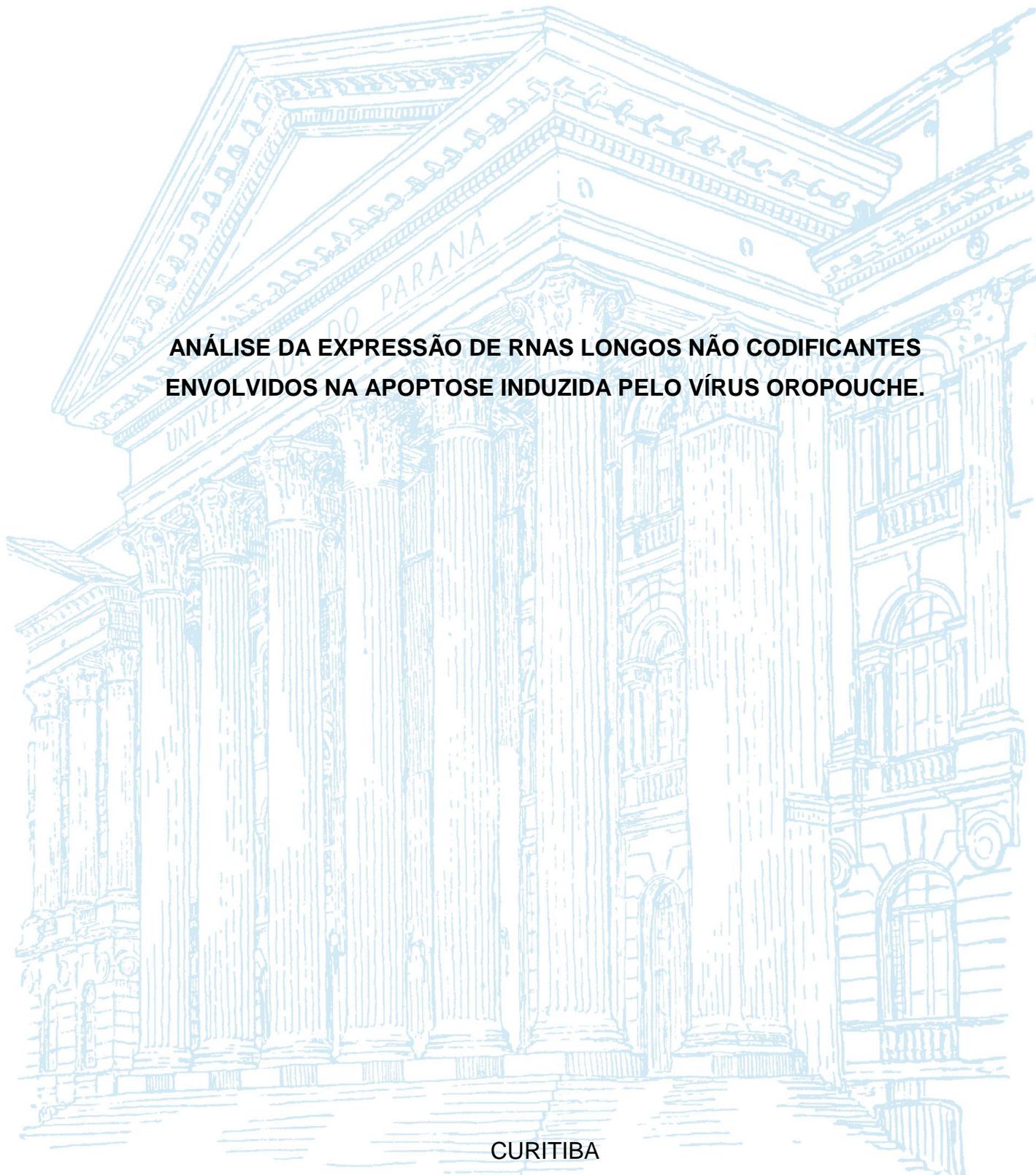
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

NINA DE MOURA ALENCAR

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE RNAs LONGOS NÃO CODIFICANTES
ENVOLVIDOS NA APOPTOSE INDUZIDA PELO VÍRUS OROPOUCHE.**

CURITIBA

2019



NINA DE MOURA ALENCAR

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE RNAs LONGOS NÃO CODIFICANTES
ENVOLVIDOS NA APOPTOSE INDUZIDA PELO VÍRUS OROPOUCHE.**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao curso de graduação de
Biomedicina, setor de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Paraná,
como requisito parcial para obtenção do
título de Bacharela em Biomedicina.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Daniela Fiori
Gradia.

Coorientadores: Dr^a Priscilla Fanini Wowk
e Dr. Juliano Bordignon

CURITIBA
2019

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	5
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
2.1	BUNIAVIRIDAE	7
2.2	VÍRUS OROPOUCHE	10
2.3	FEBRE OROPOUCHE.....	13
2.4	APOPTOSE	14
2.5	RNAs LONGOS NÃO CODIFICANTES	17
3	OBJETIVOS.....	21
3.1	OBJETIVO GERAL	21
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
4	MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1	CULTIVO CELULAR, VÍRUS E INFECÇÃO	21
4.2	TITULAÇÃO VIRAL.....	22
4.3	IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA	23
4.4	VIABILIDADE CELULAR.....	24
4.5	ENSAIO DE MORTE CELULAR	24
4.6	QUANTIFICAÇÃO DA INFECÇÃO	25
4.7	EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE cDNA	26
4.8	qPCR.....	26
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
5	RESULTADOS	29
5.1	Permissividade de Huh7.5 ao OROV	29
5.2	Análise de proliferação celular de Huh 7.5.....	32
5.3	Ensaio de morte celular.....	33
5.4	Análise de expressão de genes apoptóticos	35
5.5	Validação dos primers e expressão basal dos lncRNAs em Huh 7.5.....	35
5.6	Análise de expressão de lncRNAs	37
6	DISCUSSÃO.....	40
7	CONCLUSÃO.....	45
	REFERÊNCIAS.....	46

RESUMO

A Febre Oropouche, causada pelo Ortobuniavírus Oropouche (OROV), já foi responsável por mais de 30 epidemias desde 1960 na América do Sul, afetando mais de 500.000 pessoas no Brasil. Embora seja considerada a segunda arbovirose mais frequente no país, se apresenta subdiagnosticada devido às semelhanças clínicas da febre Oropouche à dengue, Zika, febre mayaro e chikungunya. Estudos *in vitro* e *in vivo* tem demonstrado a capacidade desse vírus de ocasionar efeito citopático e elevadas porcentagens de infecção em diferentes linhagens celulares. A morte celular observada na infecção por OROV já foi relacionada ao processo apoptótico devido a replicação viral, entretanto, aspectos da regulação da apoptose no contexto dessa infecção permanecem desconhecidos. Além dos elementos regulatórios básicos da apoptose, como proteínas anti e pró-apoptóticas, RNAs longos não codificantes (do inglês, *long non-coding RNA* (lncRNAs)) têm sido investigados como potenciais reguladores desse processo. Os lncRNAs têm sido associados a diferentes atividades celulares no âmbito da carcinogênese, mas seu papel no contexto de infecções por arbovírus permanece pouco explorado. Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar a expressão dos lncRNAs HOTAIR e NEAT1 em células Huh7.5 no decorrer da infecção por OROV. Células Huh7.5 foram infectadas em multiplicidade de infecção de 0,004 e avaliadas nos tempos de 6, 24 e 48 horas pós-infecção (hpi) . O processo de morte celular foi caracterizado pela expressão relativa, por reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR), dos genes *BCLX-L* e *BAX*. A expressão dos lncRNAs foi avaliada por qPCR e analisada através do método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Nos tempos de 6 e 24 hpi, as células apresentaram uma elevação na razão da expressão relativa de *BCLX-L/BAX*. Entretanto 48 hpi foi observada uma redução nessa razão como um indicativo de morte celular por apoptose. As expressões relativas dos dois transcritos de NEAT1, NEAT1_1 e NEAT1_2, assim como do lncRNA HOTAIR aumentaram com o decorrer do tempo de infecção, com maior expressão sendo observada 48 hpi, coincidente com o processo de morte celular. Estudos futuros envolvendo a função dos transcritos durante a morte celular decorrente da infecção por OROV podem elucidar quais os genes envolvidos e regulados nesse processo, bem como a via pela qual esses transcritos regulam etapas chaves da infecção e apoptose.

Palavras chave: RNA longo não codificante; apoptose; infecção; Oropouche; expressão relativa.

1 INTRODUÇÃO

A febre Oropouche é a segunda arbovirose mais frequente no Brasil, causada pelo ortobuniavírus Oropouche (OROV) e já tendo acometido mais de 500.000 indivíduos desde a sua descrição (ADAMS *et al.*, 2017). Apesar de ser responsável por mais de 30 epidemias no país desde 1960, é uma doença negligenciada e subdiagnosticada devido às semelhanças clínicas com outras arboviroses como dengue, Zika e chikungunya (DE SOUZA LUNA *et al.*, 2017; TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 2017). Os sintomas dessa doença febril envolvem dores de cabeça, mialgia, artralgia, fotofobia, tonturas e sintomas semelhante aos de meningite devido a capacidade do vírus de atingir o sistema nervoso central (SNC) (ROMERO-ALVAREZ; ESCOBAR, 2018; SAKKAS *et al.*, 2018; VERNAL; MARTINI; DA FONSECA, 2019). Embora seja uma doença negligenciada, a infecção pelo vírus tem o potencial para se tornar uma doença emergente na América Central e América do Sul devido as alterações ambientais como desflorestamento, alterações climáticas e mesmo atividades humanas que possibilitariam a disseminação do vírus devido à expansão e contato com os mosquitos vetores (ROMERO-ALVAREZ; ESCOBAR, 2018; TRAVASSOS DA ROSA *et al.*, 2017).

Embora não tenham sido registrados até o momento casos fatais associados a infecção por OROV, este vírus se destaca pela capacidade de infectar diferentes tipos celulares, de adentrar o SNC e de ocasionar morte celular. A morte celular por apoptose apresenta um dualismo funcional quando se trata de infecções virais, visto que pode representar uma tentativa do sistema imune de erradicar a infecção pela interrupção da replicação viral ou um mecanismo evolutivo de escape do sistema imune pelo favorecimento da replicação viral (ACRANI *et al.*, 2010; DE SOUZA LUNA *et al.*, 2017; PROENCA-MODENA *et al.*, 2015).

A apoptose está sob rigorosa regulação da expressão gênica para que ocorra de forma eficiente e adequada, uma vez que qualquer desequilíbrio nos mecanismos reguladores da expressão gênica podem culminar em alterações significativas e no favorecimento de uma das funções relacionadas a infecção viral (ATIANAND; FITZGERALD, 2014; LI *et al.*, 2016). Dentre os elementos que podem

estar envolvidos na regulação gênica da apoptose estão os RNAs longos não codificantes (lncRNAs), transcritos com mais de 200 nucleotídeos de tamanho e que exercem função regulatória por diferentes mecanismos (GLOSS; DINGER, 2016; YANG; FROBERG; LEE, 2014). Alguns lncRNAs como HOTAIR, NEAT1_1 e NEAT1_2 têm sido associados ao processo de apoptose por serem capazes de regular genes de resposta ao dano ao DNA e também pela interação com outros elementos regulatórios no contexto de alterações tumorais (NIE et al., 2015; LI et al., 2016; YU et al., 2017; JIANG et al., 2016). Entretanto, o papel desses transcritos ainda não foi avaliado quanto a morte celular em infecções virais, podendo auxiliar no entendimento de como a morte celular ocorre durante uma infecção viral.

Sendo assim, o objetivo desse trabalho é relacionar a expressão dos lncRNAs HOTAIR, NEAT1_1 e NEAT1_2 com o processo de morte celular induzido pela infecção por OROV.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 BUNIAVIRIDAE

A família *Bunyaviridae* é a maior e mais diversa família de vírus, contando com mais de 350 membros que estão divididos em 5 gêneros: *Hantavirus*, *Nairovirus*, *Orthobunyavirus*, *Phlebovirus* e *Tospovirus* (ADAMS *et al.*, 2017). A caracterização dessa família teve início com o isolamento e descrição do *Bunyamwera virus* (BUNV) em 1943 (SMITHBURN *et al.*, 1946) e desde então novas espécies têm sido descritas, o que justifica a ampla diversidade genética e distribuição global desses vírus (ADAMS *et al.*, 2017). Presentes em 5 continentes, os bunivírus são responsáveis por epidemias, epizootias e danos agrícolas por apresentarem espécies capazes de infectar animais, humanos e plantas. Com exceção dos vírus pertencentes ao gênero *Hantavirus*, que podem ser transmitidos através das excretas de roedores, a maioria dos bunivírus são transmitidos por artrópodes (WALTER; BARR, 2011).

Os gêneros enquadrados na família *Bunyaviridae*, com exceção do *Tospovirus* que apresenta espécies capazes de infectar plantas, apresentam espécies como *Hantaan virus*, *Crimean-Congo Hemorrhagic fever virus*, *Oropouche virus* e *Rift Valley fever virus*, entre outras, são capazes de levar o hospedeiro a óbito devido a condições clínicas como febres hemorrágicas, encefalites e distúrbios renais (AMROUN *et al.*, 2017; FERRON *et al.*, 2017).

Os ortobunivírus são vírus de RNA fita simples sentido negativo, esféricos e envelopados com tamanhos que variam de 80 a 120 nm (SAKKAS *et al.*, 2018). Apresentam genomas trissegmentados, nomeados de acordo com a quantidade de nucleotídeos de cada segmento, e responsáveis pela codificação de 4 proteínas estruturais (FIGURA 1). O segmento S, do inglês *small*, codifica a ribonucleoproteína N que compõem o nucleocapsídeo. O segmento médio (do inglês, *medium*, M) codifica um polipeptídeo precursor de glicoproteínas de superfície (Gn e Gc) e as proteínas acessórias NSm e NSs). As glicoproteínas de superfície, após clivagem das proteínas acessórias, são alocadas em

heterodímeros no envelope viral de forma a serem responsáveis pelo tropismo celular por determinados tipos celulares e pelo processo de fusão do envelope celular a membrana da célula alvo (AMROUN et al., 2017; SUN et al., 2018). A proteína acessória NSm atua como proteína integral de membrana e embora não possua papel claro, em determinadas espécies tem sido relacionada à montagem viral, replicação e processo de apoptose. Em contrapartida, a proteína acessória NSs foi descrita como sendo capaz de inibir as respostas envolvendo interferon, atuando como um importante mecanismo de evasão da resposta imune do hospedeiro (FERRON et al., 2017). Adicionalmente, o segmento grande (do inglês *large*, L) codifica a proteína L que é a RNA polimerase viral dependente de RNA (AMROUN et al., 2017; SUN et al., 2018).

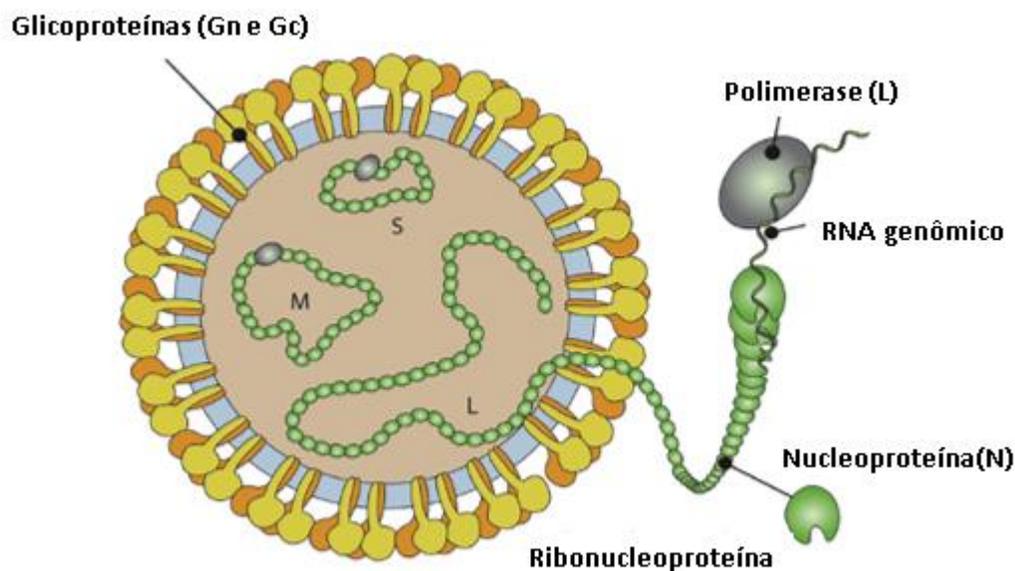


Figura 1 – Esquema ilustrativo de vírus da família *Bunyaviridae*. Representação do envelope viral contendo as glicoproteínas de superfície (Gn e Gc), genoma dividido em três segmentos, ribonucleoproteína e polimerase viral.

Fonte: Adaptado de Romero-Alvarez, Escobar, 2018.

O ciclo de infecção dos buniavírus (FIGURA 2) inicia-se com a ligação das proteínas Gn ou Gc a receptores celulares levando a endocitose da partícula viral. O ambiente ácido do endossomo é responsável por uma mudança conformacional nas proteínas de envelope viral, fazendo com que este se fusione à membrana

endossômica (SANTOS et al., 2008). O nucleocapsídeo atinge o citoplasma da célula hospedeira sem que ocorra o desnudamento total do capsídeo e é então dirigido para o retículo endoplasmático, onde se inicia a síntese proteica. Primeiramente, utilizando-se da polimerase viral, ocorre a transcrição primária da fita de RNA polaridade negativa em RNA mensageiro (mRNA) de polaridade positiva, seguindo-se de forma acoplada a replicação em RNA complementar (RNAc) e tradução dessa molécula. Também ocorre a tradução do segmento M, que se liga a ribossomos da membrana do retículo endoplasmático rugoso para que ocorra a síntese de uma poliproteína que será clivada originando Gn e Gc. A polimerase viral L, altera sua função de transcrição primária de RNAm do genoma viral para a multiplicação do genoma da progênie. Após o acúmulo das glicoproteínas viral no complexo de Golgi, ocorre a montagem e liberação da progênie através de vesículas secretórias (AMROUN et al., 2017; SUN et al., 2018; WALTER; BARR, 2011).

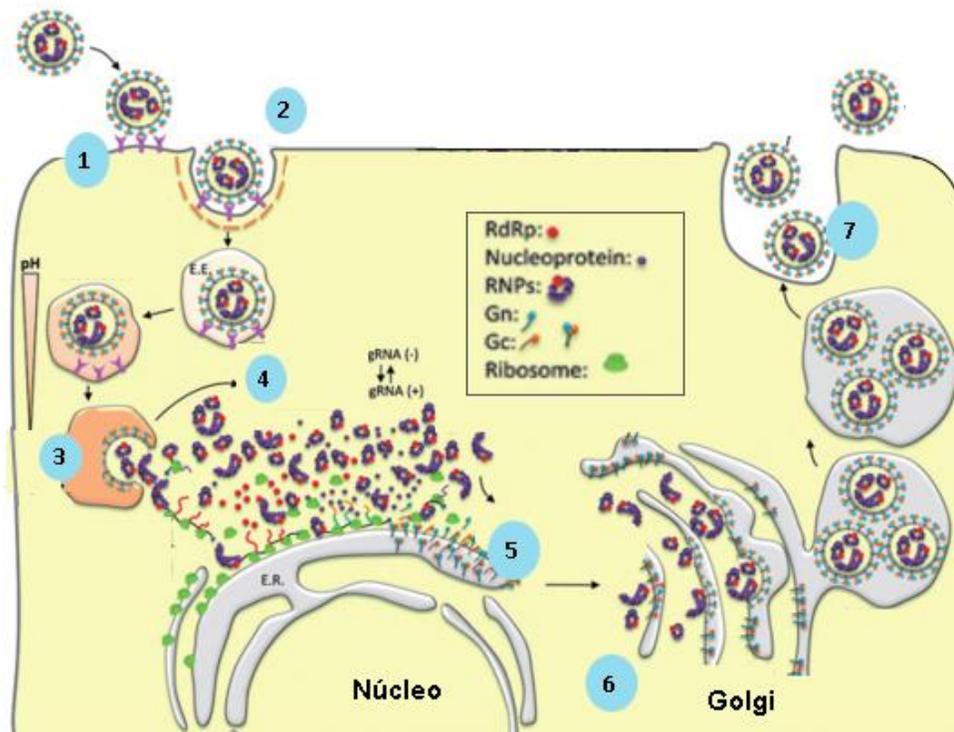


Figura 2 – Ciclo de infecção de Ortobuniavírus. 1) Ligação do vírus através das glicoproteínas de superfície a receptores celulares; 2) Entrada na célula por endocitose; 3) Alteração de pH na vesícula ocasiona mudança conformacional e desnudamento parcial do vírus; 4) Transcrição primária e replicação do RNA pela polimerase viral; 5) Transporte da

progênie viral para o Golgi; 6) montagem viral; 7) liberação de novos vírus por vesículas que se fundem a membrana. Fonte: Adaptado de Amroun, 2017.

Apesar do mecanismo do ciclo de infecção dos ortobuniavírus descrito acima se aplicar de forma genérica a todos os componentes desse grupo taxonômico, cada espécie pode apresentar particularidades nesses processos, variando desde ao tipo de receptor ao qual a partícula viral irá se ligar, até a participação de proteínas na montagem viral ao final do ciclo (FERRON et al., 2017; WALTER; BARR, 2011).

2.2 VÍRUS OROPOUCHE

Descrito pela primeira vez em 1955 em Vega de Oropouche, Trindade e Tobago (ANDERSON *et al.*, 1961) o vírus Oropouche (OROV) é um vírus pertencente à família *Bunyaviridae*, ao gênero *Orthobunyaviridae* e ao subclado A do sorotipo Simbu (ADAMS *et al.*, 2017). Este sorotipo apresenta ampla distribuição global e diversidade genética, dividindo-se em complexos, dentre os quais está presente o complexo Oropouche (SAKKAS et al., 2018).

Presente na América Central e do Sul, até o momento foram identificados quatro genótipos virais diferentes para OROV que se distribuem entre os seguintes locais: Brasil, Trindade e Tobago, Panamá e Peru (ROMERO-ALVAREZ; ESCOBAR, 2018) (FIGURA 3). A classificação de OROV em genótipos e subgenótipos sugere indícios para compreensão da evolução e distribuição geográfica desse vírus, com o primeiro genótipo tendo surgido a aproximadamente 112 anos atrás e tendo como justificativa para essa diversidade genética o processo de reagrupamento viral, no qual dois vírus geneticamente relacionados infectam simultaneamente uma mesma célula, permitindo trocas genéticas durante o ciclo de infecção (SAKKAS et al., 2018).

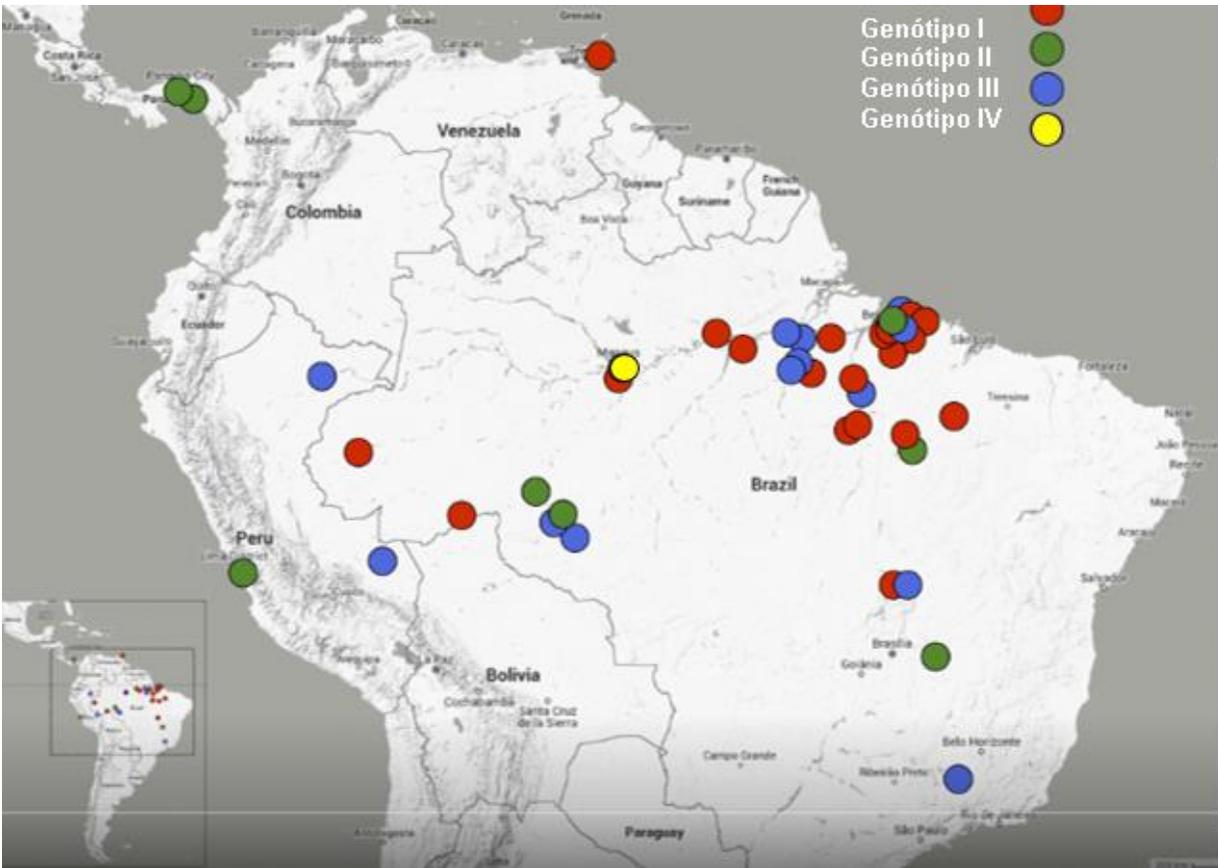


Figura 3 - Distribuição dos genótipos de OROV na América Central e do Sul. Símbolo vermelho: genótipo I; símbolo verde: genótipo II; símbolo azul: genótipo III, Símbolo amarelo: genótipo IV.
 Fonte: Adaptado de Travassos da Rosa e colaboradores, 2017.

Os reservatórios naturais de OROV são mamíferos, aves selvagens e roedores e os vetores capazes de transmitir esse vírus incluem as espécies *Culicoides paraenses*, *Culex quinquefasciatus*, *Coquilletidia venezuelensis* e *Aedes serratus* (ROMERO-ALVAREZ; ESCOBAR, 2018; SAKKAS et al., 2018). A transmissão pode ocorrer dentro de um ciclo silvestre do vírus ou de ciclo urbano, sendo o ser humano o principal elo de ligação entre os dois ciclos pela formação de um ciclo urbano/periurbano (FIGURA 4). Acredita-se que alterações ambientais como desflorestamento, invasão de habitat naturais, alterações climáticas e mesmo atividades humanas e animais, como processos migratórios, possam ser os responsáveis pelos surtos esporádicos de infecções por OROV (ROMERO-ALVAREZ; ESCOBAR, 2018; TRAVASSOS DA ROSA et al., 2017).

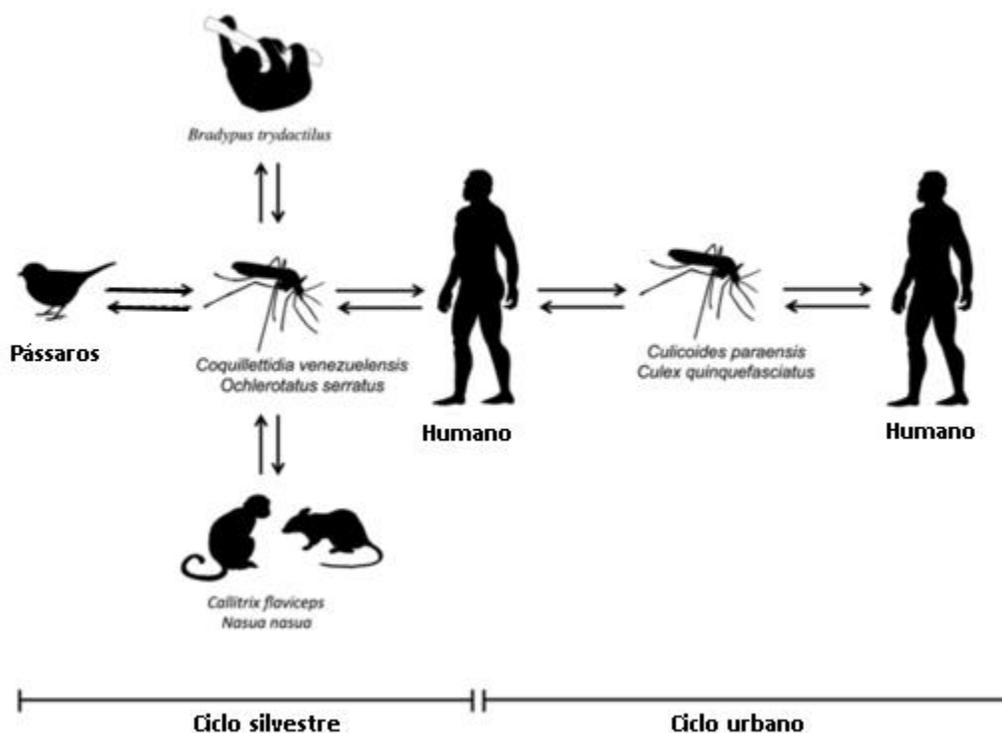


Figura 4 - Ciclo de transmissão do OROV. Ciclo silvestre inclui diferentes espécies de primatas, roedores e pássaros, podendo conter vetores de diferentes espécies. Ciclo urbano inicia-se com a ação do vetor transmitindo o vírus para o humano e pode se expandir com novos vetores sendo infectados e mantendo o vírus no ambiente urbano. Fonte: Adaptado de Travassos da Rosa e colaboradores, 2017.

Agente causador da Febre Oropouche, o vírus Oropouche (OROV) foi responsável por mais de 30 epidemias desde 1960, afetando mais de 500.000 pessoas no Brasil. Embora seja a segunda arbovirose mais frequente no Brasil, apresenta poucos casos registrados devido às semelhanças clínicas da febre Oropouche à dengue, Zika, febre mayaro e chikungunya, ocasionando o subdiagnóstico e diagnóstico incorreto dessa doença (ROMERO-ALVAREZ; ESCOBAR, 2018).

2.3 FEBRE OROPOUCHE

A febre Oropouche é caracterizada por uma doença sistêmica, com padrão sazonal relacionado ao período de chuvas (ROMERO-ALVAREZ; ESCOBAR, 2018). A infecção se inicia após a picada de um vetor de OROV, e apesar de não terem sido reportados casos de transmissões entre humanos, há relatos de infecção por via respiratória em ambiente laboratorial (PINHEIRO, 1981). O período de incubação varia de 4 a 8 dias, seguindo-se de um período sintomático e de alta viremia no qual o indivíduo pode servir de reservatório do vírus para os vetores. O período agudo da doença dura de dois a sete dias, com 60% dos casos apresentando um conjunto de sintomas semelhante ao de outras arboviroses (DE SOUZA LUNA et al., 2017; TRAVASSOS DA ROSA et al., 2017). Entre os sintomas destacam-se: febre, dor de cabeça, mialgia, artralgia, tonturas, fotofobia, erupção cutânea, calafrios, astenia e em alguns casos sintomas semelhantes aos de meningite (ROMERO-ALVAREZ; ESCOBAR, 2018; SAKKAS et al., 2018; VERNAL; MARTINI; DA FONSECA, 2019; DE SOUZA LUNA et al., 2017).

A infecção causada por OROV pode apresentar sintomas de encefalite, já tendo sido observada a presença do vírus no sistema nervoso central (SNC), apesar de não estar clara sua via de entrada (BASTOS et al., 2012; VERNAL; MARTINI; DA FONSECA, 2019). Estudos recentes sugerem a utilização de um mecanismo de cavalo Tróia que justifique a passagem de OROV pela barreira hematoencefálica através da utilização de fagócitos infectados (RODRIGUES et al., 2011). Adicionalmente, estudos *in vitro* têm demonstrado a capacidade desse vírus de infectar diferentes linhagens celulares, apresentar um efeito citopático e acarretar morte celular pela via intrínseca da apoptose de maneira dependente da replicação viral e síntese proteica. Tais efeitos da infecção viral podem justificar os sintomas sistêmicos da doença e auxiliar a disseminação da progênie viral para células vizinhas, podendo também alterar as respostas imunes antivirais do hospedeiro (ACRANI et al., 2010; DE SOUZA LUNA et al., 2017; PROENCA-MODENA et al., 2015).

O diagnóstico dessa doença pode ser realizado por métodos imunológicos, isolamento viral ou técnicas de biologia molecular (ROMERO-ALVAREZ; ESCOBAR, 2018; SAKKAS et al., 2018; VERNAL; MARTINI; DA FONSECA, 2019). O tratamento para febre Oropouche restringe-se apenas ao controle dos sintomas, embora estudos já tenham avaliado o papel do antiviral ribavirina e de interferon alfa (IFN- α) na infecção por OROV (LIVONESI et al., 2006; LIVONESI et al., 2007). Ainda não há vacinas disponíveis contra OROV e as medidas preventivas para essa doença envolvem cuidados pessoais como a utilização de repelentes e telas de proteção contra mosquitos, e também medidas de controle dos vetores (BENELLI et al., 2017; SAKKAS et al., 2018).

2.4 APOPTOSE

A apoptose é um processo de dissolução nuclear sem perda de integridade da membrana e sem desencadeamento obrigatório de uma resposta inflamatória (ORZALLI et al., 2018). Pode ocorrer de forma fisiológica através da eliminação de tecidos durante a embriogênese, involução de tecidos hormônio-dependente na ausência de hormônios (menstruação), perda celular em populações proliferativas, morte de células que já cumpriram seu papel, eliminação de linfócitos autorreativos e morte celular induzida por linfócito T citotóxico. A apoptose pode também ocorrer em resposta à um processo patológico decorrente de lesão ao DNA, acúmulo de proteínas anormalmente dobradas na célula, lesão celular por infecção e atrofia tecidual, entre outros tipos de estresse (ACRANI et al., 2010; KUMAR, 2010).

A apoptose desencadeia diversas alterações morfológicas que envolvem diferentes fases de condensação e agregação da cromatina até atingir cariorrexe, retração celular e fragmentação em corpos apoptóticos que serão fagocitados rapidamente, no entanto, a apoptose pode ser histologicamente indetectável (HUERTA et al., 2007; PERLMAN et al., 1999). O mecanismo molecular da apoptose culmina na ativação de caspases, que são enzimas cisteínas proteases que clivam proteínas em resíduos aspárticos. A ativação da apoptose pode ocorrer por dois mecanismos distintos: por via mitocondrial (via intrínseca) e via receptor de

morte (via extrínseca) (FIGURA 5). As caspases ativadas inicialmente são denominadas desencadeantes (8 e 9) e as caspases seguintes são denominadas executoras. As caspases agem clivando vários alvos e ativando nucleases que clivam nucleoproteínas, DNA, componentes da matriz nuclear e do citoesqueleto levando à fragmentação celular (HUERTA et al., 2007; SUSAN, 2007).

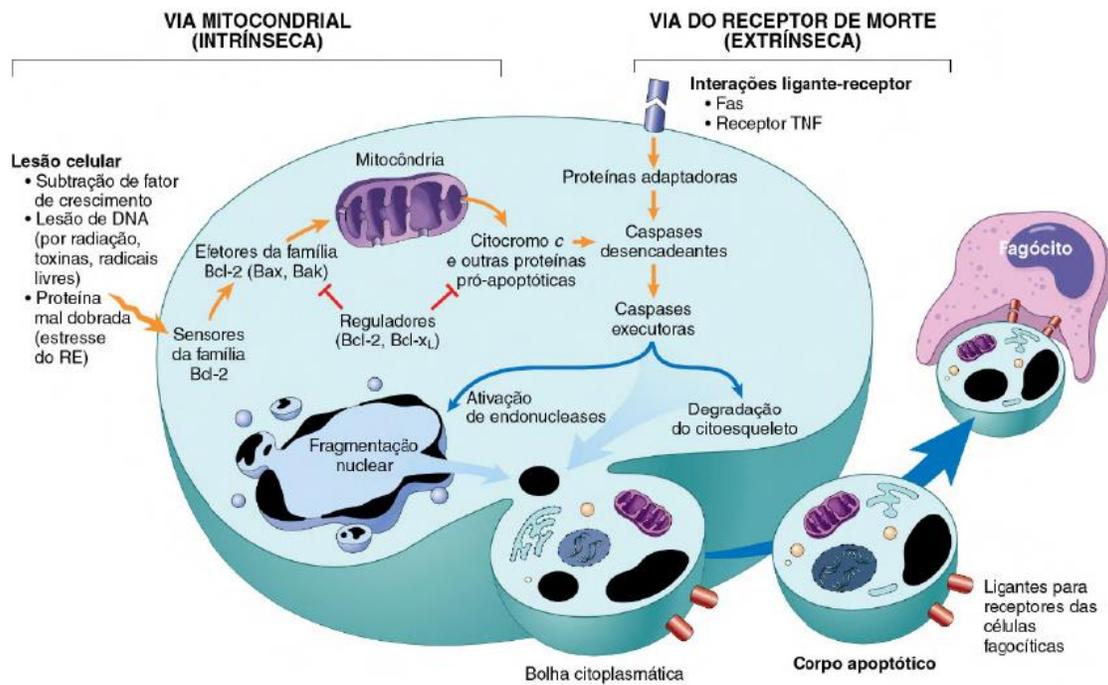


Figura 5 - Mecanismos de ativação da apoptose. A via intrínseca é ativada em resposta a danos celulares enquanto na via extrínseca receptores atuam como sinalizadores iniciais da apoptose. Autor: Robins, 2014.

Na via mitocondrial também denominada via intrínseca, a presença de dano ao DNA, ausência de fator de crescimento e presença de proteínas mal dobradas ocasiona a ativação de proteínas BH3, que pertencem à família Bcl-2 e agem como sensores. Essa família compreende mais de 20 proteínas que controlam a permeabilidade da mitocôndria determinando se a célula sobrevive ou morre por apoptose. Quando as proteínas BH3 são ativadas elas ativam Bax e Bak, membros pró-apoptóticos que se dimerizam e se inserem na membrana mitocondrial,

formando um canal na membrana mitocondrial por onde proteínas como citocromo c podem extravasar para o citoplasma. Bax e Bak inibem proteínas Bcl-2 e Bcl-x (proteínas antiapoptóticas) de forma a aumentar o extravasamento mitocondrial para o citoplasma. O citocromo c liberado no citosol é capaz de ativar caspases (9 - desencadeantes) com o auxílio de cofatores e outras proteínas liberadas são capazes de agir como bloqueadores de antagonistas de caspases (inibem apoptose). A ativação de caspases resulta na fragmentação nuclear (ORZALLI et al., 2018; ZHOU et al., 2017).

Na via de receptor de morte, ou via extrínseca, as células são capazes de disparar a apoptose por meio de receptores de morte, como TNF I e Fas (CD95). O ligante para Fas (Fas-L) está presente em linfócitos T ativados que ao reconhecerem o alvo realizam a ligação entre receptor e ligante, sendo este sinal capaz de recrutar e ativar caspase 8. A caspase 8 ativa Bid, fator pró-apoptótico e pertencente a família Bcl-2 e portanto também relacionado à via mitocondrial. Essa combinação das vias é letal para a célula, mas existem antagonistas capazes de bloquear a ativação de caspase (KUMAR, 2010). Essa via é utilizada para eliminação de linfócitos T autorreativos e eliminação de células alvo por linfócitos T citotóxico. Para serem fagocitados, os corpos apoptóticos exibem em sua membrana externa fosfatidilserina, que irá funcionar como sinalizador para células fagocíticas (HUERTA et al., 2007; SUSAN, 2007).

Assim como pode possuir um papel duplo em relação a sua ação fisiológica ou patológica, a apoptose também apresenta esse dualismo funcional quando se trata de infecções virais, uma vez que a apoptose pode servir tanto para inibir a replicação viral por ação da célula hospedeira ou pode ser utilizada como mecanismo de disseminação viral, na qual o vírus induz a apoptose como uma estratégia de escapar de uma sinalização intensa para o sistema imune, como ocorre no processo de necrose (AMARA; MERCER, 2015; OUYANG; HU; CHEN, 2016).

Por se tratar de um processo celular complexo de múltiplas etapas, a apoptose está sob rigorosa regulação para que ocorra de forma eficiente e adequada, uma vez que qualquer desbalanço nos mecanismos reguladores da expressão gênica

pode culminar em alterações significativas na homeostase do organismo (HUERTA et al., 2007; SUSAN, 2007). Além das moléculas sinalizadoras que dão início a apoptose, tem sido demonstrado o envolvimento de outras moléculas reguladoras, como RNAs não codificantes, no processo de morte celular (ATIANAND; FITZGERALD, 2014; LI et al., 2016) .

2.5 RNAs LONGOS NÃO CODIFICANTES

Na década de 50 foi proposto um modelo de fluxo lógico que pudesse explicar a conversão de instruções presentes no DNA em produtos funcionais (CRICK, 1970). Tal modelo foi estabelecido como o dogma central da biologia molecular, e nele moléculas como DNA, RNA e proteínas apresentavam sentido unidirecional, uma vez que o DNA é duplicado e transcrito em RNA, e este é traduzido em proteínas. Nesta concepção clássica os RNAs aparecem apenas como elementos mediadores dos processos, por estarem envolvidos com a transmissão de informação do DNA para formação de proteínas, e enquadravam-se em duas categorias, moléculas codificantes como RNAs mensageiros, ou como moléculas não codificantes exclusivamente como RNAs transportadores e ribossômicos (KUNG; COLOGNORI; LEE, 2013). Entre a década de 80 e 90, na tentativa de explorar o potencial codificador dos RNAs, foi descoberto o primeiro gene não codificante, H19, indicando a presença de regiões não codificantes envolvidas nos processos celulares (BRANNAN, 1990). Apesar dessa descoberta, pelos 20 anos seguintes, as demais regiões não codificantes do genoma que ainda não possuíam função atribuída continuaram a ser entendidas como resíduos do genoma, seqüências 'lixo' (DERRIEN et al., 2012; KUNG; COLOGNORI; LEE, 2013).

Os dados obtidos a partir de grandes estudos genômicos, como o Projeto Genoma Humano revelaram que 93% do genoma humano é transcrito, embora apenas 1,2% de todo o genoma humano corresponda a regiões codificantes para proteínas (INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM et al., 2001), sugerindo assim que a maior parte do genoma corresponde a regiões

não codificantes até então tratadas como resíduos sem funções atribuídas e desafiando o dogma central da biologia molecular. A descoberta do vasto número RNAs não codificantes (ncRNA) propôs novos mecanismos quanto à interação entre as moléculas chave do dogma central da biologia molecular, bem como levantou questionamentos quanto à origem, função e classificação desses elementos não codificantes (GLOSS; DINGER, 2016; JARROUX; MORILLON; PINSKAYA, 2017)

Os ncRNA são transcritos que não passam pelo processo de tradução e podem ser classificados quanto ao tamanho em duas amplas categorias: pequenos RNAs , que possuem de 21 a 35 nucleotídeos (nt), incluindo micro-RNA (miRNA), RNA de interação piwi (pi-RNA) e RNA de interferência (siRNA) entre outros, e RNA longos (lncRNA), os quais possuem um comprimento maior que 200 nt. Além do tamanho, essas classes diferem quanto a função, e envolvimento em processos biológicos (CLARK et al., 2011; DE OLIVEIRA, 2019).

Os lncRNAs não são conservados evolutivamente, possuem estrutura versátil com a presença de exons, podem estar sujeitos ao processamento alternativo, possuem localização subcelular diversa e apresentam alta especificidade quanto à expressão. A maioria dos lncRNAs de eucariotos são produzidos através da transcrição pela RNA polimerase II, sofrem o processo de capeamento na extremidade 5' e podem ou não ser submetidos à poliadenilação na extremidade 3' (GLOSS; DINGER, 2016; YANG; FROBERG; LEE, 2014). Devido a sua recente descoberta e início dos estudos, os lncRNAs ainda não estão completamente anotados e sua classificação tem sido realizada a partir de diferentes parâmetros como comprimento, localização em relação ao genoma, elementos regulatórios, propriedades dos transcritos e função (DERRIEN; GUIGÓ; JOHNSON, 2012; GLOSS; DINGER, 2016).

Uma das classificações mais utilizadas é quanto à posição desses transcritos em relação à sequências codificadoras no genoma. Baseada no GENCODE, pode-se caracterizá-los em: RNA antisense, transcritos senso sobrepostos, lncRNAs intergênicos, transcritos sem ORF e lncRNAs intrônicos (DERRIEN; GUIGÓ; JOHNSON, 2012; CIPOLLA et al, 2018).

Quanto ao mecanismo de ação dos lncRNAs até o momento foi observado que os transcritos podem atuar em mecanismos de regulação epigenética e pós transcricional, transporte de proteínas, disponibilidade de proteínas e mRNA, inativação de miRNA e interação entre cromossomos (FIGURA 5). Portanto a classificação quanto ao mecanismo de ação agrupa os lncRNAs em moléculas tipo sinal, chamariz, guia e plataforma (revisito por DE OLIVEIRA et al., 2019; MATHIAS et al, 2019). Os lncRNAs guia atuam pela ligação a proteínas de forma a orientá-las para gene alvo específico e assim regulando a expressão desses genes, enquanto o grupo de lncRNAs considerados chamarizes também se ligam a proteínas, mas com o intuito de afastá-las da cromatina. Aqueles considerados lncRNAs sinais atuam como sinalizadores moleculares para regulação gênica. E por fim, o grupo plataforma caracteriza-se por mediar a interação entre diferentes moléculas efetoras que atuam em conjunto (AKHADE; PAL; KANDURI, 2017; FANG; FULLWOOD, 2016; WANG; CHANG, 2011).

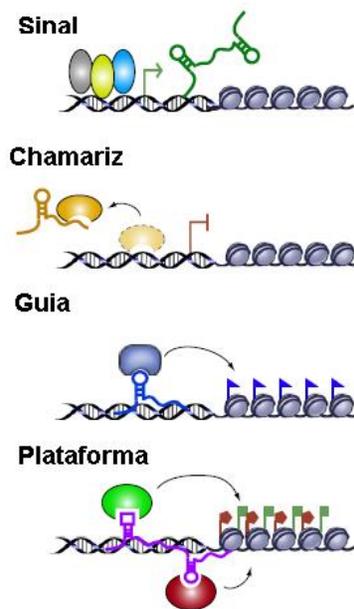


Figura 5 – Representação dos mecanismos de ação dos lncRNAs. Autor: adaptado de Wang, Chang, 2011

Além da diversidade quanto ao número de lncRNAs, suas características e mecanismos de ação possíveis, o fato de serem descobertas recentes e não

apresentarem função molecular clara, tem atraído o interesse de pesquisadores em busca da compreensão do papel dessas moléculas em processos fisiológicos e patológicos. A investigação da relação entre os transcritos não codificantes e doenças complexas revelou que estes apresentam expressão tecido específica relacionada com o estágio da doença, de forma que possam vir a ser estudados como alvos terapêuticos (DERRIEN et al., 2012; SAHA et al., 2017). Os lncRNAs também têm sido avaliados quanto ao papel em diferentes doenças infecciosas e interação entre lncRNAs de parasitas e hospedeiros. Em infecções virais os lncRNAs podem exercer função antagonista em relação à resposta imune antiviral do hospedeiro, podem aumentar a expressão de genes virais, a replicação e montagem viral, auxiliar na latência e transformação viral e controlar o ciclo celular (ATIANAND; FITZGERALD, 2014; GENG; TAN, 2016; OUYANG; HU; CHEN, 2016; RIAZ et al., 2016).

Até o momento identificou-se a regulação por lncRNAs em diferentes processos biológicos como na gametogênese, desenvolvimento, compensação de dose, no desenvolvimento e progressão de diferentes doenças, em processos celulares como proliferação, apoptose, senescência e comunicação entre células (SAHA et al., 2017). Alguns lncRNAs como HOTAIR, GAS5, NEAT1, ANRIL e lincRNA_p21 têm sido associados ao processo de apoptose por serem capazes de regular genes de resposta ao dano ao DNA e também pela interação com outros elementos regulatórios no contexto de alterações tumorais (NIE et al., 2012; LI et al., 2016; YU et al., 2017; ZHAO et al., 2018). Entretanto, o papel desses transcritos ainda não foi avaliado quanto à morte celular em infecções virais, podendo elucidar a via pela qual a morte celular ocorre durante uma infecção por determinado vírus.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar a relação dos lncRNAs HOTAIR, NEAT1_1 e NEAT1_2 com o processo de morte celular induzido pela infecção por OROV.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a susceptibilidade da linhagem celular Huh7.5 à infecção pelo OROV;
- Identificar e quantificar o processo de morte celular induzida pela infecção com OROV;
- Avaliar o estado pró ou anti-apoptótico de células Huh7.5 após a infecção por OROV;
- Avaliar a modulação da expressão relativa de lncRNAs em células Huh7.5 infectadas por OROV;
- Analisar o nível de expressão relativa de lncRNAs em células Huh7.5 infectadas por OROV em diferentes tempos pós infecção.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CULTIVO CELULAR, VÍRUS E INFECÇÃO

A linhagem celular Huh7.5 (ATCC PTA-8561), hepatócitos derivados de carcinoma hepático humano, foi cultivada em meio DMEM-F12, suplementado com 10% v/v soro fetal bovino, 1% v/v de antibióticos penicilina e estreptomicina à 37°C e 5% de CO₂. As células foram semeadas em placas de cultivo celular de 24 poços, 2 x 10⁵ células por poço, um dia de antes da infecção. A linhagem celular Vero E6 (ATCC CRL-1586), linhagem de células epiteliais de rim de primatas (*Cercopithecus aethiops*), foi cultivada em meio DMEM-F12, suplementado com 10% v/v soro fetal bovino, 1% v/v de antibióticos penicilina e estreptomicina à 37°C e 5% de CO₂. As

células foram semeadas em placas de cultivo de 24 poços, 1×10^5 células por poço, um dia de antes da infecção

A cepa viral de OROV foi propagada em células Vero E6 em 4 passagens seriadas nas mesmas células. Uma garrafa contendo 5×10^6 células Vero E6 foi inoculada com OROV em multiplicidade de infecção (do inglês, *multiplicity of infection* (MOIs)) 0,001 e incubada à 37°C por 1 hora. Em seguida foi adicionado meio de cultura DMEM-F12 suplementado com 10% v/v soro fetal bovino, 1% v/v de antibióticos penicilina e estreptomicina e as células foram mantidas em cultivo à 37°C e 5% de CO₂ até ser observado efeito citopático. O estoque viral utilizado neste estudo foi titulado em células Vero E6, apresentando título de $2,85 \times 10^5$ PFU_{Vero E6}/ml.

As infecções de células Huh7.5 foram realizadas em MOI de 2,5 a 0,004 em meio de cultivo sem soro fetal bovino durante 60 minutos a 37°C e 5% CO₂, com manipulação em cabine de segurança NB-2 no laboratório de Virologia Molecular do Instituto Carlos Chagas. Após uma hora de infecção o sobrenadante contendo partículas virais não internalizadas foi substituído por meio fresco completo. Após intervalos de 6, 24, 48 e 72 horas pós-infecção (hpi) as células foram desaderidas da placa com uso de tripsina (EDTA 0.05%) e separadas em quantidades adequadas para o ensaio de morte celular e para extração de RNA. O mesmo experimento lançado em paralelo foi utilizado para marcação com anticorpo monoclonal anti-OROV para análise por microscopia para análise de porcentagem de infecção e de número de células.

4.2 TITULAÇÃO VIRAL

Células Vero E6 foram semeadas em placas de 24 poços numa densidade celular de 1×10^5 células por poço. O inóculo inicial de 400 µl correspondente ao sobrenadante das células não infectadas e infectadas após 6, 24, 48 e 72 horas, numa diluição 1:10 foi diluído em série num fator de diluição 2 até a ordem de grandeza de 10¹⁰. Cada duplicata de poços foi incubada por 1 hora com o inóculo à 37°C e a 5%CO₂. Após a retirada do inóculo viral, as células foram incubadas por 7

dias em uma mistura 1:1 de carboximetilcelulose (CMC) e meio completo DMEM-12 suplementado com 20% v/v soro fetal bovino, 2% v/v de antibióticos penicilina e estreptomicina, à 37°C e a 5%CO₂. As células foram fixadas com 500 µl paraformaldeído (PFA) 3% por 20 minutos. Após o descarte do PFA as células foram incubadas por 20 minutos à temperatura ambiente com 500 µl/poço de cristal violeta. A placa foi lavada em água corrente e após secagem as placas formadas foram contabilizadas para cálculo do título viral pela fórmula

$$\text{Título viral } \left(\frac{\text{PFU}}{\text{ml}} \right) = \frac{\text{número de placas formadas na duplicata}}{2} \times \frac{1}{0,4} \times \text{fator de diluição da duplicata}$$

4.3 IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA

Para quantificação da infecção por OROV as células foram submetidas a imunofluorescência indireta com a utilização do anticorpo monoclonal anti-OROV 63 produzido no Laboratório de Virologia Molecular do Instituto Carlos Chagas. Células Huh 7.5 foram semeadas em placas de 24 poços, 2 x 10⁵ células por poço, e infectadas com OROV em MOI 0,004. Após 6, 24, 48 e 72 horas de infecção, as células foram fixadas com adição de 500 µl de metanol-acetona por pelo menos 24 horas. As células foram submetidas a três lavagens sucessivas com tampão de lavagem (PBS/0,05% tween) e então incubadas por 1 hora a 37°C com 500µl anticorpo primário monoclonal anti-OROV 63 diluído 1:800 em PBS/BSA 1%. Após 3 lavagens sucessivas com tampão de lavagem, as células foram incubadas com 500 µl do mix contendo anticorpo secundário anti-IgG conjugado ao fluoróforo Alexa-Fluor 488 diluído 1:1000, 4',6'-diamino-2-fenil-indol (DAP)I 1:1000 e azul de Evans 1:1000.

4.4 VIABILIDADE CELULAR

A utilização de corantes em testes de viabilidade por exclusão baseia-se na incapacidade do corante de adentrar células que possuam integridade da membrana celular. Dessa forma, células que se apresentem coradas são consideradas inviáveis por apresentarem a integridade de membrana comprometida. Nestes testes, diferentes corantes podem ser utilizados, entre eles o azul de tripan (STROBER,1997).

A viabilidade de células infectadas e não infectadas foi determinada pelo teste de exclusão por azul de tripan. Após 6, 24, 48 e 72 horas de infecção as células foram desadidas e ressuspensas em meio de cultivo e azul de tripan na proporção 1:1 (volume/volume). As células foram contadas em microscópio ótico com a utilização de um hemocitômetro.

4.5 ENSAIO DE MORTE CELULAR

A marcação com anexina V é um processo que consiste na distribuição assimétrica da fosfatidilserina quando iniciada a apoptose, visto que esta proteína passa a ser exposta na membrana externa da célula (MARTIN et al., 1995). As células infectadas e não infectadas foram marcadas com anexina-V e 7-amino-actinomicina D (7-AAD) conjugados a fluoróforos do kit *APC Annexin V Apoptosis Detection Kit I* - BD Pharmingen™ para leitura em citômetro FACS Canto II. Após desadidir as células, alíquotas de 200 µl de meio contendo células foram transferidas para uma placa de 96 poços fundo em U e foram centrifugadas à 2.000 rpm por 4 minutos para descarte do sobrenadante. Em seguida foi adicionado 150 µl de tampão de ligação, repetida a centrifugação e descartado o sobrenadante. O *pellet* formado foi ressuspensado em 50 µl de mistura contendo Anexina V/APC, e 7-AAD diluídos 1:100 e permaneceram em incubação por 15 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Foram realizadas duas lavagens com 150 µl de tampão de ligação após a incubação e então as células foram ressuspensas em 200 µl de tampão de ligação para leitura em citômetro em no máximo 1 hora.

Para identificação do processo de morte celular por apoptose também foi realizada RT-qPCR, a partir do RNA extraído de alíquotas contendo células infectadas e não infectadas, para análise de expressão do RNAm de genes anti-apoptótico e pró-apoptótico, respectivamente *BCL-XL* e *BAX*.

4.6 QUANTIFICAÇÃO DA INFECÇÃO

Após os tempos de 24 e 48 horas de infecção, as células infectadas e não infectadas foram desaderidas e alíquotas de 200 µl foram transferidas para uma placa de 96 poços fundo em U e centrifugadas à 2.000 rpm por 4 minutos para descarte do sobrenadante. Em seguida foram adicionados 150 µl de solução permeabilizadora Cytofix/Cytoperm™ (BD Bioscience) e a placa foi incubada a temperatura ambiente e ao abrigo de luz por 20 minutos. Foi repetida a centrifugação e descartado o sobrenadante. Os precipitados celulares formados foram ressuspensos em 50 µl de anticorpo monoclonal anti-OROV diluído 1:800 em tampão BD Perm/Wash™ (BD Bioscience) e permaneceram em incubação por 30 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Em seguida foi repetida a centrifugação e descartado o sobrenadante. Os precipitados celulares formados foram então ressuspensos em 50 µl de anticorpo secundário marcado com o fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC) diluído 1:1000 em tampão BD Perm/Wash™ (BD Bioscience) e permaneceram em incubação por 30 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Foram realizadas duas lavagens com 150 µl de tampão BD Perm/Wash™ após a incubação e então as células foram ressuspensas em 200 µl de tampão BD Perm/Wash™ para leitura em citômetro.

Para análise da titulação viral, após os tempos de 6, 24, 48 e 72 horas, o meio de cultura das células infectadas e não infectadas foi coletado e titulado em células Vero E6 por ensaio de formação de placas conforme descrito no item 4.2 (COOPER, 1962; BERGOLD; MAZZALI, 1968).

4.7 EXTRAÇÃO DE RNA E SÍNTESE DE cDNA

Células infectadas por OROV e controles foram submetidas a extração de RNA utilizando-se *RNeasy Mini Kit*, da Quiagen®, de acordo com as recomendações do fabricante. Após desaderir as células com a utilização de tripsina, as células em suspensão foram centrifugadas para remoção do meio de cultura e o precipitado celular formado foi ressuspenso pela adição de 350 µl de tampão RLT. O lisado foi homogeneizado por 30 segundos em um vórtex e foi adicionado 350 µl de etanol 70% seguindo-se de homogeneização. Setecentos microlitros foram transferidos para uma coluna com filtro e centrifugado por 2 minutos à 16.000 x g, o líquido depositado no tubo coletor foi descartado. Às colunas com filtro foram adicionados 700 µl de tampão RW1 repetindo-se a centrifugação anterior e descarte do filtrado. Foram realizadas duas lavagens na coluna com a adição de 500 µl de tampão RPE seguindo-se a centrifugação por 15 s à 16.000 x g. Após as lavagens foi realizada a eluição do RNA em 30 µL de água DEPC.

Após a extração, a concentração de RNA (µg/ml) obtida para cada amostra foi avaliada por espectrofotometria através do equipamento NanoDrop® 2000 da Thermo Scientific, bem como o grau de pureza das amostras. O tratamento com DNase (DNase Amp Grade Invitrogen®) foi efetuado, conforme recomendações do fabricante, com objetivo de eliminar possíveis resíduos de DNA.

As amostras de 1 µg RNA livres de contaminantes foram submetidas à reação de transcrição reversa, para obtenção de DNA complementar utilizando-se o *kit Reverse Transcriptase Superscript III* (Invitrogen®), de acordo com as recomendações do fabricante.

4.8 qPCR

Para os lncRNAs selecionados foram desenhados oligonucleotídeos iniciadores, do inglês *primers*, com o auxílio das ferramentas Primer-BLAST e OligoAnalyzer 3.1 (*Integrated DNA Technologies*). Os oligonucleotídeos foram desenhados de forma que cada *primer* compreendesse a porção de um exon

diferente excluindo-se a região intrônica dos genes dos lncRNAs para evitar que ocorra amplificação de DNA genômico (Tabela 1).

Tabela 1 Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para análise de expressão de genes endógenos, genes apoptóticos e lncRNAs

Gene	Primer	Sequência 5'-3'
<i>ACTB</i>	B-ACT f	CACCAACTGGGACGACAT
	B-ACT r	ACAGCCTGGATAGCAACG
<i>BAX</i>	BAX f	GGACGAACTGGACAGTAACATGG
	BAX r	GCAAAGTAGAAAAGGGCGACAAC
<i>BCL2L1</i>	BCL-XL f	TGCATTGTTCCCATAGAGTTCCA
	BCL-XL r	CCTGAATGACCACCTAGAGCCTT
<i>GUSB</i>	GUS B f	CCGAGTGAAGATCCCCTTTTTA
	GUS B r	GAAAATATGTGGTTGGAGAGCTCATT
<i>HOTAIR</i>	HOTAIR f	TGTAGACCCAGCCCAATTTAAG
	HOTAIR r	GGACCTTTGCTTCTATGTTCTC
<i>NEAT1</i>	NEAT1-1 f	TTTGTGCTTGGAACCTTGCT
	NEAT1-1 r	TCAACGCCCAAGTTATTTTC
	NEAT1-2 f	TCTCCATTTCCCCTCTGAG
	NEAT1-2 r	CAGCCACAGAAAAGGGAGAG

A PCR tempo real foi efetuada utilizando-se o *master mix SYBR®Green* (*Applied Biosystems*) e os oligonucleotídeos específicos para cada lncRNA. As reações foram realizadas em triplicata no equipamento Viia 7 Real-time PCR System (*Thermo Fischer Scientific*®). O volume final da reação foi de 10 µl por poço, sendo 5,0 µl de *master mix SYBR®Green*, 4,0 µl de cDNA diluído 1:20 e 0,5 µl de cada oligonucleotídeo. Os genes *β-Actina* e *GUS β* foram utilizados como normalizadores. A reação foi realizada com a ciclagem de 95°C por 10 min, 40 ciclos

de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 min. O cálculo da expressão foi realizado utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

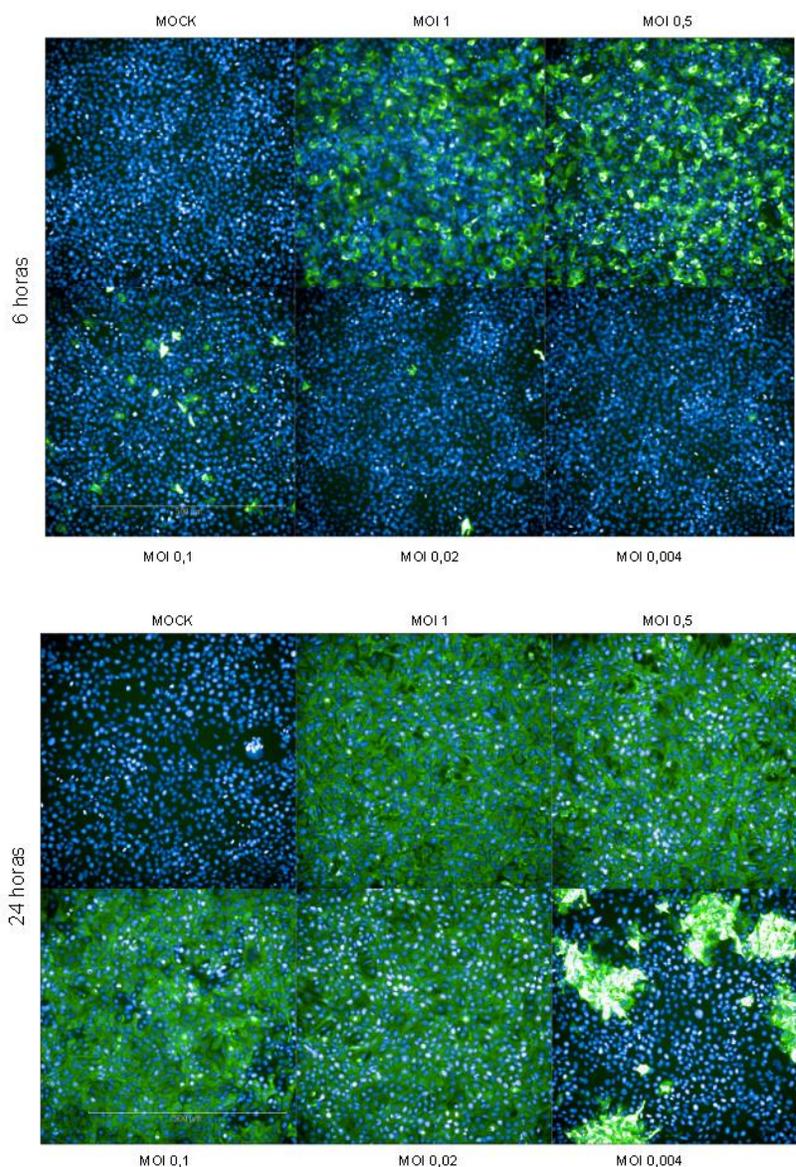
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizado o teste estatístico ANOVA, com correção pós-teste de Bonferroni. Foi realizado teste de correlação de Pearson entre os parâmetros de infecção com os dados de expressão dos lncRNAs analisados. O valor de significância foi de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Permissividade de Huh7.5 ao OROV

Células Huh7.5 foram infectadas com OROV em diferentes MOIs (1; 0,5; 0,1; 0,02 e 0,004) nos tempos de 6, 24, 48 e 72 horas para avaliar a permissividade dessa linhagem ao OROV. Independente do MOI utilizado e do tempo de infecção foi possível detectar a presença do vírus pela marcação com o anticorpo monoclonal anti-OROV, capaz de reconhecer um epítipo linear de 27 kDa da proteína do capsídeo de OROV, pela técnica de imunofluorescência indireta (FIGURA 6).



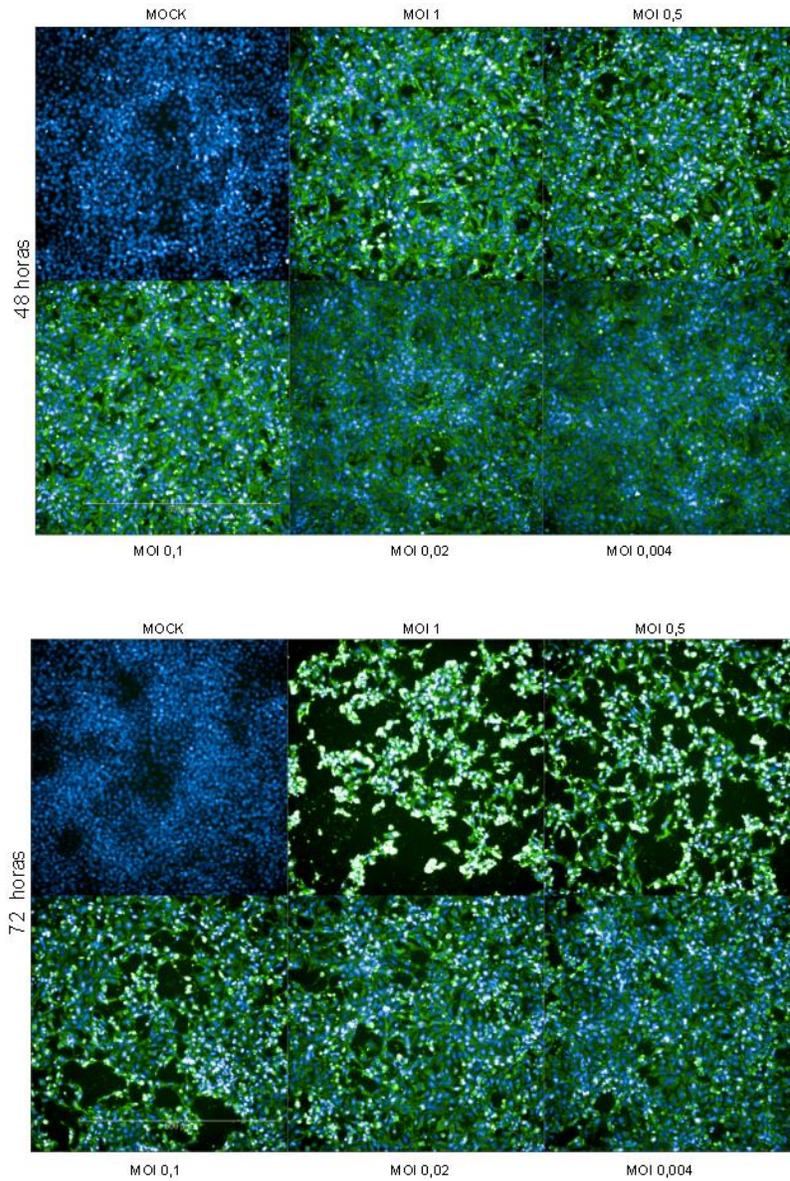


Figura 6 Imunofluorescência indireta. Indireta de células Huh 7.5. Células não infectadas (mock) e células infectadas com diferentes MOIs após 6, 24, 48 e 72h de infecção foram marcadas com anticorpo primário monoclonal anti-ov, seguido da marcação com anticorpo secundário conjugado ao fluoróforo Alexa-Fluor 488. Em azul, núcleos marcados com o corante DAPI e em verde a marcação com Alexa-Fluor 488 do anticorpo secundário. Resultado representativos de 3 experimentos independentes.

A quantificação de infecção por OROV foi avaliada por imunofluorescência indireta através da utilização do sistema de análise de alto conteúdo Operetta CLS e do software Harmony 4.5. Células não infectadas e células infectadas em diferentes MOIs (1; 0,5; ; 0,1; 0,02 e 0,004) com 6, 24, 48 e 72 horas após adição do inoculo foram marcadas com anticorpo monoclonal anti-OROV. Com 6 horas após adição do inóculo observam-se porcentagens de infecção entre 40 e 60% para os 4 maiores MOIs. A partir de 24 horas de infecção as porcentagem de células positivas para marcação com anticorpo monoclonal anti-OROV é superior a oitenta por cento para os MOIs de 1; 0,5; 0,1 e 0,02. Ainda nesse tempo, observa-se uma porcentagem de infecção próxima a 40% para células infectadas com OROV em MOI 0,004. Com 48 e 72 horas de infecção independente do MOI utilizados as células já passam a apresentar mais de 90% de infecção. (FIGURA 7).

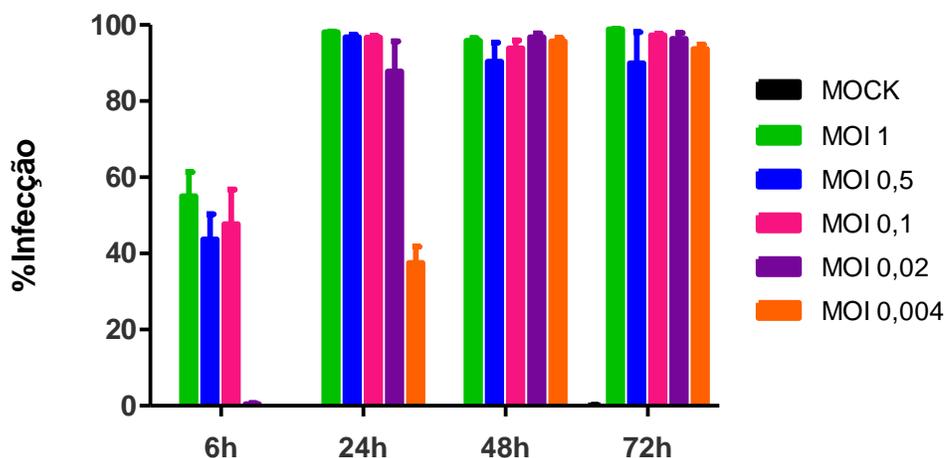


Figura 7 Cinética de infecção OROV em diferentes MOIs. Porcentagem de células positivas para marcação com anticorpo monoclonal anti-OROV. Células foram marcadas com anticorpo primário monoclonal anti-orov, seguido da marcação com anticorpo secundário conjugado ao fluoróforo Alexa-Fluor 488. Dados referentes a três experimentos independentes.

Para avaliar a capacidade replicativa de OROV o sobrenadante das células infectadas foi titulado nos tempos de 6, 24, 48 e 72 horas após infecção com OROV em MOI 0,004 (FIGURA 8). Títulos virais crescentes foram obtidos a partir de 24 horas, até ser atingido o título viral com ordem de grandeza de dez elevado a sexta

potência, coincidente com a ordem de grandeza obtida com o estoque viral produzido para esse vírus (FIGURA 8).

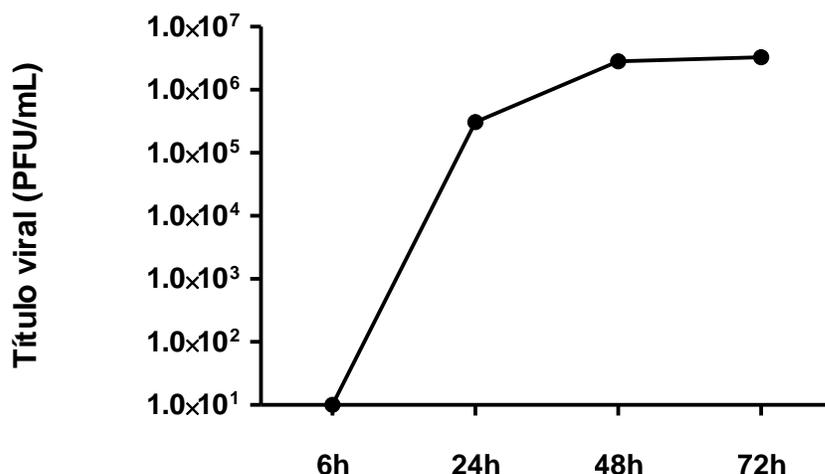
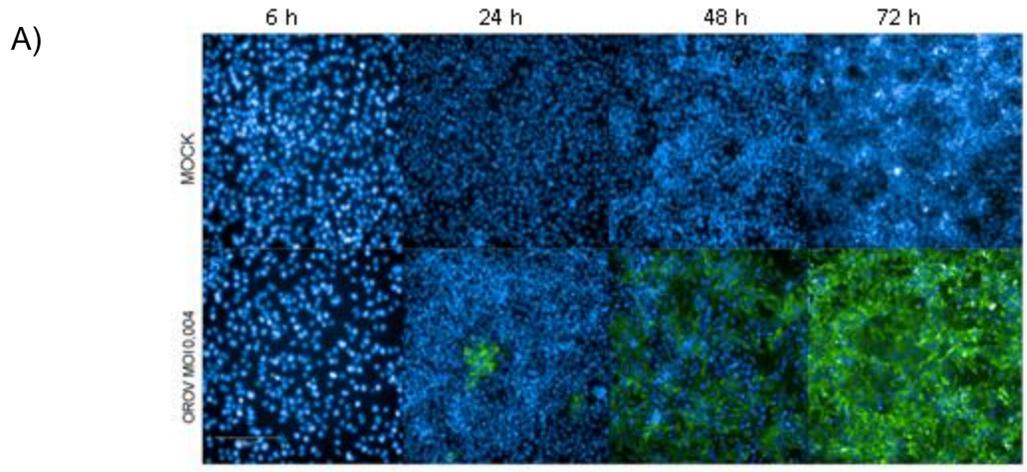


Figura 8 Título viral do meio de cultivo de células infectadas após 6, 24, 48 e 72 horas de infecção. Células Huh 7.5 foram infectadas com OROV em MOI 0,004 e os sobrenadantes dessas células foram coletados e titulados através do ensaio de placa com anticorpo monoclonal anti-OROV. Dados referentes a três experimentos independentes.

5.2 Análise de proliferação celular de Huh 7.5

Para avaliar o efeito citopático causado pela infecção por OROV, células infectadas em MOI 0,004 e não infectadas passaram por contagem de núcleos através da utilização do sistema de análise de alto conteúdo Operetta CLS e do software Harmony 4.5. As células foram marcadas com DAPI, marcador fluorescente com afinidade por regiões contendo adenina e timina na molécula de DNA dupla fita, para avaliar o número de células com o decorrer da infecção. ($p < 0,005$) (FIGURA 9).



B)

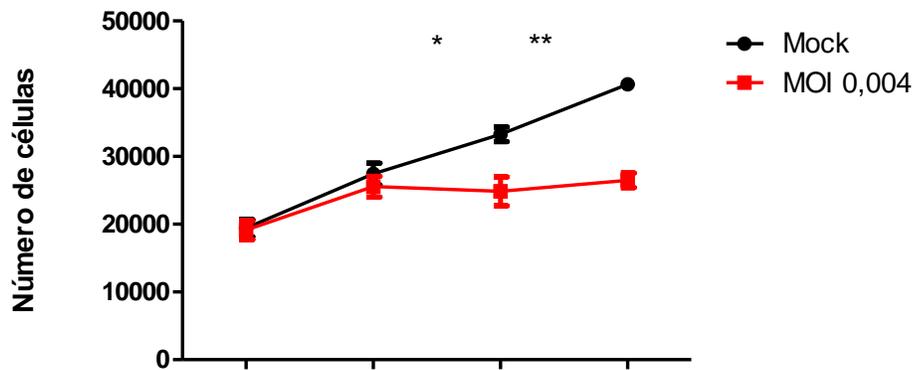


Figura 9 Número de células pós-infecção. A) Imagem de microscopia representativa de um dos experimentos com células Huh 7.5 não infectadas (mock) e infectadas com OROV em MOI 0,004. Em azul, núcleo das células marcado com DAPI e em verde células positivas para OROV marcadas com o anticorpo secundário conjugado a Alexa Fluor-488. B) Número de células em mock e infectadas com MOI 0,004 no decorrer do tempo de 6, 24, 48 e 72 horas após infecção. Dados referentes a três experimentos independentes

5.3 Ensaio de morte celular

Células não infectadas e células infectadas com moi de 0,004 foram marcadas para anexina-V e 7-AAD para avaliar o perfil de morte celular dessas células 24 e 48 horas após a infecção (FIGURA 10). O tempo de 6 horas não foi utilizado devido a pouca alteração no número de células entre mock e infectado e o tempo de 72

horas também não foi avaliado devido a redução do número de células quando infectadas.

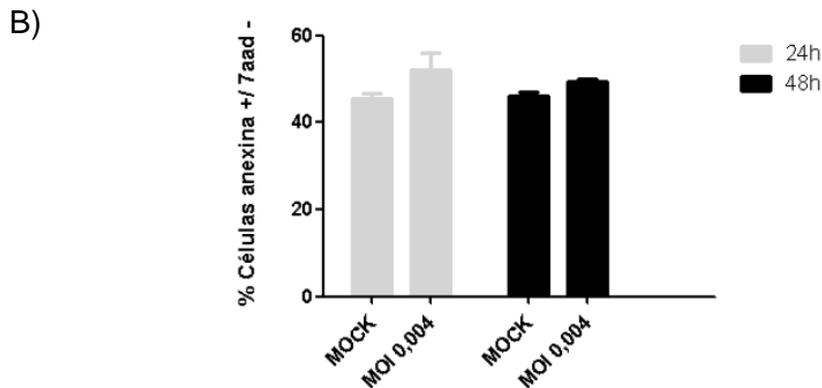
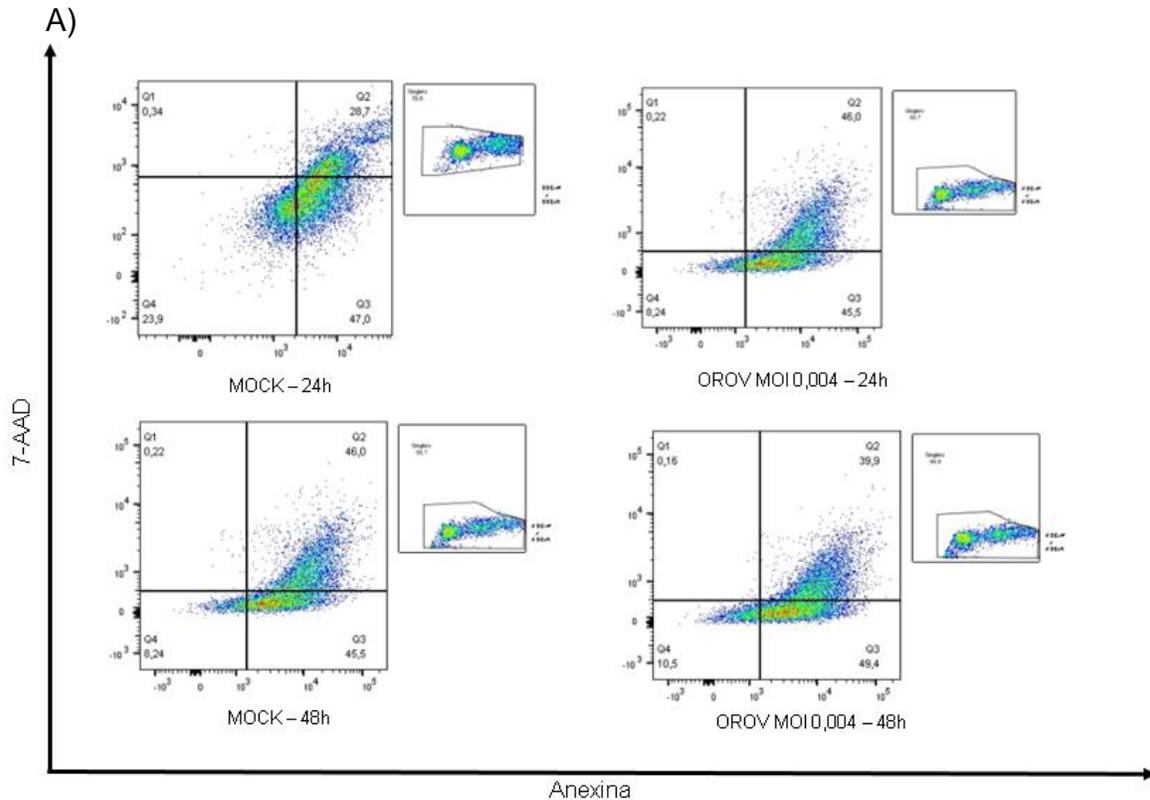


Figura 10 Análise de morte celular. A) Células Huh 7.5 foram infectadas com OROV por 24 e 48 horas, marcadas com Anexina V-APC e 7-AAD e analisadas por citometria de fluxo. A) Histograma representativo da infecção em 24 e 48 horas com a porcentagem de células viáveis, necróticas, em apoptose precoce e apoptose tardia/necrose disposta respectivamente nos quadrantes inferior esquerdo, superior esquerdo, inferior direito, superior direito. B) Porcentagem de células positivas para anexina em 24 e 48 horas. Dados referentes a um experimento.

5.4 Análise de expressão de genes apoptóticos

Na tentativa de caracterizar o processo de morte celular decorrente da infecção por OROV a expressão relativa de dois genes apoptóticos foram avaliadas em células infectadas nos tempos de 6, 24 e 48 horas após a infecção (FIGURA 11). As expressões relativas do gene anti-apoptótico *BCL-XL* e do gene pró-apoptótico *BAX* foram utilizadas para o cálculo da razão *BCL-XL/BAX* como um indicativo do estado anti ou pró-apoptótico das células infectadas. Nos tempos de 6 e 24 horas o estado anti-apoptótico é favorecido, com média de razões de 1,45 (desvio padrão $\pm 0,48$) e 1,30 (desvio padrão $\pm 0,50$). Porém, com 48 horas decorridas da infecção o estado pró-apoptótico é favorecido com um decaimento da razão *BCL-XL/BAX* para 0,60 (desvio padrão $\pm 0,43$).

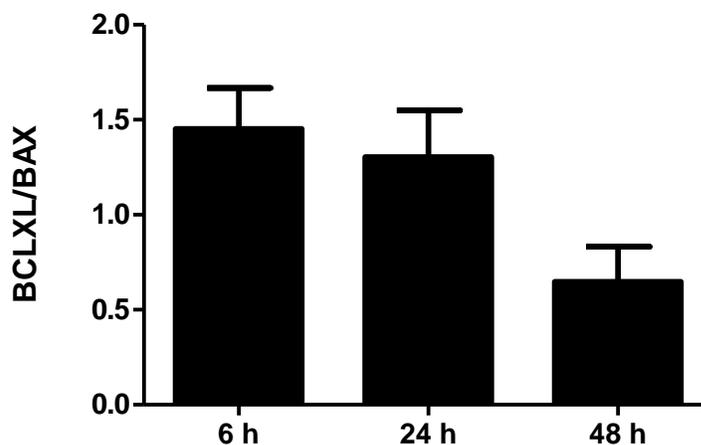


Figura 11 Razão da expressão relativa de *BCL-XL* e *BAX* em relação às células não infectadas. Células Huh 7.5 foram infectadas com OROV em MOI 0,004 e após 6, 24 e 48 horas tiveram seu RNA extraído e a expressão dos genes *BCLXL* e *BAX* analisadas por RT-qPCR. Análise da expressão relativa de cada gene apoptóticos foi realizada pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, considerando-se a expressão dos genes endógenos e dos transcritos em células não infectadas. Dados relativos a 3 experimentos independentes.

5.5 Validação dos primers e expressão basal dos lncRNAs em Huh 7.5

As eficiências dos *primers* para os genes apoptóticos (*BCL-XL* e *BAX*), para os genes endógenos (*ACT* e *GUS- β*) e para os lncRNAs NEAT-1 e NEAT-2 já haviam sido validadas previamente, tendo esses primers apresentado eficiência

entre 90% e 110% (dados não mostrados). Para verificar a eficiência do primer do lncRNA HOTAIR foi gerada uma curva de regressão linear a partir dos valores de Ct e das diluições de cDNA proveniente da linhagem celular Huh 7.5. A análise de eficiência foi realizada a partir da inclinação da reta (*slope*) da curva padrão e foi calculada pela fórmula $Eficiência = 10^{\left(\frac{1}{slope}\right)} - 1$. Valores de eficiência entre 90% e 110% indicam boa qualidade de amplificação do primer. Para o primer HOTAIR foi obtida eficiência de 101,633%. Foi avaliado também o coeficiente de correlação da reta (R^2), representativo de um ajuste entre a regressão linear da curva padrão e os valores individuais dos Cts das amostras, no qual valores próximos a 1 indicam um ajuste ideal (KIM, 2001). O coeficiente de correlação da reta foi de 0,979 para esse experimento (FIGURA 12).

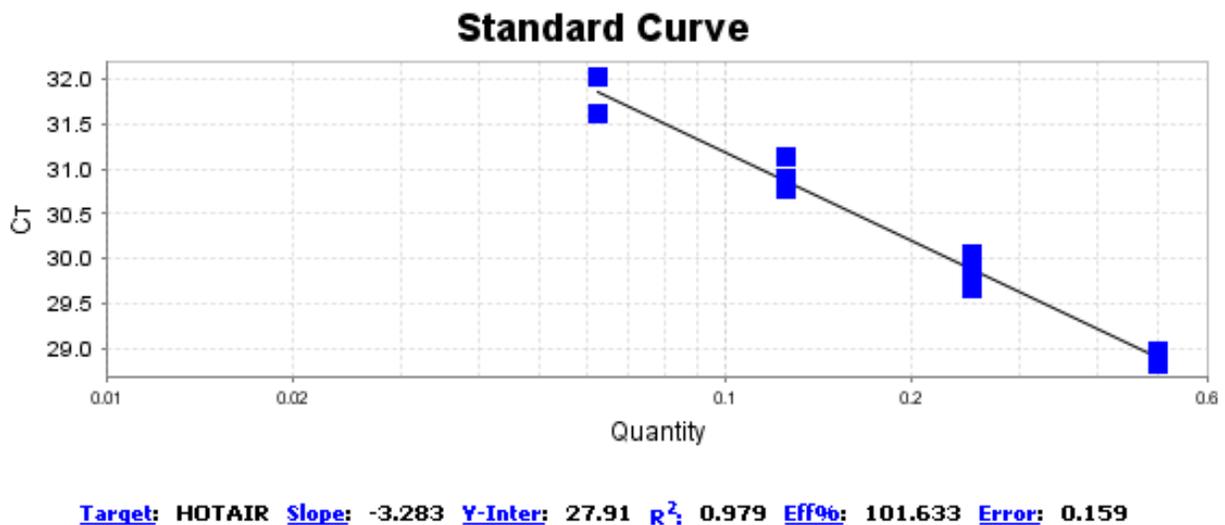


FIGURA 12 Reta de eficiência para o primer do lncRNA HOTAIR. Valores de eficiência e correlação representados abaixo do gráfico. Foram realizadas diluições seriadas 1:2 do material genético extraído da linha celular Huh7.5 e triplicatas de cada diluição foram submetidas a RT--qPCR.

Tendo em vista a expressão tecido específica dos lncRNAs foi avaliada a expressão basal dos transcritos em estudo para verificar se a linhagem Huh7.5 apresentava níveis de expressão detectáveis para HOTAIR, NEAT1 e NEAT2 (FIGURA 13). A média dos Cts estão representadas na tabela 2.

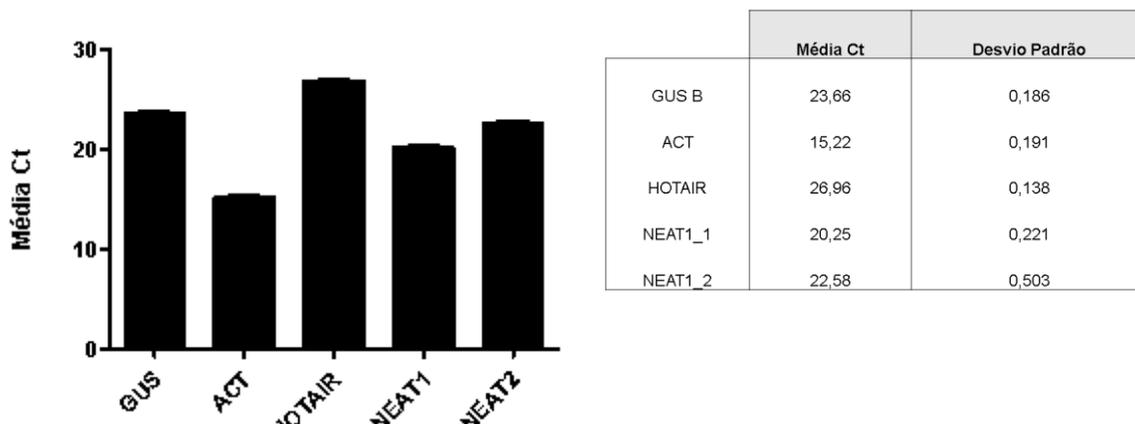


Figura 13 Gráfico da média dos Cts dos genes endógenos e lncRNAs na linhagem Huh 7.5. Células Huh 7.5 tiveram seu RNA extraído e através de RT-qPCR foi analisada a expressão basal dos genes endógenos e genes alvos. Dados referentes a um experimento.

5.6 Análise de expressão de lncRNAs

Os lncRNAs NEAT1, NEAT2 e HOTAIR tiveram sua expressão relativa calculada com base na expressão dos genes endógenos *ACT* e *GUS-β* e na expressão dos transcritos alvos nas células não infectadas. A expressão dos lncRNAs apresentou um perfil semelhante de aumento da expressão com o decorrer do tempo pós-infecção (FIGURA 14). Após 48 horas, a expressão de NEAT1 apresentou média de valor de *fold change* de 3,20, enquanto o segundo transcrito desse gene apresentou um valor de 3,84. Para HOTAIR, o valor de *fold change* médio foi de 6,90. Entretanto, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na expressão desses lncRNAs no decorrer de tempo pós infecção ($p > 0,005$).

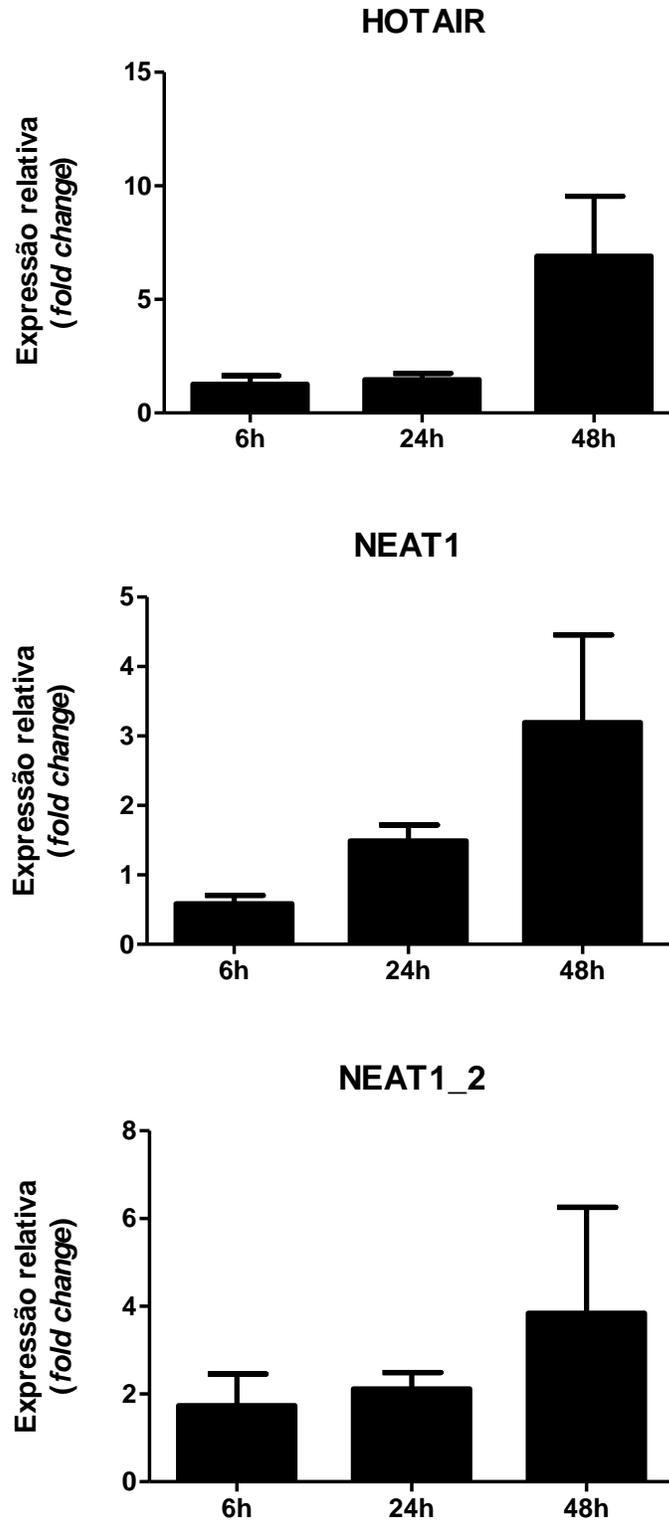


Figura 14 Expressão relativa dos lncRNAs HOTAIR, NEAT1_1 e NEAT1_2. Células Huh 7.5 foram infectadas com OROV em MOI 0,004 foram coletadas com 6, 24 e 48 horas após a infecção. Após tratamento com DNase e retrotranscrição, o DNA complementar foi

submetido a qPCR para análise da expressão dos lncRNAs e genes endógenos. Análise da expressão relativa de cada lncRNA foi realizada pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, considerando-se a expressão dos genes endógenos e dos transcritos em células não infectadas. Dados relativos a 3 experimentos independentes.

6 DISCUSSÃO

Muitos aspectos da patogênese da infecção causada por OROV permanecem desconhecidos e embora não existam relatos de comprometimento hepático em pacientes de febre oropouche, estudos em modelos animais reportaram hepatite severa e necrose tecidual, independente da via de inoculação viral (PROENCA-MODENA et al., 2015; RODRIGUES et al., 2011; SANTOS et al., 2012).

A susceptibilidade da linhagem Huh7.5 a infecção com OROV observada corrobora com as demonstrações de que o fígado é um importante local de replicação viral e de alta permissividade ao vírus, visto que a utilização, em outros estudos de outras linhagens celulares, como linfócitos e monócitos, parece não gerar elevados níveis de infecção, ou ainda, não apresentam susceptibilidade ao vírus. A alta capacidade infectiva de OROV em células hepáticas, justifica a utilização de mois muito baixos, visto que com o decorrer do tempo, a infecção culmina para uma porcentagem superior a 90%, com a observação de efeito citopático e com o alcance de um platô no título viral em tempos mais tardios (GEDDES et al., 2018).

O efeito citopático decorrente da infecção é observado em tempos iguais ou superiores a 48 horas após a infecção com OROV, corroborando com dados publicados sobre a infecção por esse vírus na mesma linhagem celular, no qual nas primeiras 18 horas de infecção não é observado efeito citopático, mesmo com mois 250 vezes maior que o utilizado nesse estudo (GEDDES et al., 2018). A observação do efeito citopático em momentos mais tardios da infecção retomam o papel ambíguo da morte celular, hora sendo evitada, hora sendo favorecida.

O processo de evasão da morte celular pode ser favorável ao desenvolvimento e amplificação da infecção viral nos momentos iniciais da infecção, na qual o retardo da morte pode significar uma maior disponibilidade de tempo para síntese de proteínas e montagem viral. Entretanto, a morte celular por apoptose em momentos mais avançados da infecção também parece ter um papel fundamental na disseminação da infecção e da nova progênie viral sem que essa morte seja responsável por uma maior sinalização acentuada para o sistema imune (AMARA;

MERCER, 2015; ROULSTON; MARCELLUS; BRANTON, 1999). Devido a essa dualidade da morte celular durante a infecção viral, diferentes vírus já foram estudados para compreensão dos mecanismos associados a esse processo e associação com a patogênese causada pela infecção (O'BRIEN, 1998)

O estudo da apoptose induzida pela infecção por vírus da família *Bunyaviridae* teve início na década de noventa com a demonstração *in vitro* e *in vivo* da apoptose causada pelo vírus La Crosse e, posteriormente outros vírus da família passaram por estudos semelhantes. Tais estudos envolveram técnicas de análise de marcação de fosfatidilserina por anexina-V e caspases por utilização de anticorpos por meio da citometria, análises de fragmentação de DNA por técnicas moleculares, expressão de genes relacionados ao processo de apoptose, análises morfológicas por microscopia e ensaios de viabilidade celular (DEL CARMEN PARQUET et al., 2001; DING et al., 2005; GONZALEZ-SCARANO et al., 1996; KANG et al., 1999; KOHL et al., 2003; MUKHERJEE et al., 2013).

A caracterização da morte celular causada pela infecção por OROV já foi investigada na linhagem celular HeLa demonstrando que esse vírus é capaz de ativar a via intrínseca da apoptose, sendo detectável a fragmentação do DNA celular e a marcação por anexina-V de células infectadas 36 horas após a infecção (ACRANI et al., 2010). Na tentativa de caracterizar a morte celular observada pelo efeito citopático, foi realizada a marcação das células infectadas e não infectadas por anexina-V e 7/AAD neste estudo. Nos tempos observados, o perfil de marcação para anexina-V foi muito semelhante entre células infectadas e não infectadas, o que pode estar associado ao viés da metodologia, uma vez que células que não estão realmente adentrando apoptose podem ser marcadas para anexina-V devido ao dano na membrana celular decorrente do processo de desagregação da camada celular do aparato de cultura (WLODKOWIC; SKOMMER; DARZYNKIEWICZ, 2012).

Embora a marcação com anexina-V por citometria de fluxo seja uma técnica indicativa do tipo de morte celular que está ocorrendo nas amostras, outras metodologias são empregadas para essa comprovação. Neste estudo, foi avaliada a razão entre os genes *BCL-XL* e *BAX* como uma forma de avaliar o estado pró-

apoptótico ou anti-apoptótico das células infectadas e não infectadas. Membros da família de genes das proteínas BCL-2, como o gene *BCL-XL*, são importantes reguladores positivos e negativos da morte celular programada (SUSAN, 2007). A proteína BCL-XL é responsável por evitar a apoptose em condições de privação celular de fatores de crescimento e também sob ação de estímulos como a presença de vírus na célula, já tendo sido observada uma maior expressão desse gene em infecções por alfavírus, vírus da encefalite japonesa, vírus La Crosse e vírus Sindbis, de forma a favorecer a sobrevivência celular (DEL CARMEN PARQUET et al., 2001; KANG et al., 1999; MASTRANGELO et al., 2000; SU et al., 2001). Em contrapartida, o gene *BAX* codifica a proteína de nome homólogo capaz de se ligar a proteína BCL-2, inibindo sua ação e favorecendo a apoptose. Dessa forma, a análise da razão entre a expressão desses genes anti e pró-apoptóticos pode determinar a sobrevivência ou morte de uma célula frente a um estímulo, e tem sido utilizada tanto em estudos da área de virologia, como também em doenças não infecciosas como uma medida de prognóstico e avaliação de resposta a tratamentos (DEL CARMEN PARQUET et al., 2001; GARCIA et al., 2013; KARALIOTAS et al., 2015; PERLMAN et al., 1999).

Neste trabalho, com o decorrer do tempo pós infecção a razão da expressão BCL-XL inicialmente aumenta, o que pode indicar o bloqueio da apoptose frente ao estímulo da presença e replicação viral, porém 48 horas após a infecção com OROV esse balanço se altera. A queda no valor da razão representa um aumento na expressão do gene *BAX* e um favorecimento do processo apoptóticos, o que pode sugerir uma estratégia de liberação da progênie viral. As alterações na proporção da expressão dos genes anti e pró-apoptóticos já foi avaliada na infecção causada pelo flavivírus West Nile, também tendo sido observada uma regulação positiva da expressão de *BAX* (DEL CARMEN PARQUET et al., 2001).

Tendo sido observadas alterações da expressão de genes reguladores da apoptose, foi avaliada a expressão basal de transcritos não codificantes nas condições de infecção e as suas expressões relativas ao longo do tempo pós infecção. O RNA intergênico antisense HOX (HOTAIR, do inglês *HOX Antisense Intergenic RNA*) foi o que apresentou o maior média de Ct, indicando uma menor

disponibilidade do transcrito na amostra, porém foi o transcrito que apresentou maior alteração no *fold change* com o decorrer do tempo pós infecção por OROV. O HOTAIR é um oncogene que é transcrito a partir da fita antisense do gene *HOXC*, localizado no cromossomo 12. Esse transcrito é capaz de regular e induzir o silenciamento de genes pela sua interação com enzimas histonas metilases e demetilases e pode atuar como um competidor endógeno através do mecanismo de esponja, no qual é capaz de sequestrar miRNAs e alterar a regulação exercidas por estes (MANDAL, S.S.; BHAN, 2017; SHAO et al., 2019).

Os estudos com HOTAIR iniciaram-se a partir de 2007 e até o momento já foi demonstrado que este transcrito se encontra altamente desregulado em diferentes tipos de câncer, em doenças cardíacas e artrites (KIM et al., 2015; LIU et al., 2019; LIU; ZHANG; QU, 2016; MAO et al., 2019). Em relação as doenças infecciosas, o papel desse transcrito não foi muito explorado, tendo sido estudado apenas no contexto das consequências cardíacas da sepse em modelo animal e na interação com proteínas virais e progressão de cânceres causados por agentes como vírus da hepatite e papilomavírus humano (CHEN et al., 2019; KIM et al., 2015; LIU; ZHANG; QU, 2016). Quanto ao envolvimento em vias de sinalização, HOTAIR parece estar associado à regulação de fatores de transcrição e genes fundamentais de resposta imune, como o fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B), fator de necrose tumoral α (TNF- α) gene *IL-6R* (CHEN et al., 2019; GUPTA et al., 2020; OUYANG; HU; CHEN, 2016). Dentro dos processos celulares, HOTAIR pode ser capaz de induzir resposta de dano ao DNA, alterar a integridade genômica da célula, processos autofágicos, inflamatórios e apoptóticos (HE; JIANG, 2019; MAO et al., 2019; SHAO et al., 2019; XU et al., 2019).

Os transcritos de NEAT1, do inglês *nuclear enriched abundant transcript 1*, embora em menor escala também apresentaram um aumento em sua expressão relativa com o decorrer do tempo pós infecção com OROV. O gene que transcreve NEAT1 está localizado no cromossomo 11 e é composto de apenas um éxon intergênico, que dá origem a dois transcritos para NEAT1, NEAT1_1 e NEAT1_2. Esses transcritos são componentes essenciais da montagem do *paraspeckle* celular, estrutura esta localizada no núcleo e envolvida nos processos de regulação

da expressão gênica, ciclo celular e resposta ao estresse celular (HIROSE et al., 2014). Ambos os transcritos de NEAT1 têm sido extensivamente estudados e associados ao desenvolvimento de progressão de doenças como variados tipos de cânceres e doenças neurológicas, mas também a processos fisiológicos (KLEC; PRINZ; PICHLER, 2019; LO; WOLFSON; ZHOU, 2016). Ao contrário do lncRNA HOTAIR, os transcritos de NEAT1 tem sido estudados em diferentes doenças infecciosas e virais, apresentando uma regulação positiva nas infecções causadas pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV-1), vírus da dengue e vírus da encefalite japonesa, e apresentando uma regulação negativa na infecção causada por Zika vírus (PANDEY et al., 2017; RAMAIAH et al., 2016; ZHANG et al., 2013). Entre os processos celulares em que atua, NEAT1 está envolvido em respostas de dano DNA associadas ao supressor tumoral p53, sequestro de fatores de transcrição e regulação epigenética (LO; WOLFSON; ZHOU, 2016).

Embora HOTAIR atue como uma molécula plataforma e NEAT1 como um lncRNA sinal, ambos já tiveram sua atividade relacionada a morte celular no processo de carcinogênese. Durante a progressão dos cânceres, HOTAIR foi descrito como envolvido no processo de apoptose pela via de ciclo celular G0/G1, enquanto NEAT1 utiliza a via relacionada a p53 (LI et al., 2016; MELLO et al., 2017). Entretanto, devido à escassez de dados quanto ao papel dessas moléculas em infecções causadas por arbovírus, ainda não é possível afirmar que as vias utilizadas são as mesmas vias de morte celular da carcinogênese.

7 CONCLUSÃO

Os resultados iniciais desse trabalho sugerem que a expressão de lncRNAs pode mudar dinamicamente no decorrer de um processo infeccioso pelo vírus Oropouche na linhagem Huh7.5. Foi observado um aumento na expressão dos transcritos alvos coincidente com o período de tempo pós infecção no qual se detecta mudança no número de células infectadas em relação às células não infectadas e alteração de genes relacionados à apoptose.

Esse foi o primeiro estudo a avaliar o papel dos lncRNAs HOTAIR e NEAT1 no contexto de uma arbovirose causada por um membro da família *Bunyaviridae*, embora ainda não tenha sido elucidada qual a via utilizada para ativação da morte celular por apoptose. A compreensão de mecanismos moleculares envolvidos na interação parasita-hospedeiro pode auxiliar na elucidação de aspectos básicos da patogênese da febre Oropouche, bem como, levar ao desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Estudos futuros envolvendo a função dos transcritos durante a morte celular decorrente da infecção por OROV podem elucidar quais os genes envolvidos e regulados nesse processo, bem como a via pela qual esses transcritos regulam etapas chaves da infecção.

REFERÊNCIAS

- ACRANI, G. O. et al. Apoptosis induced by Oropouche virus infection in HeLa cells is dependent on virus protein expression. **Virus Research**, v. 149, n. 1, p. 56–63, 2010.
- ADAMS, Michael J. et al. Changes to taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2017). **Archives of virology**, v. 162, n. 8, p. 2505-2538, 2017.
- AKHADE, V. S.; PAL, D.; KANDURI, C. Long Non Coding RNA Biology. v. 1008, p. 47–74, 2017.
- AMARA, A.; MERCER, J. Viral apoptotic mimicry. **Nature Reviews Microbiology**, v. 13, n. 8, p. 461–469, 2015.
- AMROUN, A. et al. Bunyaviridae RdRps: structure, motifs, and RNA synthesis machinery. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 753–778, 2017.
- ANDERSON, Charles R. et al. Oropouche virus: a new human disease agent from Trinidad, West Indies. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 10, n. 4, p. 574-578, 1961.
- ATIANAND, M. K.; FITZGERALD, K. A. Long non-coding rnas and control of gene expression in the immune system. **Trends in Molecular Medicine**, v. 20, n. 11, p. 623–631, 2014.
- BASTOS, M. D. S. et al. Short report: Identification of oropouche Orthobunyavirus in the cerebrospinal fluid of three patients in the Amazonas, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 86, n. 4, p. 732–735, 2012.
- BENELLI, G.; ROMANO, D. Mosquito vectors of Zika virus. **Entomologia Generalis**, p. 309-318, 2017.
- BERGOLD, G. H.; MAZZALI, R. Plaque formation by arboviruses. **The Journal of general virology**, v. 2, n. 2, p. 273–284, 1968.
- BRANNAN, Camilynn I. et al. The product of the H19 gene may function as an RNA. **Molecular and cellular biology**, v. 10, n. 1, p. 28-36, 1990.
- CHEN, J. et al. Long non-coding RNA-HOTAIR promotes the progression of sepsis by acting as a sponge of miR-211 to induce IL-6R expression. **Experimental and Therapeutic Medicine**, p. 3959–3967, 2019.
- CLARK, M. B. et al. Long noncoding RNAs in cell biology. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 22, n. 1, p. 35–43, 2011.
- CRICK, Francis. Central dogma of molecular biology. **Nature**, v. 227, n. 5258, p. 561, 1970.
- DE SOUZA LUNA, L. K. et al. Oropouche virus is detected in peripheral blood

leukocytes from patients. **Journal of Medical Virology**, v. 89, n. 6, p. 1108–1111, 2017.

DEL CARMEN PARQUET, M. et al. West Nile virus-induced bax-dependent apoptosis. **FEBS Letters**, v. 500, n. 1–2, p. 17–24, 2001.

DE OLIVEIRA, Jaqueline Carvalho et al. Long non-coding RNAs in cancer: Another layer of complexity. **The journal of gene medicine**, v. 21, n. 1, p. e3065, 2019

DERRIEN, T. et al. The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs : Analysis of their gene structure , evolution , and expression. **Genome Research**, v. 22, n. 9, p. 1775–1789, 2012.

DERRIEN, T.; GUIGÓ, R.; JOHNSON, R. The long non-coding rnas: A new (p)layer in the “dark matter”. **Frontiers in Genetics**, v. 2, n. JAN, p. 1–6, 2012.

DING, X. et al. Apoptosis of hepatocytes caused by punta toro virus (Bunyaviridae: Phlebovirus) and its implication for phlebovirus pathogenesis. **American Journal of Pathology**, v. 167, n. 4, p. 1043–1049, 2005.

FANG, Y.; FULLWOOD, M. J. Roles, Functions, and Mechanisms of Long Non-coding RNAs in Cancer. **Genomics, Proteomics and Bioinformatics**, v. 14, n. 1, p. 42–54, 2016.

FERRON, F. et al. Transcription and replication mechanisms of Bunyaviridae and Arenaviridae L proteins. **Virus Research**, v. 234, p. 118–134, 2017.

GARCIA, A. F. et al. Bovine herpesvirus type 5 infection regulates Bax/BCL-2 ratio. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, n. 3, p. 3897–3904, 2013.

GEDDES, V. E. V. et al. MicroRNA and cellular targets profiling reveal miR-217 and miR-576-3p as proviral factors during Oropouche infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 5, p. 1–25, 2018.

GENG, H.; TAN, X. DI. Functional diversity of long non-coding RNAs in immune regulation. **Genes and Diseases**, v. 3, n. 1, p. 72–81, 2016.

GLOSS, B. S.; DINGER, M. E. The specificity of long noncoding RNA expression. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1859, n. 1, p. 16–22, 2016.

GONZALEZ-SCARANO, F. et al. Induction of apoptosis by La Crosse virus infection and role of neuronal differentiation and human bcl-2 expression in its prevention. **Journal of Virology**, v. 70, n. 8, p. 5329–5335, 1996.

GUPTA, S. C. et al. Long non-coding RNAs and nuclear factor- κ B crosstalk in cancer and other human diseases. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, v. 1873, n. 1, p. 188316, 2020.

HE, B.; JIANG, D. HOTAIR-induced apoptosis is mediated by sponging miR-130a-3p to repress chondrocyte autophagy in knee osteoarthritis. **Cell biology**

international, v. 00, p. 1–12, 2019.

HIROSE, T. et al. NEAT1 long noncoding RNA regulates transcription via protein sequestration within subnuclear bodies. **Molecular Biology of the Cell**, v. 25, n. 1, p. 169–183, 2014.

HUERTA, S. et al. Screening and Detection of Apoptosis. **Journal of Surgical Research**, v. 139, n. 1, p. 143–156, 2007.

INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**, v. 409, n. 6822, p. 860, 2001.

JARROUX, J.; MORILLON, A.; PINSKAYA, M. **Long Non Coding RNA Biology**. [s.l: s.n.]. v. 1008

JIANG, C. et al. Identifying and functionally characterizing tissue-specific and ubiquitously expressed human lncRNAs. **Oncotarget**, v. 7, n. 6, p. 7120, 2016.

KANG, J. IL et al. Apoptosis is induced by Hantaviruses in cultured cells. **Virology**, v. 264, n. 1, p. 99–105, 1999.

KARALIOTAS, G. I. et al. Quantitative analysis of the mRNA expression levels of BCL2 and BAX genes in human osteoarthritis and normal articular cartilage: An investigation into their differential expression. **Molecular Medicine Reports**, v. 12, n. 3, p. 4514–4521, 2015.

KIM, D. W. Real time quantitative PCR. **Experimental & molecular medicine**, v. 33, n. 1 Suppl, p. 101–109, 2001.

KIM, H. J. et al. Long non-coding RNA HOTAIR is associated with human cervical cancer progression. **International Journal of Oncology**, v. 46, n. 2, p. 521–530, 2015.

KLEC, C.; PRINZ, F.; PICHLER, M. Involvement of the long noncoding RNA NEAT1 in carcinogenesis. **Molecular Oncology**, v. 13, n. 1, p. 46–60, 2019.

KOHL, A. et al. Bunyamwera Virus Nonstructural Protein NSs Counteracts Interferon Regulatory Factor 3-Mediated Induction of Early Cell Death. **Journal of Virology**, v. 77, n. 14, p. 7999–8008, 2003.

KUNG, J. T. Y.; COLOGNORI, D.; LEE, J. T. Long Noncoding RNAs: Past, Present, and Future. **Genetics**, v. 193, n. 3, p. 651–669, 2013.

KUMAR, Vinay. **Robbins & cotran-patologia bases patológicas das doenças** 8a edição. Elsevier Brasil, 2010.

LI, J. et al. Long Noncoding RNAs Regulate Cell Growth, Proliferation, and Apoptosis. **DNA and Cell Biology**, v. 35, n. 9, p. 459–470, 2016.

LIU, B. et al. The HOTAIR/miR-214/ST6GAL1 crosstalk modulates colorectal cancer procession through mediating sialylated c-Met via JAK2/STAT3 cascade. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, v. 38, n. 1, p. 1–12, 2019.

LIU, S.; ZHANG, M.; QU, P. Expression level and clinical significance of HOX transcript antisense intergenic RNA in cervical cancer: A meta-analysis. **Scientific Reports**, v. 6, n. 156, p. 1–6, 2016.

LIVONESI, M. C. et al. In vitro and in vivo studies of ribavirin action on brazilian orthobunyavirus. v. 75, n. 5, p. 1011–1016, 2006.

LO, P. K.; WOLFSON, B.; ZHOU, Q. Cellular, physiological and pathological aspects of the long non-coding RNA NEAT1. **Frontiers in Biology**, v. 11, n. 6, p. 413–426, 2016.

MANDAL, S.S.; BHAN, A. Lncrna HOTAIR: a master regulator of chromatin dynamics and cancer. **Physiology & behavior**, v. 176, n. 1, p. 139–148, 2017.

MAO, T. et al. Silencing lncRNA HOTAIR declines synovial inflammation and synoviocyte proliferation and promotes synoviocyte apoptosis in osteoarthritis rats by inhibiting Wnt/ β -catenin signaling pathway. **Cell Cycle**, v. 18, n. 22, p. 3189–3205, 2019.

MARTIN, S. J. et al. 9 mer by overexpression of Bcl-2 and Abl. **The Journal of experimental medicine**, v. 182, n. November, p. 1545–1556, 1995.

MASTRANGELO, A. J. et al. Part I. Bcl-2 and Bcl-X(L) limit apoptosis upon infection with alphavirus vectors. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 67, n. 5, p. 544–554, 2000.

MELLO, S. S. et al. Neat1 is a p53-inducible lincRNA essential for transformation suppression. **Genes and Development**, v. 31, n. 11, p. 1095–1108, 2017.

MUKHERJEE, P. et al. Activation of the innate signaling molecule MAVS by bunyavirus infection upregulates the adaptor protein SARM1, leading to neuronal death. **Immunity**, v. 38, n. 4, p. 705–716, 2013.

NIE L. et al. Long non-coding RNAs: versatile master regulators of gene expression and crucial players in cancer. **Am J Transl Res**. v 4, n. 2, p.127-150, 2012.

ORZALLI, M. H. et al. viral infection. v. 27, n. 11, p. 800–809, 2018.

OUYANG, J.; HU, J.; CHEN, J. L. lncRNAs regulate the innate immune response to viral infection. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**, v. 7, n. 1, p. 129–143, 2016.

PANDEY, A. D. et al. Correlation of altered expression of a long non-coding RNA, NEAT1, in peripheral blood mononuclear cells with dengue disease progression. **Journal of Infection**, v. 75, n. 6, p. 541–554, 2017.

PERLMAN, H. et al. An elevated bax/bcl-2 ratio corresponds with the onset of prostate epithelial cell apoptosis. **Cell Death and Differentiation**, v. 6, n. 1, p. 48–54, 1999.

PINHEIRO, Francisco P. et al. Oropouche virus. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 30, n. 1, p. 149-160, 1981.

PROENCA-MODENA, J. L. et al. Oropouche Virus Infection and Pathogenesis Are Restricted by MAVS, IRF-3, IRF-7, and Type I Interferon Signaling Pathways in Nonmyeloid Cells. **Journal of Virology**, v. 89, n. 9, p. 4720–4737, 2015.

RAMAIAH, A. et al. Dysregulation of Long Non-coding RNA (lncRNA) Genes and Predicted lncRNA-protein Interactions during Zika Virus Infection. **BioRxiv**, p. 1–24, 2016.

RIAZ, N. et al. HHS Public Access. v. 118, n. 24, p. 6072–6078, 2016.

RODRIGUES, A. H. et al. Oropouche virus experimental infection in the golden hamster (*Mesocricetus auratus*). **Virus Research**, v. 155, n. 1, p. 35–41, 2011.

ROMERO-ALVAREZ, D.; ESCOBAR, L. E. Oropouche fever, an emergent disease from the Americas. **Microbes and Infection**, v. 20, n. 3, p. 135–146, 2018.

ROULSTON, A.; MARCELLUS, R. C.; BRANTON, P. E. Viruses and Apoptosis. **Annual Review of Microbiology**, v. 53, n. 1, p. 577–628, 1999.

SAHA, P. et al. **Long Non Coding RNA Biology**. [s.l: s.n.]. v. 1008

SAKKAS, H. et al. Oropouche fever: A review. **Viruses**, v. 10, n. 4, p. 1–16, 2018.

SANTOS, R. I. et al. Experimental infection of suckling mice by subcutaneous inoculation with oropouche virus. **Virus Research**, v. 170, n. 1–2, p. 25–33, 2012.

SANTOS, R. I. M. et al. Oropouche virus entry into HeLa cells involves clathrin and requires endosomal acidification. **Virus Research**, v. 138, n. 1–2, p. 139–143, 2008.

SHAO, T. et al. The long noncoding RNA HOTAIR serves as a microRNA-34a-5p sponge to reduce nucleus pulposus cell apoptosis via a NOTCH1-mediated mechanism. **Gene**, v. 715, n. 23, p. 144029, 2019.

SMITHBURN, K. C.; HADDOW, A. J.; MAHAFFY, A. F. A neurotropic virus isolated from *Aedes* mosquitoes caught in the Semliki forest. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 1, n. 2, p. 189-208, 1946.

STROBER, Warren. Trypan blue exclusion test of cell viability. **Current protocols in immunology**, v. 21, n. 1, p. A. 3B. 1-A. 3B. 2, 1997.

SU, H. L. et al. The effect of human bcl-2 and bcl-x genes on dengue virus-induced apoptosis in cultured cells. **Virology**, v. 282, n. 1, p. 141–153, 2001.

SUN, Y. et al. Bunyavirales ribonucleoproteins: the viral replication and transcription machinery. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 522–540, 2018.

SUSAN, E. Apoptosis: A Reveiw of Programmed Cell Death. **Toxicologic Pathology**, v. 35, n. 4, p. 496–516, 2007.

TRAVASSOS DA ROSA, J. F. et al. Oropouche virus: Clinical, epidemiological, and molecular aspects of a neglected orthobunyavirus. **American Journal of**

Tropical Medicine and Hygiene, v. 96, n. 5, p. 1019–1030, 2017.

VERNAL, S.; MARTINI, C. C. R.; DA FONSECA, B. A. L. Oropouche virus–associated aseptic meningoencephalitis, Southeastern Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 25, n. 2, p. 380–382, 2019.

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, K. C.; CHANG, H. Y. Molecular Mechanisms of Long Noncoding RNAs. **Molecular Cell**, v. 43, n. 6, p. 904–914, 2011.

WLODKOWIC, D.; SKOMMER, J.; DARZYNKIEWICZ, Z. Cytometry of apoptosis. Historical perspective and new advances. **Experimental Oncology**, v. 34, n. 3, p. 255–262, 2012.

XU, T. et al. MiR-326 Inhibits Inflammation and Promotes Autophagy in Silica-Induced Pulmonary Fibrosis through Targeting TNFSF14 and PTBP1. **Chemical Research in Toxicology**, 2019.

YANG, L.; FROBERG, J. E.; LEE, J. T. Long noncoding RNAs: fresh perspectives into the RNA world. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 39, n. 1, p. 35–43, 2014.

YU, G.J. et al. Long non-coding RNA HOTAIR functions as a competitive endogenous RNA to regulate PRAF2 expression by sponging miR-326 in cutaneous squamous cell carcinoma. **Cancer cell international**, v. 19, n. 1, p. 1–13, 2019.

ZHANG, Q. et al. NEAT1 long noncoding RNA and paraspeckle bodies modulate HIV-1 posttranscriptional expression. **mBio**, v. 4, n. 1, p. 1–9, 2013.

ZHOU, X. et al. Virus infection and death receptor-mediated apoptosis. **Viruses**, v. 9, n. 11, 2017.