



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

**CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DE MECANISMOS DE APOPTOSE EM
INFECÇÃO DE VÍRUS DA PESTE SUÍNA AFRICANA (VPSA) EM MACRÓFAGOS
DE SUÍNO**

MARIA RAQUEL SEIÇA PORTUGAL

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Presidente:

Reitor da Universidade Técnica de Lisboa

Vogais:

Professor Doutor Luís Manuel Morgado Tavares

Professor Doutor Carlos Manuel Lopes Vieira Martins

Professora Doutora Cecília Maria Pereira Rodrigues

Professora Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte

Doutor José Alexandre da Costa Perdigão e Cameira

Leitão

ORIENTADOR

Professor Doutor Carlos

Manuel Lopes Vieira

Martins

2008

LISBOA



UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

CONTRIBUIÇÃO PARA O ESTUDO DE MECANISMOS DE APOPTOSE EM
INFECÇÃO DE VÍRUS DA PESTE SUÍNA AFRICANA (VPSA) EM MACRÓFAGOS DE
SUÍNO

MARIA RAQUEL SEIÇA PORTUGAL

TESE DE DOUTORAMENTO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA ANIMAL

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

Presidente:

Reitor da Universidade Técnica de Lisboa

ORIENTADOR

Professor Doutor Carlos

Manuel Lopes Vieira Martins

Vogais:

Professor Doutor Luís Manuel Morgado Tavares

Professor Doutor Carlos Manuel Lopes Vieira Martins

Professora Doutora Cecília Maria Pereira Rodrigues

Professora Doutora Ana Isabel Simões Pereira Duarte

Doutor José Alexandre da Costa Perdigão e Cameira Leitão

2008

LISBOA

DECLARAÇÃO

Maria Raquel Seíça Portugal

Endereço electrónico: portmari@gmail.com

Telefone: 919306028

Número do bilhete de identidade: 9749147

Título: Contribuição para o estudo de mecanismos de apoptose em infecção de vírus da peste suína africana (VPSA) em macrófagos de suíno.

Orientador: Professor Doutor Carlos Manuel Lopes Vieira Martins

Ano de conclusão: 2008

Doutoramento em Ciência e Tecnologia Animal

É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.

Faculdade de Medicina Veterinária da UTL, 02/09/2008

Assinatura:

À minha irmã

Agradecimentos

A realização deste trabalho foi possível graças ao apoio e colaboração de várias pessoas e instituições, às quais gostaria de deixar os meus sinceros agradecimentos:

Ao meu orientador, Professor Doutor Carlos Martins, por me ter recebido no laboratório de Doenças Infecciosas (LDI) da Faculdade de Medicina Veterinária e dado a oportunidade de trabalhar numa área fascinante e desafiadora como é o estudo da peste suína africana. A sua constante abertura e capacidade empreendedora para iniciar novas áreas de investigação e novos projectos têm sido uma valiosa fonte de inspiração e aprendizagem.

Ao Doutor Alexandre Leitão, pelo seu constante interesse e disponibilidade em discutir ciência, pelos seus ensinamentos e ajuda ao longo destes anos de trabalho, sem esquecer a ajuda na revisão deste manuscrito. A sua dedicação à investigação e inteligência com que gere várias áreas de estudo têm sido também inspiradoras.

Ao Professor Doutor Luís Tavares, pelo apoio precioso através do Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA) e pelas suas palavras de apreço e interesse nesta área particular de investigação, que foram para mim encorajadoras.

Aos colegas de trabalho no LDI, Afonso Basto, Solange Gil, João Oliveira, Maria de Jesus Silva, Clara Cartaxeiro, Conceição Trigo e Rui Vieira, pela troca de conhecimentos, ajuda técnica e companheirismo de muitas horas de trabalho ao longo deste doutoramento.

À Isabel Bernardino, cuja coragem, alegria e carinho no breve tempo em que nos conhecemos nunca irei esquecer, e à Alessandra de Moraes, pelas palavras amigas e divertidas que muitas vezes amenizaram dias mais difíceis.

Ao Doutor Michael Parkhouse e Ana Luísa Reis do Instituto Gulbenkian de Ciência, pela ajuda científica e técnica em alguns dos estudos deste trabalho, e com quem foi igualmente um prazer privar em várias reuniões de trabalho e congressos.

À Margarida Duarte do Laboratório Nacional de Investigação Veterinária, pela simpatia com que me facultou alguns elementos da sua tese de doutoramento e esclareceu dúvidas acerca dos isolados virais estudados.

Aos colegas e amigos que fiz na Faculdade de Medicina Veterinária, Cláudia Almendra, Catarina Fernandes, Isadora Pereira, João Salgueiro, Lina Cavaco, Susana Mendes, Yara Reis, cujo companheirismo e amizade fizeram com que me sentisse em casa, e cuja ajuda e presença em momentos difíceis têm sido tão importantes.

Aos meus amigos Florbela Elias, André Oliveira, Cristina Carvalho, um muito obrigado por todo o apoio, carinho e disponibilidade com que sempre me ouvem, animam e ajudam. Obrigado por estarem sempre aí.

À minha família, por toda a compreensão em tantas ausências, e pelo apoio incondicional que sempre me dão, mesmo quando isso implica um sobrepeso adicional nas suas vidas. Obrigado pelas palavras sempre encorajadoras apesar de todas as dificuldades.

Um agradecimento em especial à minha irmã, a quem dedico esta tese, cuja força e grandeza de alma têm sido para mim um exemplo. Obrigado por toda a ajuda, carinho e amizade, que sempre me incentivaram a ir mais além.

Bolsas e projectos de investigação ao abrigo dos quais o trabalho foi realizado

Fundação para a Ciência e Tecnologia (FCT):

- Bolsa de doutoramento Ref SFRH / BD / 10576 / 2002, co-financiada pelo POCI 2010 – Formação Avançada para a Ciência – Medida IV.3, e FSE;
- Projecto POCI / CVT / 59122 / 2004: “Caracterização de interacções do vírus da peste suína africana (VPSA) com macrófagos de suíno, relevantes para o desenvolvimento de mecanismos de protecção contra a infecção”;

Projecto QLK2-CT-2001-02216 da União Europeia: “African swine fever (ASF): improved diagnostic methods and understanding of virus epidemiology and virus-host interactions (ASF control)”.

Apoios para formação concedidos pelo Centro de Investigação Interdisciplinar em Sanidade Animal (CIISA) da Faculdade de Medicina Veterinária de Lisboa (FMV).



Programa Operacional Ciência e Inovação 2010
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E ENSINO SUPERIOR



CIISA
Centro de Investigação Interdisciplinar
em Sanidade Animal

Contribuição para o estudo de mecanismos de apoptose em infecção de vírus da peste suína africana (VPSA) em macrófagos de suíno.

Resumo:

A modulação de apoptose em macrófagos de suíno foi estudada durante infecção *in vitro* pelos isolados de vírus da peste suína africana (VPSA) L60, de alta virulência, e NHV, de baixa virulência. Ambos desencadearam apoptose mas morte celular expressiva observou-se apenas tardiamente, após conclusão do ciclo viral.

Na infecção por L60 identificou-se menor fragmentação internucleossômica (FIN) de DNA a tempo precoce e menor activação de caspase-3 durante 18h de infecção. Em correlação, quantificou-se maior expressão de mRNA do gene viral homólogo de *bcl-2* muito precocemente após infecção por L60 e maior produção de proteína viral homóloga de IAPs ao longo desta, em comparação com NHV. Contudo, a tempo tardio (18h) a FIN de DNA foi semelhante em ambas infecções. A inibição de caspases por zVAD-fmk não preveniu significativamente a FIN, sugerindo independência daquelas proteases no processo apoptótico desencadeado pelo VPSA.

Apesar da diferente modulação de apoptose, ambos os vírus produziram progenia semelhante após 18h de infecção, sugerindo exigências particulares de cada isolado para completar o seu ciclo de replicação *in vitro*.

O estudo do significado *in vivo* das diferenças na modulação de apoptose por L60 e NHV poderá contribuir para a melhor compreensão da patogenia de infecção pelo VPSA.

Palavras-chave: VPSA, apoptose, virulência, macrófago.

Contribution for the study of apoptosis mechanisms in African swine fever virus (ASFV) infection of swine macrophages

Abstract:

Modulation of apoptosis by African swine fever virus (ASFV) in swine macrophages was studied during *in vitro* infection by highly virulent L60 and low virulence NHV. Both isolates triggered apoptosis, but meaningful cell death was observed only late in infection, after viral cycle conclusion.

L60 induced lesser DNA internucleosomal fragmentation (INF) at early time and lesser activation of caspase-3 along 18h infection. Accordingly, expression of mRNA for viral *bcl-2* homologue gene at very early infection, and of viral protein homologue to IAPs along infection, was higher with L60 when compared to NHV. At late time however (18h), DNA INF was similar in both infections. Caspase inhibition by zVAD-fmk didn't significantly prevent INF, suggesting that the apoptotic process triggered by ASFV may be independent of such proteases.

In spite of the different modulation of apoptosis, both viruses produced similar progeny after 18h infection, suggesting diverse demands of each isolate to accomplish replication *in vitro*.

Study of the *in vivo* significance of differences in apoptosis modulation by L60 and NHV may open new insights for the understanding of ASFV pathogenesis.

Keywords: ASFV, apoptosis, virulence, macrophage.

ÍNDICE GERAL

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. O vírus da peste suína africana (VPSA)	1
1.2. Patogenia da PSA.....	2
1.3. Biologia do VPSA.....	4
1.3.1. O virião	4
1.3.2. O ciclo infeccioso do VPSA nas células hospedeiras: ligação, internalização, replicação e montagem das partículas virais	5
1.4. Genes de VPSA: modulação de funções celulares e evasão viral ao sistema imunitário	8
1.5. A infecção por VPSA de diferente virulência no estudo da PSA.....	12
1.6. Os isolados de VPSA L60 e NHV	13
1.7. Vias de indução de morte celular	18
1.7.1. Morte celular não apoptótica.....	18
1.7.2. Morte celular apoptótica.....	19
1.7.2.1. Regulação da via de apoptose	24
1.7.2.1.1. Família Bcl-2.....	25
1.7.2.1.2. Família IAP	27
1.7.2.1.3. A proteína p53	27
1.7.2.1.4. A via de sinalização de NFκB	28
1.8. O VPSA e apoptose	33
1.8.1. Mecanismos potenciais de modulação de apoptose na célula hospedeira	35
2. OBJECTIVOS	41
3. MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1. Obtenção de culturas primárias de macrófagos de suíno	43
3.2. Propagação de VPSA em culturas enriquecidas de macrófagos.....	44
3.3. Semipurificação de VPSA	44
3.4. Titulação de VPSA	44
3.5. Infecção <i>in vitro</i> de culturas de macrófagos com VPSA.....	45
3.6. Avaliação de parâmetros da infecção com L60 e NHV em culturas de macrófagos.....	46
3.6.1. Quantificação de progenia viral no sobrenadante de culturas	46
3.6.2. Determinação do número de células infectadas em cultura	46
3.7. Determinação da viabilidade celular	47
3.8. Pesquisa de indicadores de apoptose	48
3.8.1. Fragmentação internucleossómica (FIN) de DNA.....	48
3.8.1.1. Visualização do padrão de migração do DNA em electroforese...48	
3.8.1.2. Quantificação de oligonucleossomas de DNA por ELISA.....	49
3.8.2. Avaliação morfológica de apoptose: condensação e fragmentação da cromatina nuclear.....	50
3.8.3. Actividade de caspase-3.....	51
3.8.3.1. Inibição de caspases com zVAD-fmk	51
3.9. Indução exógena de apoptose.....	52
3.10. Estudo da expressão de genes virais envolvidos na inibição de apoptose durante infecção por L60 e NHV.....	53
3.10.1. Desenho de oligómeros	53
3.10.2. Sequenciação dos genes virais 5- <i>HL</i> e 4- <i>CL</i> de L60 e NHV	54

3.10.2.1.	Obtenção de DNA viral.....	54
3.10.2.2.	Amplificação de regiões genómicas contendo <i>5-HL</i> e <i>4-CL</i>	54
3.10.2.3.	Clonagem das sequências amplificadas e sequenciação	55
3.10.3.	Extracção de RNA e tratamento com DNase.....	57
3.10.4.	Síntese de cDNA	59
3.10.5.	Oligómeros específicos para os genes virais <i>5-HL</i> e <i>4-CL</i>	59
3.10.6.	Oligómeros específicos para genes constitutivos de suíno	60
3.10.7.	Especificidade dos oligómeros	61
3.10.8.	Obtenção de DNA de concentração conhecida (DNA standard) para construção de rectas padrão em PCR em tempo real (qPCR)	62
3.10.9.	Optimização das reacções de qPCR: eficiências da amplificação e obtenção de produtos específicos	63
3.10.9.1.	Eficiência de amplificação do DNA standard.....	63
3.10.9.2.	Eficiência de amplificação de cDNA.....	64
3.10.9.3.	Especificidade dos produtos de amplificação.....	65
3.10.9.3.1.	Análise de curvas de dissociação	65
3.10.9.3.2.	Análise dos amplificados por electroforese	65
3.10.10.	Quantificação das sequências alvo em cDNA por qPCR	65
3.10.11.	Northern blot: detecção de transcritos do gene viral <i>4-CL</i>	66
3.10.11.1.	Electroforese de RNA e transferência para suporte sólido	66
3.10.11.2.	Construção de sondas.....	68
3.10.11.2.1.	Sonda de RNA	68
3.10.11.2.2.	Sonda de DNA	70
3.10.11.3.	Hibridação e detecção por quimioluminescência.....	71
3.10.11.4.	Determinação da dimensão de transcritos de <i>4-CL</i>	72
3.11.	Western blot.....	72
3.11.1.	Preparação de extractos proteicos de macrófagos.....	72
3.11.2.	Electroforese de proteínas em gel de poliacrilamida / SDS	73
3.11.3.	Transferência para suporte sólido	74
3.11.4.	Detecção de proteínas.....	75
3.12.	Análise estatística de resultados.....	75
4.	RESULTADOS	77
4.1.	Avaliação de parâmetros da infecção com L60 e NHV em culturas de macrófagos de suíno.....	77
4.2.	Efeito da infecção por L60 e NHV no desencadeamento de morte celular em macrófagos de suíno	80
4.2.1.	Sobrevivência celular ao longo da infecção	80
4.2.2.	Pesquisa de indicadores de apoptose em culturas infectadas	81
4.2.2.1.	Parâmetros qualitativos indicadores de apoptose.....	81
4.2.2.2.	Quantificação de indicadores bioquímicos de apoptose: actividade de caspase-3 e fragmentação internucleossómica de DNA.....	85
4.2.2.3.	Determinação da relevância de caspases no desencadeamento de apoptose e morte celular a tempo tardio de infecção.....	87
4.2.2.4.	Ocorrência de apoptose em células infectadas e não infectadas de culturas inoculadas com L60 e NHV	91
4.3.	Efeito da infecção por L60 e NHV no desencadeamento de apoptose induzida exogenamente em culturas de macrófagos	95
4.3.1.	Pesquisa de indutores de apoptose em macrófagos de suíno.....	95
4.3.1.1.	TNF- α e CHX.....	95
4.3.1.2.	STS	98

4.3.1.3.	Privação de soro	101
4.3.2.	Determinação dos níveis de apoptose em células infectadas e tratadas para indução exógena de apoptose	103
4.3.2.1.	Indução de apoptose com CHX	103
4.3.2.2.	Indução de apoptose com STS.....	106
4.3.2.3.	Indução de apoptose por privação de soro.....	108
4.4.	Mecanismos virais reguladores da morte celular na célula hospedeira: estudo da expressão dos genes virais potencialmente envolvidos em inibição de apoptose – <i>5-HL</i> (homólogo de <i>bcl-2</i>) e <i>4-CL</i> (homólogo de <i>iap</i>)	110
4.4.1.	Sequenciação de <i>4-CL</i> e <i>5-HL</i> nos isolados virais em estudo.....	110
4.4.2.	Quantificação da expressão em mRNA de <i>5-HL</i> e <i>4-CL</i> ao longo das infecções	117
4.4.2.1.	Desenho de oligómeros e definição das condições óptimas de PCR quantitativo.....	118
4.4.2.2.	Expressão de genes constitutivos de suíno e verificação da sua validade como controlos endógenos no modelo em estudo	127
4.4.2.3.	Comparação dos níveis de expressão de <i>5-HL</i> e <i>4-CL</i> ao longo da infecção com L60 e NHV	130
4.4.3.	Análise da transcrição de <i>4-CL</i> ao longo do ciclo infeccioso por Northern blot	131
4.4.4.	Estudo da expressão da proteína viral <i>4-CL</i> ao longo das infecções	134
5.	DISCUSSÃO	137
6.	BIBLIOGRAFIA	155

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Oligómeros <i>forward</i> (<i>for</i>) e <i>reverse</i> (<i>rev</i>) desenhados para o estudo da expressão dos genes virais em qPCR.	60
Tabela 2. Oligómeros <i>forward</i> (<i>for</i>) e <i>reverse</i> (<i>rev</i>) desenhados para o estudo da expressão de genes constitutivos de suíno em qPCR.	61
Tabela 3. Percentagens de células em apoptose em culturas controlo não infectadas (C), e em subpopulações de células infectadas e não infectadas de culturas inoculadas com L60 e NHV.	94
Tabela 4. Condições optimizadas de amplificação em qPCR com os diferentes oligómeros e respectivas eficiências sobre DNA standard e cDNA.	126
Tabela 5. Comparação da quantidade de proteína viral 4-CL produzida em macrófagos infectados em paralelo com L60 e NHV após 8h e 16h de infecção....	135
Tabela 6. Comparação dos níveis de expressão do gene <i>4-CL</i> , ao nível de mRNA e de proteína, em células infectadas em paralelo com L60 e NHV, após 8h e 16h de infecção.	135

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática dos membros das FMG 360 e 530 presentes na região variável esquerda dos isolados Lisboa 60 (L60), Lisboa 68 (NHV), Malawi e Ba71V.....	16
Figura 2. Características morfológicas dos processos de morte celular apoptótica e necrótica.....	20
Figura 3. Representação esquemática das principais vias de sinalização apoptótica.	23
Figura 4. Vias de modulação de apoptose induzidas através do TNF-R1.....	31
Figura 5. Genes indutíveis por NFκB inibidores da via JNK.	32
Figura 6. Observação da morfologia de macrófagos em cultura através de microscopia óptica: células controlo não infectadas (C), efeito citopático e hemadsorção em infecção com L60, e efeito citopático em infecção com NHV.	45
Figura 7. Representação esquemática da metodologia ELISA “sandwich” para quantificação de oligonucleossomas de DNA.	50
Figura 8. Electroforese de produtos de amplificação em DNA de L60 (L) e NHV (N), correspondentes a regiões genómicas contendo os genes 5-HL (A) e 4-CL (B).....	55
Figura 9. Mapa circular do vector utilizado para clonagem e posterior sequenciação dos genes virais 4-CL e 5-HL.	56
Figura 10. Eficácia do tratamento com DNase na eliminação de DNA contaminante em amostras de RNA para síntese de cDNA.	58
Figura 11. Electroforese de RNA total de macrófagos não infectados e infectados com L60 e NHV a vários tempos PI.	67
Figura 12. Representação esquemática da obtenção de sondas de RNA por transcrição <i>in vitro</i> a partir de plasmídeo recombinante pGEM-T com sequências promotoras das RNA polimerases SP6 e T7.....	68
Figura 13. Sonda de RNA utilizada para detecção de mRNA de 4-CL por Northern blot.	69
Figura 14. Sonda de DNA marcada com biotina para detecção de mRNA de 4-CL em Northern blot.....	71
Figura 15. Títulos virais no sobrenadante de culturas de macrófagos de suíno após 18h de infecção com MOI 5 de L60 e NHV.	77
Figura 16. Quantificação de macrófagos infectados em culturas inoculadas com L60 e NHV, a tempos precoce (8h) e tardio (18h) de infecção com MOI 3.	78

Figura 17. Determinação da viabilidade celular em infecção com L60 e NHV a vários tempos pós-infecção (PI).....	80
Figura 18. Visualização do padrão de migração em electroforese de DNA extraído de culturas de macrófagos a diferentes tempos de infecção (L60 e NHV) ou cultura (C).	82
Figura 19. Avaliação de apoptose através da observação da morfologia nuclear em culturas infectadas com L60 e NHV e controlo não infectadas (C) a tempo precoce (8h) e tardio (18h) da infecção.....	84
Figura 20. Quantificação de apoptose em culturas infectadas com L60 e NHV, às 8h e 18h PI, por comparação com culturas controlo não infectadas (C) realizadas em paralelo.....	86
Figura 21. Efeito do inibidor de caspases zVAD-fmk nos níveis de actividade de caspase-3 em macrófagos de suíno tratados para indução de apoptose com CHX.	87
Figura 22. Efeito do inibidor de caspases zVAD-fmk, nos níveis de actividade de caspase-3 em macrófagos de suíno não infectados ou infectados com L60 e NHV durante 18h.....	88
Figura 23. Efeito da inibição de caspases, por zVAD-fmk durante 18h de cultura (C) ou infecção (L60 e NHV), na FIN de DNA.	89
Figura 24. Efeito da inibição de caspases por zVAD-fmk durante 18h e 40h de cultura (C) ou infecção com L60 e NHV, na viabilidade celular.	90
Figura 25. Avaliação de apoptose através da morfologia nuclear, em subpopulações de células infectadas e não infectadas, de culturas inoculadas com L60 e NHV.	92
Figura 26. Padrão de migração em electroforese de DNA extraído de culturas de macrófagos tratados com TNF- α a diferentes concentrações e tempos de incubação.	96
Figura 27. Padrão de migração em electroforese de DNA extraído de culturas de macrófagos após 16h de incubação com: 1- meio de cultura; 2- meio de cultura com 200 ng/ml TNF- α ; 3- 10 μ g/ml CHX; 4- 100 ng/ml TNF- α + 5 μ g/ml CHX.	97
Figura 28. Apoptose em culturas de macrófagos tratadas com 10 μ g/ml CHX.	98
Figura 29. Apoptose em culturas de macrófagos tratados com STS.....	100
Figura 30. Apoptose em culturas de macrófagos com privação de soro fetal bovino (SFB) após 8 e 18h de cultura.	102
Figura 31. Quantificação de apoptose após tratamento com CHX em culturas infectadas com L60 e NHV, por comparação com culturas não infectadas tratadas do mesmo modo.	105
Figura 32. Viabilidade celular em culturas não infectadas e infectadas com L60 e NHV após tratamento com CHX.	106

Figura 33. Quantificação de apoptose após tratamento com STS em culturas infectadas com L60 e NHV, por comparação com culturas não infectadas tratadas do mesmo modo.....	107
Figura 34. Viabilidade celular em culturas não infectadas e infectadas com L60 e NHV após tratamento com STS.	108
Figura 35. Quantificação de apoptose após tratamento de privação de soro, em culturas infectadas com L60 e NHV, por comparação com culturas não infectadas tratadas do mesmo modo.....	109
Figura 36. Visualização gráfica da região genómica do isolado Ba71V compreendida entre os nucleótidos 27300 e 37880, onde se localizam os genes <i>4-CL</i> (A224L) e <i>5-HL</i> (A179L).	110
Figura 37. Alinhamento das sequências consenso obtidas por sequenciação de <i>5-HL</i> em L60 e NHV (cons5HL_L60 e cons5HL_NHV), com as sequências nucleotídicas correspondentes conhecidas de isolados de VPSA de diferentes origens.....	112
Figura 38. Alinhamento das sequências consenso obtidas por sequenciação de <i>4-CL</i> em L60 e NHV (cons4CL_L60 e cons4CL_NHV), com sequências correspondentes conhecidas de isolados de VPSA de diferentes origens.	114
Figura 39. Visualização por electroforese do resultado de PCR sobre DNA e cDNA de macrófagos de suíno, com oligómeros desenhados para quantificação da expressão de genes constitutivos em qPCR.	119
Figura 40. Visualização em electroforese de produtos de amplificação por PCR, a partir de cDNA, com os oligómeros GAP, HPR, 5HL e 4CL, para utilização como DNA standard em qPCR.	119
Figura 41. Rectas padrão construídas pelo software do aparelho de qPCR, resultantes da amplificação, nas condições optimizadas, de DNA standard com cada um dos oligómeros: A – HPR, B – GAP, C – 5HL, D – 4CL.	121
Figura 42. Curvas de dissociação dos produtos amplificados por qPCR a partir de DNA standard, nas condições optimizadas de amplificação com os oligómeros: A – HPR; B – GAP; C – 5HL; D – 4CL.....	122
Figura 43. Electroforese de produtos de amplificação por qPCR sobre diluições seriadas de DNA standard, nas condições optimizadas, com os diferentes oligómeros HPR, GAP, 5HL e 4CL.....	123
Figura 44. Curvas padrão resultantes da amplificação por qPCR, nas condições optimizadas, de diluições seriadas 1:2 de cDNA, com cada um dos oligómeros: A – HPR, B – GAP, C – 5HL, D – 4CL.....	124
Figura 45. Curvas de dissociação dos produtos amplificados por qPCR a partir de cDNA, nas condições optimizadas de amplificação com DNA standard com os oligómeros: A – HPR; B – GAP; C – 5HL; D – 4CL.....	125

Figura 46. Electroforese de produtos de amplificação por qPCR sobre diluições seriadas de cDNA, nas condições optimizadas para DNA standard, com os diferentes oligómeros HPR, GAP, 5HL e 4CL.	126
Figura 47. Quantificação por qPCR da expressão dos genes constitutivos <i>GAPDH</i> e <i>HPRT</i> , em amostras de cDNA de células controlo não infectadas (C) e infectadas com L60 ou NHV, a diferentes tempos pós-infecção ou cultura.	128
Figura 48. Expressão em mRNA dos genes virais <i>5-HL</i> (A) e <i>4-CL</i> (B) a diferentes horas pós-infecção (PI) com L60 e NHV.....	130
Figura 49. Autorradiografia de Northern blot para detecção de transcritos de <i>4-CL</i> a diferentes tempos pós-infecção com L60 e NHV, através de uma sonda de RNA complementar marcada com biotina.....	131
Figura 50. Autorradiografia de Northern blot para detecção de transcritos de <i>4-CL</i> às 16h de infecção com L60 e NHV, através de uma sonda de DNA específica para a sequência codificante marcada com biotina.	132
Figura 51. Representação esquemática dos locais descritos para iniciação e terminação da transcrição de <i>4-CL/A224L</i>	133
Figura 52. Autorradiografia de Western blot para análise da expressão da proteína viral 4-CL em macrófagos infectados com L60 (L) ou NHV (N) a diferentes tempos de infecção.	134
Figura 53. Organização relativa das “ORFs” que flanqueiam <i>A224L</i> (<i>4-CL</i>) ao longo do genoma de Ba71V.	150

Abreviaturas

ATP	trifosfato de adenosina
Ara C	citossina β -C-arabinofuranosido
Ba71V	isolado de VPSA Badajoz71 adaptado a células Vero
Bcl-2	proteína que dá o nome à família de proteínas reguladoras de apoptose, do inglês “B cell lymphoma-2”
BIR	do inglês “baculoviral IAP repeat”
BLAST	do inglês “Basic Local Alignment Search Tool”
CBMSO	Centro de Biologia Molecular Severo Ochoa
CD2	receptor celular de linfócitos T
CD2v	homólogo viral de VPSA do receptor celular de linfócitos T
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementar
CHX	cicloheximida
DAPI	fluorocromo, 4',6-Diamidino-2-fenilindol dihidroclorato
DEPC	dietil pirocarbonato
DEVD-pNA	substrato de caspase-3, N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp p-nitroanilide
DNA	ácido desoxirribonucleico, do inglês “deoxyribonucleic acid”
DNase	desoxirribonuclease
dNTP	desoxirribonucleótido trifosfato
DR	isolado de VPSA da República Dominicana
DTT	ditiotreitól
E70	isolado de VPSA Espanha 70
E75	isolado de VPSA Espanha 75
ECP	efeito citopático
EDTA	ácido etilenodiaminotetraacético
ELISA	do inglês “enzyme-linked immunosorbent assay”
EMPRES	Sistema de Prevenção de Emergência para Doenças Transfronteiriças de Animais e Plantas, do inglês “Emergency Prevention System for Transboundary Animal and Plant Pests and Diseases”
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura, do inglês “Food and Agriculture Organization”
FIN	fragmentação internucleossômica
FITC	isotiocianato de fluoresceína
FMG	família multigénica
FMV	Faculdade de Medicina Veterinária
HAD	hemadsorção
HEPES	ácido N-2-hidroxietil piperazina-N'-2-etano sulfónico
IAP	família de proteínas inibidoras de apoptose, do inglês “inhibitor of apoptosis protein”
IFD	imunofluorescência directa
IGC	Instituto Gulbenkian de Ciência
IκB	família de proteínas inibidoras específicas de NF κ B
IL	interleucina
INF	interferão
IPTG	isopropil-1-tio- β -galactósido
kDa	quiloDalton
kpb	quilopares de bases
LDI	Laboratório de Doenças Infecciosas

LB	meio Luria Bertani
LCT	linfócitos citotóxicos T
LNIV	Laboratório Nacional de Investigação Veterinária
L60	isolado VPSA Lisboa60
MHC	complexo maior de histocompatibilidade, do inglês “major histocompatibility complex”
min	minutos
MOI	multiplicidade de infecção, do inglês “multiplicity of infection”
mRNA	ácido ribonucleico mensageiro, do inglês “messenger ribonucleic acid”
MTS	composto de tetrazólio: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio
NCBI	do inglês “National Center for Biotechnology Information”, Estados Unidos da América
NFκB	do inglês “nuclear factor kappa B”
NHV	isolado de VPSA NH/P68, não hemadsorvente, do inglês “non-haemadsorbent virus”
NK	do inglês “natural killer”
nm	namómetro
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal, do francês “Office International des Epizooties”
ORF	grelha de leitura aberta, do inglês “open reading frame”
OUR	isolado de VPSA de Ourique, Portugal
PARP	do inglês “poly-ADP ribose polymerase”
pb	pares de bases
PBS	solução salina tamponada de fosfatos de sódio, do inglês “phosphate-buffered saline”
PCR	reação polimerásica em cadeia, do inglês “polymerase chain reaction”
PI	pós-infecção
PMA	do inglês “phorbol myristate acetate”
Pr4	isolado de VPSA Pretória 4
PS	privação de soro
PSA	peste suína Africana
p/v	peso/volume
qPCR	PCR quantitativo ou em tempo real
RCF	do inglês “relative centrifugal force”
RNA	ácido ribonucleico, do inglês “ribonucleic acid”
rpm	rotações por minuto
RPMI	meio Roswell Park Memorial Institute
SDS	dodecilsulfato de sódio, do inglês “sodium dodecyl sulphate”
seg	segundos
SFB	soro fetal de bovino
SLA	complexo maior de histocompatibilidade do suíno, do inglês “swine leukocyte antigen”
SSBH	solução salina balanceada de Hanks
STS	staurosporina
TAE	solução tampão de Tris-acetato e EDTA
Taq	DNA polimerase de <i>Thermophilus aquaticus</i>
TBS	solução tampão de Tris salino (com NaCl)
TCID₅₀	dose infecciosa em culturas de tecidos, do inglês: “Tissue culture infectious dose 50”

TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilenodiamina
TH	linfócito T “helper”
TNF-α	factor necrosante tumoral alfa, do inglês “tumor necrosis factor-alpha”
TRAF	factor associado ao receptor de TNF, do inglês “TNF receptor associated factor”
Tris	tris (hidroximetil) aminometano
Vero	células de linha contínua de rim de macaco verde africano
VP32	proteína de VPSA de 32 kDa
VP72	proteína de VPSA de 72 kDa
VPSA	vírus da peste suína africana
v/v	volume/volume
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo
zVAD-fmk	benziloxycarbonil-val-ala-asg (OMe) fluorometilacetona

1. INTRODUÇÃO

1.1. O vírus da peste suína africana (VPSA)

O VPSA é um vírus de DNA classificado como membro único da família *Asfarviridae* (“African swine fever and related viruses”) e do género *Asfivirus* (Dixon *et al.*, 2000). Inicialmente foi classificado na família *Iridoviridae*, cujos membros infectam insectos, anfíbios e peixes, devido a semelhanças morfológicas e à localização citoplasmática do genoma viral nas células hospedeiras. Mais tarde veio a verificar-se uma maior proximidade com a família *Poxviridae*, devido à estrutura e estratégia de replicação do seu DNA, e à presença na partícula viral de enzimas para síntese e modificação de RNA viral precoce (Murphy *et al.*, 1999), justificando-se assim a criação de uma nova família para o VPSA. É o único vírus de DNA classificado como arbovírus (“arthropod borne virus”) (Wardley *et al.*, 1983, Wilkinson *et al.*, 1977) e tem a capacidade de processamento proteolítico de poliproteínas, uma característica observada num número muito limitado de vírus de DNA (Simon-Mateo *et al.*, 1997, Simon-Mateo *et al.*, 1993).

O VPSA é o agente etiológico da peste suína Africana (PSA), uma doença altamente contagiosa e mortal para o suíno doméstico, que está incluída na lista de doenças transmissíveis do “Office international des Epizooties” (OIE, 2005). A PSA é também classificada como doença animal transfronteiriça (“transboundary animal disease” - TAD), definida pela FAO como doença com significativa importância económica, comercial e alimentar para um número considerável de países, que se pode disseminar de um país a outro e atingir proporções epidémicas cujo controlo requer cooperação internacional (FAO, 2001).

O VPSA infecta membros da família *Suidae* e diferentes espécies de argasídeos do género *Ornithodoros* (Plowright *et al.*, 1994), que transmitem a doença e que em África são os seus reservatórios. Desde que foi reconhecida em África após ocorrência de surtos no Quénia entre 1910 e 1915 que afectaram suínos domésticos europeus ali introduzidos (Montgomery, 1921), a PSA surgiu pela primeira vez na Europa em 1957, em Portugal (Manso Ribeiro *et al.*, 1958). Nas décadas de 60 e 70 alastrou a vários outros países europeus como Espanha, França, Itália, Malta e ainda a Cuba, Brasil, República Dominicana e Haiti (Revisto por Costa, 1990, Sanchez Botija, 1982, Wilkinson, 1986). Em 1985 ocorreu ainda um

surto da doença na Bélgica (Biront *et al.*, 1987) e em 1986 na Holanda (Terpstra & Wensvoort, 1986).

Após um silêncio epizootico de seis anos desde a declaração de erradicação da doença em Portugal em 1993, ocorreu um surto esporádico no sul do Alentejo em 1999, com início numa exploração rural de suínos com história prévia de PSA e que na altura se encontrava infestada por *Ornithodoros erraticus* (Basto *et al.*, 2006). A doença permanece ainda hoje de forma enzoótica na África sub-Saariana e na ilha da Sardenha em Itália. Recentemente, em 2007, foi relatado um novo foco da doença na Geórgia (OIE, 2007a), que entretanto se dispersou para outros países na região do Cáucaso, como a Arménia (FAO, 2007), Rússia (OIE, 2007b) e Azerbaijão (OIE, 2008).

Desde que a PSA foi identificada, numerosos trabalhos de investigação têm vindo a esclarecer diferentes aspectos da biologia do agente etiológico bem como mecanismos da sua patogenia. No entanto, todos os esforços para a obtenção de uma vacina eficaz e segura se têm revelado infrutíferos, pelo que ainda hoje o controlo da doença se baseia exclusivamente na aplicação de rigorosas medidas de profilaxia sanitária. O abate compulsivo dos animais infectados e dos que contactam com a doença, bem como as indemnizações a produtores, vazios sanitários e interdição à exportação têm custos elevadíssimos para a economia dos países infectados. Em África, um continente em que existe grande escassez de alimento para a maioria da população, a PSA tem um impacto particularmente negativo, constituindo um dos principais obstáculos ao desenvolvimento da produção suinícola (FAO, 2000).

1.2. Patogenia da PSA

O VPSA é um vírus bem adaptado aos seus hospedeiros naturais em África nomeadamente os suídeos silváticos *Phacochoerus aethiopicus* e *Potamochoerus porcus* e o argasídeo *Ornithodoros moubata*, provocando nestes infecções inaparentes que podem persistir durante meses ou anos. No suíno doméstico por outro lado, a infecção pode evoluir sob diversas formas clínicas que variam de hiper agudas a crónicas ou mesmo inaparentes (Plowright *et al.*, 1994). Em África a PSA manifesta-se geralmente sob formas agudas, resultando em elevada mortalidade para o suíno doméstico, mas noutras áreas geográficas fora desta e ao longo do

tempo de ocorrência da doença surgiram infecções crônicas ou sub-clínicas, frequentes nomeadamente na Europa antes da erradicação da PSA (Hamdy & Dardiri, 1984, Hess, 1981). Este facto poderá indicar a persistência de isolados virais menos virulentos na natureza e/ou uma evolução no sentido da adaptação ao hospedeiro e estabelecimento de infecções persistentes. Os animais que recuperam deste tipo de infecções podem permanecer infectados por longos períodos (Leitao *et al.*, 2001, Villeda *et al.*, 1993b) e constituir um reservatório e fonte de infecção do vírus. Foi também sugerido que o decréscimo na virulência do VPSA fora de África poderá ter resultado da utilização em larga escala, na década de 60, de estirpes vacinais atenuadas por passagem em cultura celular (Hess, 1981).

A transmissão da PSA entre animais ocorre normalmente pela via oral-nasal, sendo a transmissão por via aérea improvável excepto em explorações intensivas (Wilkinson *et al.*, 1977). Em infecções agudas com isolados africanos, o VPSA é excretado por via naso-faríngea 24 a 48 horas antes do surgimento de febre, embora a quantidade de vírus necessária para que ocorra infecção em animais de contacto seja atingida normalmente ao segundo dia daquele sinal (Greig & Plowright, 1970, Montgomery, 1921). Todas as secreções nasais, orais, faríngeas, conjuntivas e genitais, bem como urina e fezes, contêm vírus, apesar de as secreções nasais e orais serem as mais importantes em termos epidemiológicos. A transmissão vertical da PSA nunca foi claramente demonstrada, embora estejam descritos abortos em fêmeas com infecção aguda (Schlafer & Mebus, 1984).

Após infecção por via oral-nasal, o VPSA é detectado inicialmente nas tonsilas faríngeas e linfonodos mandibulares, ou mais raramente em linfonodos brônquicos e gástricos (Greig, 1972, Wilkinson, 1989, Wilkinson & Donaldson, 1977). Posteriormente a disseminação do vírus prossegue via circulação sanguínea, predominantemente através de associação a eritrócitos no caso dos vírus hemadsorventes, a larga maioria dos que se conhecem, podendo estes transportar até 90% do vírus em circulação, embora também se observe associação a leucócitos (Colgrove *et al.*, 1969, Plowright *et al.*, 1968, Vinuela, 1985, Wardley & Wilkinson, 1977). Em situação de doença aguda são atingidos frequentemente níveis de virémia de 10^8 HAD₅₀/ml (Borca *et al.*, 1998, Genovesi *et al.*, 1988, Villeda *et al.*, 1993b).

As principais células alvo da replicação do VPSA são células da linha monócito-macrófago do suíno (Colgrove, 1968, Colgrove *et al.*, 1969, Heuschele, 1967,

Heuschele *et al.*, 1966, Malmquist & Hay, 1960b) embora existam descrições de replicação noutros tipos celulares como células endoteliais, mesangiais do glomérulo, epiteliais dos tubos colectores renais, pericitos, hepatócitos, neutrófilos e megacariócitos (Carrasco *et al.*, 1996b, Colgrove, 1968, Colgrove *et al.*, 1969, Gomez-Villamandos *et al.*, 1995a, Gomez-Villamandos *et al.*, 1995b, Gomez-Villamandos *et al.*, 1995c, Gomez-Villamandos *et al.*, 1995d, Sierra *et al.*, 1987, Sierra *et al.*, 1989, Vallee *et al.*, 2001, Wilkinson & Wardley, 1978). No entanto, em algumas destas células a infecção foi observada apenas em fases adiantadas da doença, sugerindo que seja secundária à infecção de macrófagos.

Uma das principais características da PSA traduz-se por uma marcada linfopénia, resultante da morte em larga escala de linfócitos por apoptose, apesar de não ocorrer replicação viral nestas células. Diferentes autores sugerem que a indução de apoptose em linfócitos será devida à libertação de factores apoptogénicos das células infectadas (Carrasco *et al.*, 1996a, Gomez-Villamandos *et al.*, 1995a, Oura *et al.*, 1998, Ramiro-Ibanez *et al.*, 1996, Salguero *et al.*, 2005). Outra característica marcante da forma aguda da doença é a ocorrência de hemorragias generalizadas em vários órgãos, o que é atribuído pela maioria dos autores à coagulação intravascular disseminada que se desenvolve na fase final da doença e que culmina em morte devida a choque e/ou exsudação de fluidos nos pulmões (Villeda *et al.*, 1993a, Villeda *et al.*, 1993b).

1.3. Biologia do VPSA

1.3.1. O virião

As partículas virais têm grandes dimensões, com 175 a 215 nm de diâmetro, e possuem uma simetria icosaédrica e um envelope adquirido à saída da célula por gemulação. O virião é constituído por um nucleóide central contendo o DNA, envolvido por uma dupla membrana lipídica derivada do retículo endoplasmático formando um envelope interno. Externamente a este existe uma cápside proteica, responsável pela forma icosaédrica do vírus, e ainda um envelope externo derivado da membrana celular (Andres *et al.*, 1998, Andres *et al.*, 1997, Breese & De Boer, 1966, Carrascosa *et al.*, 1984). O genoma viral consiste numa molécula de DNA de cadeia dupla de 170 a 190 Kb dependendo das estirpes (Enjuanes *et al.*, 1976,

Plowright *et al.*, 1966), com as extremidades de cada cadeia ligadas formando estruturas em ansa de cadeia simples (gancho de cabelo) (Ortin *et al.*, 1979). Os extremos do genoma viral contêm repetições terminais invertidas (de la Vega *et al.*, 1994, Sogo *et al.*, 1984), de forma semelhante aos poxvírus.

No genoma do VPSA podem ser reconhecidas 3 regiões principais: uma região central conservada (RCC) na generalidade das estirpes isoladas na Europa e América, de aproximadamente 125 kpb, que em estirpes isoladas em África possui algumas variações, e duas regiões flanqueando esta, as regiões variável esquerda (RVE) e direita (RVD). Estas apresentam dimensões diferentes dependendo do isolado viral e é onde se localizam as diferenças genómicas mais significativas entre isolados de VPSA, resultando de deleções, inserções ou duplicações (Blasco *et al.*, 1989a). Nestas regiões variáveis estão localizados os genes das chamadas famílias multigénicas (FMG), com cinco famílias descritas e denominadas segundo o número médio de aminoácidos dos seus produtos: FMG 100, 110, 300, 360 e 505/530 (Aguero *et al.*, 1990, Almendral *et al.*, 1990, de la Vega *et al.*, 1990, Dixon *et al.*, 1993, Gonzalez *et al.*, 1990, Rodriguez *et al.*, 1994b, Yozawa *et al.*, 1994). As proteínas das FMG parecem ser importantes no complexo ciclo de vida do VPSA. Nomeadamente, genes das FMG 360 e 530 parecem ser essenciais para a replicação viral em macrófagos e para a sobrevivência destes após infecção (Zsak *et al.*, 2001), estando também implicados em virulência para o suíno (Neilan *et al.*, 2002). Por outro lado, alguns genes das FMG 110, 360 e 530 são perdidos quando o vírus é adaptado ao crescimento em células de linha contínua (Almendral *et al.*, 1990, de la Vega *et al.*, 1990, Pires *et al.*, 1997). Em contraste, vírus isolados de carraças mostram pouca variação genética nestas regiões variáveis do genoma, o que parece indicar que estas sequências são importantes para o ciclo de vida neste hospedeiro (Dixon & Wilkinson, 1988).

1.3.2. O ciclo infeccioso do VPSA nas células hospedeiras: ligação, internalização, replicação e montagem das partículas virais

Estudos morfológicos através de microscopia electrónica mostraram que o VPSA penetra em células susceptíveis, Vero e macrófagos de suíno, através de endocitose mediada por receptores celulares de natureza proteica (Alcami *et al.*, 1989, Alcami *et al.*, 1990, Galindo *et al.*, 1997). Neste processo não são utilizados receptores Fc pelo

que a entrada do VPSA nas células hospedeiras não parece ser mediada por ligação a anticorpos (Alcami & Vinuela, 1991), facto que conduziu à pesquisa de proteínas virais responsáveis pela ligação a receptores específicos à superfície celular. Dos cerca de 100 polipéptidos induzidos pelo VPSA em macrófagos, cerca de 40 são incorporados na partícula viral (Carrascosa *et al.*, 1985, Esteves *et al.*, 1986). O tratamento de partículas virais purificadas para libertação de proteínas de superfície permitiu verificar que uma destas proteínas se liga a células susceptíveis, a p12 (Carrascosa *et al.*, 1991). Esta competiu com a ligação de VPSA às células susceptíveis e reduziu mesmo a sua infectividade (Angulo *et al.*, 1993, Carrascosa *et al.*, 1991). No entanto, a imunização de animais com p12 por si só revelou-se ineficaz na indução de protecção (Carrascosa *et al.*, 1995) e na indução de anticorpos neutralizantes (Angulo *et al.*, 1993, Gomez-Puertas *et al.*, 1996).

A análise imunológica de soros de animais convalescentes de infecção com VPSA revelou que as proteínas virais estruturais p72, p30 e p54 estão entre as mais relevantes na resposta humoral à infecção (Afonso *et al.*, 1992, Alcaraz *et al.*, 1995, Gomez-Puertas *et al.*, 1996). A p72 localiza-se na cápside viral e é a principal proteína viral estrutural, constituindo cerca de 32% da massa proteica total do virião (Lopez-Otin *et al.*, 1990). A p30 tem localização na membrana das células hospedeiras infectadas, podendo ser excretada para o meio e ainda incorporada no virião (Afonso *et al.*, 1992, Gomez-Puertas *et al.*, 1996). A proteína p54 encontra-se também na partícula viral ao nível do envelope interno (Rodriguez *et al.*, 1994a). Verificou-se que anticorpos contra as proteínas p72 e p54 inibem a ligação do VPSA às células hospedeiras. Utilizando-se anticorpos contra p30, a ligação ocorre mas o passo seguinte de internalização do virião é inibido (Gomez-Puertas *et al.*, 1996). Assim, além de p12, também p72 e p54 parecem mediar a ligação do vírus à célula hospedeira e p30 mediará a fase seguinte de internalização. A importância relativa destas diferentes proteínas ou a sua interacção/cooperação, se existente, para o processo de entrada do vírus na célula é no entanto ainda desconhecida. Adicionalmente, diferentes autores obtiveram resultados discordantes relativamente à capacidade destas proteínas para induzirem protecção em suínos com elas imunizados. Embora se tenha observado protecção parcial através de uma imunização prévia com ambas as proteínas p30 e p54 em animais infectados com um isolado virulento europeu (E75) (Gomez-Puertas *et al.*, 1998), a imunização conjunta com p30, p54 e p72 não protegeu os animais de infecção com um isolado

virulento africano (Pr4) (Neilan *et al.*, 2004). Estes estudos indicam que factores adicionais, dependendo da estirpe viral, parecem condicionar a eficácia da resposta imunitária contra estas proteínas envolvidas na entrada do vírus na célula.

Após formação de vesículas de endocitose contendo o vírus, este é libertado no citoplasma através da fusão do envelope viral com a membrana da vesícula de endocitose (Valdeira *et al.*, 1998). Os nucleoides virais são então transportados ao longo de microtúbulos para uma região perinuclear onde se irá formar a fábrica viral, zona de síntese de DNA e morfogénese viral (Nunes *et al.*, 1975, Rojo *et al.*, 1999). Este transporte ao longo do citoplasma parece ser também mediado pela proteína p54, através da sua interacção com a cadeia leve LC8 do complexo motor de dineína microtubular (Alonso *et al.*, 2001).

Após descapsidação do vírus inicia-se a expressão de genes virais precoces. Esta expressão ocorre antes da replicação do genoma viral, através de enzimas e factores presentes nos viriões, sendo produzidas nesta fase as proteínas necessárias durante o ciclo replicativo. A replicação do DNA viral inicia-se por volta das 6h pós-infecção e utiliza uma DNA polimerase codificada pelo vírus, formando-se intermediários concatenados que são depois resolvidos em genomas unitários, num mecanismo semelhante ao dos poxvírus (Vinuela, 1985). A replicação do DNA do VPSA regula a expressão dos seus genes, dividindo a sua transcrição em precoce e tardia. Verifica-se no entanto a expressão contínua ao longo da infecção de alguns genes precoces (Carvalho & Rodrigues-Pousada, 1986, Martins *et al.*, 1994). Os mRNAs de VPSA são estruturalmente semelhantes aos dos eucariotas, contendo terminais 5' "capped" e caudas poliadeniladas na extremidade 3' (Salas *et al.*, 1981). Entre os transcritos tardios que surgem após replicação do DNA encontram-se os que darão origem a proteínas estruturais que formam a partícula viral.

Aproximadamente a partir das 8 horas de infecção, é visível através de microscopia electrónica a formação da fábrica viral, na maioria dos casos única, próxima ao núcleo da célula hospedeira e contendo partículas virais em várias fases de morfogénese (Brookes *et al.*, 1996). Esta fábrica assemelha-se estruturalmente a formações chamadas "aggresomes", que surgem em células sujeitas a stress induzido pela acumulação de proteínas "misfolded" e "unassembled", e que parecem servir o propósito de sequestrar proteínas anómalas evitando a sua toxicidade para a célula (Johnston *et al.*, 1998). Tanto as fábricas virais como os "aggresomes" são

envolvidos por filamentos de vimentina e requerem o sistema microtubular da célula para se formarem (Heath *et al.*, 2001, Stefanovic *et al.*, 2005). Parece assim que o vírus utiliza esta estratégia para concentrar no local da fábrica viral as proteínas estruturais, facilitando a sua morfogénese (Heath *et al.*, 2001). Observa-se ainda uma migração massiva de mitocôndrias para a vizinhança da fábrica viral, fornecendo provavelmente a energia necessária ao processo de morfogénese (Rojo *et al.*, 1998). Finalmente os viriões são transportados através de microtúbulos para a membrana plasmática, da qual gemulam adquirindo um envelope externo (de Matos & Carvalho, 1993). A gemulação pode ser observada a partir das 10 horas pós-infecção, atingindo níveis máximos entre as 18-24 horas (Brookes *et al.*, 1996).

1.4. Genes de VPSA: modulação de funções celulares e evasão viral ao sistema imunitário

A sequenciação do genoma do isolado de VPSA Ba71V, adaptado a células de linha Vero, permitiu um avanço considerável para o conhecimento da biologia viral (Yanez *et al.*, 1995). Permitiu identificar a presença de pelo menos 151 ORFs principais, codificando para proteínas envolvidas nas mais variadas funções (Yañez *et al.*, 1995) como por exemplo:

- Metabolismo de ácidos nucleicos: síntese de precursores de desoxiribonucleótidos para replicação de DNA – timidina cinase (*K196R*), timidilato cinase (*A240L*), ribonucleótido redutase (subunidades pequena e grande, *F334L* e *F778L*) e desoxiuridina trifosfatase (*E165R*);
- Modificação da estrutura dos ácidos nucleicos: proteínas com motivos conservados da super família II de helicases (*A859L*, *F1055L*, *B962L*, *D1133L*, *Q706L* e *QP509L*) e uma topoisomerase II (*P1192R*);
- Replicação de DNA: polimerase de DNA semelhante à DNA polimerase- α (*G1207R*), DNA ligase dependente de ATP (*NP419L*), factor de processividade putativo da DNA polimerase viral (*E301R*);
- Transcrição: várias subunidades de RNA polimerase dependente de DNA (nomeadamente *NP1450L* e *EP1242L* homólogas das subunidades maiores da RNA polimerase II de eucariotas e da RNA polimerase do vírus *vaccinia*), proteína semelhante ao factor de transcrição SII (*I243L*) e guanililo transferase (*NP868R*);

- Prevenção e reparação de danos no DNA: prevenção de danos resultantes de oxidação, nomeadamente por espécies reactivas de oxigénio abundantes em monócitos e macrófagos (*D250R*); sistema de reparação do DNA com base em excisão de bases anómalas – endonuclease apurínica/apirimidínica (AP) de classe II putativa (*E296R*), proteína semelhante a DNA polimerases da família X (*O174L*);
- Modificação de proteínas: enzima de conjugação de ubiquitina de classe II (*I215*), proteína cinase (*R298L*), proteína contendo motivos conservados de preniltransferases (putativamente associada a membranas) (*B318L*);
- Associação putativa a membranas e secreção: proteína homóloga de CD2 (molécula de adesão presente na membrana citoplasmática de linfócitos T e células NK) (*EP402R*), proteína contendo uma região homóloga à lectina animal do tipo C (*EP153R*), proteína pertencente à família multigénica 110 (*L270L*) e algumas das proteínas estruturais do virião, p12, p22, p54 e p17;

Muitas das proteínas virais possuem homologia com proteínas celulares, fornecendo ao VPSA ferramentas para controlar várias funções na célula hospedeira, nomeadamente relacionadas com vias imunomoduladoras e de morte celular, pelo que têm sido alvo de estudos mais aprofundados. Este é o caso da proteína viral homóloga de CD2 (CD2v), necessária para a hemadsorção de eritrócitos à superfície de células infectadas em cultura (Rodriguez *et al.*, 1993) e também *in vivo* (Sierra *et al.*, 1991), que é codificada pela ORF *EP402R/8-DR* (Borca *et al.*, 1994, Rodriguez *et al.*, 1993). A proteína CD2 celular é expressa à superfície da membrana citoplasmática de células do sistema imunitário, como linfócitos T e células NK de homem, linfócitos B de ratinho e macrófagos esplénicos de rato e de ovelha (Bierer & Burakoff, 1989, Driscoll *et al.*, 1991). Tem sido implicada nomeadamente na estabilização da interacção entre linfócitos T e células apresentadoras de antígeno, com consequente activação dos linfócitos T (Moingeon *et al.*, 1989). O domínio extracelular de CD2v partilha com a CD2 celular semelhanças significativas ao nível da sequência aminoacídica, ao contrário do seu domínio citoplasmático em que não foram encontradas semelhanças óbvias (Dixon *et al.*, 2004). A CD2v é incorporada na membrana externa do virião, provavelmente durante gemulação através da membrana celular, e a sua ligação a eritrócitos facilitará a disseminação viral no organismo. Apesar de não ser essencial para a infecção ou replicação viral, verificou-se que a deleção de CD2v provoca um atraso na disseminação do vírus para os linfonodos do animal infectado e no

desenvolvimento da doença e da virémia, embora no final a taxa de mortalidade seja semelhante à provocada por vírus parental (Borca *et al.*, 1998). Os mesmos autores observaram ainda um papel imunossupressor de CD2v durante infecção de células mononucleares de sangue periférico de suíno. A presença deste gene no genoma viral foi necessária para que ocorresse uma clara inibição da proliferação linfocitária em resposta a mitogénios. Foi também sugerido que o fenómeno de hemadsorção à superfície das células infectadas poderá inibir o contacto e reconhecimento da infecção por outras células imunitárias do suíno (Yanez *et al.*, 1995).

Estudos mais recentes mostraram que a maioria da proteína CD2v se encontra associada a membranas de organelos intracelulares derivados do complexo de Golgi, e que a sua porção citoplasmática interage com a proteína SH3P7 de ligação a actina do hospedeiro (Kay-Jackson *et al.*, 2004). A SH3P7 está implicada no tráfego de proteínas através do complexo de Golgi, transdução de sinais (nomeadamente modulação da via de sinalização JNK1) e endocitose (Fucini *et al.*, 2002, Mise-Omata *et al.*, 2003, Warren *et al.*, 2002). A ligação de Cd2v a SH3P7 constitui potencialmente um mecanismo de controlo das proteínas secretadas ou expostas à superfície da célula infectada, podendo modular a sinalização a outras células como linfócitos (Dixon *et al.*, 2004). A apoiar esta teoria existem relatos de que a infecção por VPSA interfere com a rede Trans-Golgi de transporte e secreção celular, verificando-se nomeadamente um atraso no transporte de proteínas para a membrana plasmática (McCrossan *et al.*, 2001, Netherton *et al.*, 2006). Mais especificamente, os autores referem que este processo poderá estar na base da inibição da apresentação de moléculas MHC classe I à superfície celular, observada em macrófagos infectados por VPSA virulento (Netherton *et al.*, 2006), podendo assim interferir com a apresentação antigénica, e evitar o reconhecimento e lise das células hospedeiras infectadas por LCTs.

Outra proteína viral com potencial poder imunossupressor acerca da qual se têm realizado vários estudos é a A238L/5EL, devido à sua homologia com um grupo de proteínas inibidoras da família de factores de transcrição NFκB, as IκB (Yanez *et al.*, 1995). A vantagem da inibição de NFκB para o vírus parece residir no facto de estes factores de transcrição induzirem a activação transcricional de genes imunomoduladores, codificando nomeadamente para citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, responsáveis pelo recrutamento de células inflamatórias para locais de infecção (Ghosh *et al.*, 1998). A A238L é detectada a tempos muito precoces pós-

infecção em modelo de infecção de células Vero, permanecendo nas células ao longo da infecção (Revilla *et al.*, 1998). Adicionalmente, não possui os resíduos de serina que nas I κ B celulares, ao serem fosforilados por uma I κ B cinase (IKK), sinalizam as moléculas para degradação (Revilla *et al.*, 1998), o que sugere que esta proteína viral terá um forte poder supressor sobre NF κ B. Existe evidência da formação de complexos entre A238L e a subunidade p65 de NF κ B, após degradação de I κ B celular (Revilla *et al.*, 1998, Tait *et al.*, 2000). A expressão de A238L em células de linha contínua inibiu a transcrição de um gene repórter dependente de NF κ B, e a ligação deste factor de transcrição a sequências alvo no DNA, ou provocou mesmo a dissolução desta ligação (Powell *et al.*, 1996, Revilla *et al.*, 1998).

Verificou-se que a A238L inibe também a actividade da fosfatase calcineurina, através de ligação à sua subunidade catalítica, tanto em macrófagos alveolares infectados como células Vero (Miskin *et al.*, 1998). A calcineurina está envolvida na regulação de várias actividades celulares, sendo uma das mais conhecidas a activação por desfosforilação de factores de transcrição da família NFAT em células T. Isto permite a translocação destes factores para o núcleo, onde têm como alvo genes indutíveis durante a resposta imunitária, codificando nomeadamente para as citocinas IL-2, IL-4, GM-CSF (Rao *et al.*, 1997). Em macrófagos de suíno foi também descrita a existência de cDNA codificante para uma proteína com semelhanças a NFAT2 (Miskin *et al.*, 1998), pelo que ao inibir a actividade da calcineurina, A238L inibirá a transcrição de genes imunomoduladores também através deste factor de transcrição. Alguns destes genes, com importantes funções pró-inflamatórias, foram já descritos. A enzima sintetase de óxido nítrico indutível (iNOS) bem como a libertação do seu produto, óxido nítrico (ON), são inibidas quer durante infecção de macrófagos quer em ensaios de sobreexpressão de A238L (Granja *et al.*, 2006b). O ON constitui uma espécie de radical livre com um potente efeito citotóxico, inibitório da replicação viral e modulador de apoptose, sendo maioritariamente produzido por macrófagos activados (Colasanti *et al.*, 2002, Taylor *et al.*, 2003). A sua via de produção constitui assim um alvo importante de regulação em infecções virais. Mecanismos de inibição de ciclooxigenase-2 (COX-2) (Granja *et al.*, 2004b) e da produção de TNF- α (Granja *et al.*, 2006a) foram também recentemente descritos.

A corroborar um papel imunomodulador do VP5A estão observações de que isolados virulentos inibem a transcrição e produção de várias citocinas pró-

inflamatórias durante infecção em macrófagos (Gil *et al.*, 2003, Powell *et al.*, 1996, Whittall & Parkhouse, 1997). No entanto, A238L não é essencial para a virulência *in vivo* nem para o crescimento viral *in vitro*, como se verificou através de infecções com um isolado altamente virulento delectado (Neilan *et al.*, 1997b). Alguns autores sugerem assim que A238L será importante no estabelecimento de infecções sub-agudas ou crónicas de suínos domésticos e não em infecções agudas, que rapidamente provocam a morte dos animais (Granja *et al.*, 2006b).

1.5. A infecção por VPSA de diferente virulência no estudo da PSA

Ao longo de várias décadas de investigação acerca da PSA, estudos comparativos de infecção utilizando isolados virulentos e naturalmente atenuados, têm vindo a elucidar parâmetros potencialmente relevantes para o desencadear de respostas imunitárias eficazes. Verificou-se que suínos sobreviventes a infecção natural ou experimental por VPSA de diferente virulência sobrevivem a contra-prova com vírus homólogos altamente virulentos (Malmquist, 1963, Manso Ribeiro *et al.*, 1963). Esta protecção não é no entanto mediada por anticorpos específicos para o VPSA, uma vez que nos animais infectados estes coexistem com vírus circulante, não neutralizando o seu poder patogénico (Plowright *et al.*, 1994). Estes factos têm permitido julgar que o desencadeamento de uma resposta imunitária de base celular é relevante para uma defesa efectiva contra a infecção por VPSA. De facto, foi observada actividade elevada de células NK em infecção com o isolado atenuado NHV, em correlação com protecção durante contra-prova com o vírus altamente virulento homólogo L60 (Leitao *et al.*, 2001). Utilizando o mesmo modelo de infecção, foi também descrita a indução de linfócitos T citotóxicos CD8⁺ (LCT) específicos para VPSA, com actividade restrita ao contexto de MHC classe I (SLA I). Estes LCT lisaram preferencialmente macrófagos infectados com vírus homólogo, e também, embora com menor intensidade, macrófagos infectados com isolados heterólogos (Martins *et al.*, 1988, Martins *et al.*, 1993). Mais recentemente, surgiram novas evidências sobre importância dos linfócitos CD8⁺ neste mecanismo de protecção, uma vez que a sua depleção dos animais após infecção com o isolado atenuado OUR/T88/3, levou a que estes deixassem de estar protegidos contra re-infecção com o isolado homólogo altamente virulento OUR/T88/1 (Oura *et al.*, 2005). Isto verificou-se apesar de os animais possuírem em circulação anticorpos contra o

primeiro isolado, confirmando que a eficácia da protecção não depende da acção de anticorpos específicos.

Observou-se em infecções utilizando os isolados DR-II, de moderada virulência, e L60, uma clara inibição da expressão de antígenos MHC (ou SLA em suínos) de classes I e II (Gonzalez-Juarrero *et al.*, 1992). No entanto, esta inibição foi reversível passado algum tempo de infecção com o isolado moderadamente virulento mas não com o isolado altamente virulento.

A expressão de citocinas é também diferencialmente modulada por isolados de diferente virulência. A transcrição de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-6, e de citocinas relevantes para activação de linfócitos de perfil TH1, IL-12 e IL-15, está significativamente aumentada durante infecção de macrófagos de suíno com o isolado de baixa virulência NHV em comparação com o isolado altamente virulento L60 (Gil *et al.*, 2003).

Processos da resposta imunitária envolvendo actividade de células NK e LCT, expressão de MHC e produção de citocinas, nomeadamente pró-inflamatórias, parecem ser relevantes para uma resposta protectora eficaz, uma vez que são induzidas em infecções por VPSA atenuados, às quais os animais sobrevivem, ao contrário do que acontece em infecção com isolados virulentos. Verifica-se assim que o estudo comparativo de diferentes respostas do hospedeiro à infecção com isolados de VPSA de diferente virulência, pode contribuir para um delineamento futuro de estratégias para o desenho de vacinas eficazes contra esta infecção.

1.6. Os isolados de VPSA L60 e NHV

Como adiante se descreve, utilizaram-se neste trabalho os isolados de diferente virulência VPSA/L60 (L60) e VPSA/NH/68 (NHV), que têm constituído um modelo de pesquisa de mecanismos de protecção na infecção por VPSA. Neste contexto descrevem-se as diferenças conhecidas à data entre os genomas destes isolados, que poderão ter implicações na relação vírus-hospedeiro.

O L60 é um isolado hemadsorvente de alta virulência para o suíno doméstico, no qual provoca doença hemorrágica e mortalidade próxima de 100%. O NHV é um isolado não hemadsorvente de baixa virulência para o suíno, provocando doença inaparente ou crónica com baixa mortalidade. Estes vírus foram isolados em Portugal durante o segundo surto de PSA no país na década de 60. L60 terá tido

origem na zona ocidental de África, à semelhança dos outros isolados Europeus e dos isolados das Caraíbas e da América do Sul (Bastos *et al.*, 2003, Blasco *et al.*, 1989a, Nix *et al.*, 2006). A utilização de L60 como vacina viva durante 1960-62, após atenuação por passagens em culturas de macrófagos (Manso Ribeiro *et al.*, 1963), poderá ter contribuído para o surgimento de isolados de menor virulência que se observou em anos posteriores. Em 1968 foi isolado o NHV, homólogo de L60 e denominado na altura Lisboa 68 (Vigario *et al.*, 1974).

A perda da capacidade de hemadsorção no isolado NHV deve-se ao facto de este possuir mutações nas regiões codificantes de dois genes contíguos implicados neste fenómeno (Duarte, 2000): *EP402R/8DR*, homólogo de receptores do tipo CD2 de linfócitos T como já referido em 1.4. (Borca *et al.*, 1998, Rodriguez *et al.*, 1993) e *EP153R/8CR*, homólogo de lectinas celulares tipo C (Galindo *et al.*, 2000a, Neilan *et al.*, 1999). A EP153R contém uma região central transmembranar, um domínio semelhante a lectinas tipo C animais e uma sequência de adesão celular (RGD) (Yanez *et al.*, 1995). A maior parte das lectinas tipo C são glicoproteínas transmembranares com um domínio que lhes permite reconhecer e ligar carboidratos (CRD: “carbohydrate recognition domain”), num processo dependente de Ca^{2+} (Sharon & Lis, 2004). Actualmente são consideradas como moléculas de reconhecimento a nível intracelular, na superfície membranar ou em fluidos fisiológicos, promovendo a adesão célula-célula ou molécula-célula ou mesmo a ligação e entrada de vírus nas células (Marzi *et al.*, 2004, Sharon & Lis, 2004). As lectinas tipo C de células do sistema imunitário têm ainda um importante papel no reconhecimento de agentes patogénicos (Cambi *et al.*, 2005). Para além do VP5A, vários outros vírus animais codificam para proteínas com domínios de lectinas tipo C, como por exemplo os membros da família *Poxviridae* “fowlpox”, “cowpox”, “myxoma” (Afonso *et al.*, 2000, Cameron *et al.*, 1999, Shchelkunov *et al.*, 1998, Wilcock *et al.*, 1999) e o herpesvírus CMV (Voigt *et al.*, 2001). No entanto, a função das lectinas virais nos diferentes ciclos infecciosos é ainda pouco conhecida.

A deleção de *EP153R* do isolado Ba71V resultou numa diminuição acentuada da percentagem de células Vero e macrófagos com hemadsorção em culturas infectadas, tendo sido proposto que EP153R poderá funcionar como estabilizadora da interacção de EP402R à superfície da célula infectada com os eritrócitos de suíno (Galindo *et al.*, 2000a). A hemadsorção não está no entanto directamente relacionada com a virulência, uma vez que existem isolados de campo não

hemadsorventes virulentos (Gonzague *et al.*, 2001, Pan & Hess, 1984). Igualmente, a deleção de *EP402R* (*8DR*) ou de *EP153R* (*8CR*) do isolado altamente virulento Malawi Lil-20/1, não diminuiu a sua virulência para o suíno doméstico (Borca *et al.*, 1998, Neilan *et al.*, 1999), apesar de no caso de *EP402R* se ter verificado um atraso na disseminação do vírus pelo organismo. Ambas as proteínas parecem exercer outras funções na célula para além da promoção da hemadsorção. *EP402R* poderá ter um papel imunossupressor (revisto em Dixon *et al.*, 2004) e *EP153R* um efeito inibidor na apoptose (Hurtado *et al.*, 2004). A sua falta em simultâneo no isolado NHV poderá resultar num maior efeito ao nível da diminuição da sua virulência.

Foi identificada uma deleção na região variável esquerda do genoma do NHV, com cerca de 10 Kpb, afectando vários genes das FMG 360 e 530 (Duarte, 2000). Esta resultou no desaparecimento das ORFs 3DL, 3EL, 3FR, 3HL, 3IL, 3LL, 3NR/A489R e truncagem das ORFs, 3CL/A125L e 3QR/A280R (Fig. 1). A não detecção de expressão de mRNA dos genes delectados foi indicativa da sua inexistência noutro local do genoma do isolado NHV (Duarte, 2000).

Recentemente, genes das FMG 360 e 530 foram associados ao fenótipo virulento e à capacidade de replicação de VPSA em hospedeiros diferentes, como macrófagos de suíno ou tecidos de carraças (Burrage *et al.*, 2004, Neilan *et al.*, 2002, Zsak *et al.*, 2001). De facto, durante a adaptação ao crescimento em células de linha, isolados de VPSA perderam uma parte significativa destes genes, especialmente na região do extremo esquerdo do genoma (Blasco *et al.*, 1989b, de la Vega *et al.*, 1990). Em Ba71V existem duas deleções nesta região variável, afectando vários membros de FMGs (Zsak *et al.*, 2001). A primeira deleção tem cerca de 5 kpb e compreende três genes da FMG 110 (1VL, 1XL e 1YL) e dois da FMG 360 (2AL e 2BL) (relativamente à mesma região do isolado altamente virulento E70). A segunda deleção tem cerca de 8,2 kpb, e compreende vários genes adicionais da FMG 360 e um gene da FMG 530 localizado entre estes: 3CL, 3DL, 3EL (FMG 360), 3FR (FMG 530), 3HL, 3IL, 3LL (FMG 360), correspondendo aproximadamente à mesma região da deleção de 10 kpb em NHV (Fig. 1).

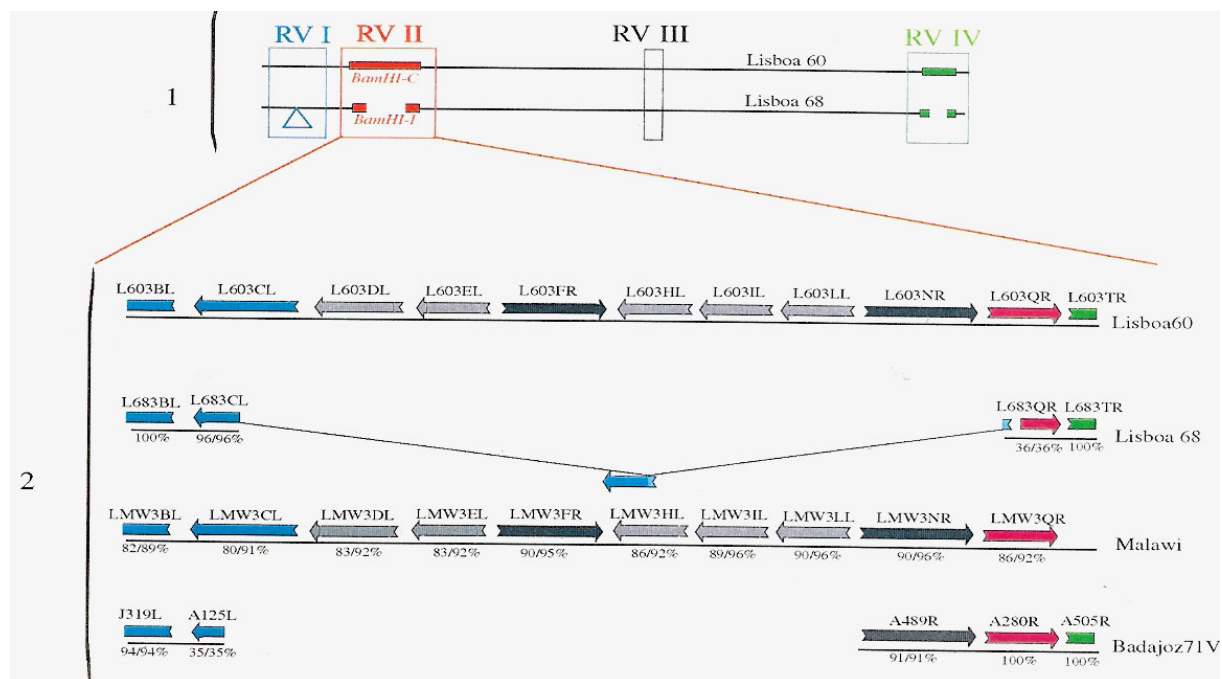


Figura 1. Representação esquemática dos membros das FMG 360 e 530 presentes na região variável esquerda dos isolados Lisboa 60 (L60), Lisboa 68 (NHV), Malawi e Ba71V. **1-** Localização de regiões variáveis identificadas nos isolados de campo L60 e NHV. **2-** Disposição e orientação dos diferentes genes de cada FMG ao longo dos genomas (FMG 360: setas para a esquerda; FMG 530: setas para a direita). Em percentagem encontra-se assinalado o grau de semelhança com ORFs homólogas do isolado L60, calculadas pelo programa GeneDoc 2.5.000. (Cortesia de Duarte, 2000).

Segundo Zsak *et al.* (2001), na infecção de macrófagos com Ba71V não só não ocorre qualquer multiplicação deste vírus, como os macrófagos morrem precocemente em comparação com a infecção por E70. De modo interessante, a reposição dos genes da segunda região delectada de 8,2 kpb, por recombinação com sequências de E70, foi suficiente para restaurar a capacidade de replicação do Ba71V em macrófagos de suíno, a uma taxa de crescimento e produção de vírus semelhantes às de E70. Também na infecção com um isolado originalmente altamente virulento, Pr4, delectado especificamente nos genes 3CL, 3DL, 3EL, 3HL, 3IL e 3LL (FMG 360) e 3FR, 3NR (FMG 530), denominado Pr4 Δ 35, se verificou uma diminuição no título de produção de vírus de 100 a 1000 vezes (2-3 log) em comparação com o vírus parental, bem como morte precoce dos macrófagos por apoptose. Estas observações levaram os autores a sugerir uma função determinante para os genes das FMG 360 e 530, na infecção e sobrevivência de macrófagos

infectados (“macrophage host range determinants”) (Neilan *et al.*, 2002, Zsak *et al.*, 2001).

Em NHV estão delectados ou truncados os mesmos genes que se verificou serem necessários para a replicação dos isolados Ba71V e Pr4 em macrófagos de suíno, e adicionalmente ainda os genes 3NR/A489R e 3QR/A280R (Fig. 1). No entanto, este isolado não perdeu a capacidade replicativa em macrófagos. Ba71V possui uma deleção adicional não presente em NHV, resultando na perda de outros genes da FMG 110 (1VL, 1XL e 1YL) e da FMG 360 (2AL e 2BL). A presença destes genes em NHV, ou de outros genes adicionais, uma vez que o seu genoma ainda não está sequenciado, poderá compensar a falta dos membros das FMG 360 e 530 delectados para uma eficiente replicação em macrófagos de suíno.

A propósito da virulência, a ausência de alguns dos genes das FMG 360 e 530 atrás referidos poderá estar na base do facto de NHV ser um isolado atenuado para o suíno doméstico. Neilan *et al.*, (2002) verificaram que a presença dos genes 3HL, 3IL e 3LL da FMG 360 em conjunto com 3FR, 3NR e 3QR da FMG 530 nos genomas dos isolados Malawi e E70, foram determinantes para a sua virulência em infecção de suínos domésticos. Mais recentemente, genes da FMG 360 e 530 foram implicados na inibição da resposta a interferão (IFN) tipo I (Afonso *et al.*, 2004). Outros autores tinham já verificado que o INF- α inibe a replicação de VPSA em monócitos e macrófagos (Esparza *et al.*, 1988), o que se poderá relacionar com a inibição da expressão de INF- α e das respostas mediadas por esta citocina, observadas durante infecção em macrófagos e células endoteliais (Powell *et al.*, 1996, Vallee *et al.*, 2001).

A ausência ou disrupção destes mesmos genes das FMG 360 e 530 no isolado NHV poderá assim contribuir para o seu fenótipo de baixa virulência.

1.7. Vias de indução de morte celular

Para que se verifique um correcto desenvolvimento embrionário e manutenção da homeostase nos tecidos de organismos multicelulares ao longo da vida, é essencial que ocorra morte programada de células. Quando tal não se verifica podem desenvolver-se processos patológicos devido a imortalização de algumas células, permitindo o crescimento de tumores ou desenvolvimento de doenças auto-imunes. Pelo contrário, degenerescências devidas a morte celular acelerada, nomeadamente ao nível do cérebro, foram implicadas em doenças humanas como Doença de Alzheimer (Yuan & Yankner, 2000).

Nos últimos anos, vários estudos têm vindo a delinear diversas vias de indução de morte celular, que na sua grande maioria ocorrem de forma programada (Melino *et al.*, 2005). Duas grandes divisões principais têm sido referidas: morte celular não apoptótica e apoptótica (Blank & Shiloh, 2007).

1.7.1. Morte celular não apoptótica

A morte celular não apoptótica inclui processos como necrose/oncose, autofagia, morte celular mitótica (MCM) (também referida como catástrofe mitótica) e também morte celular independente de caspases (MCIC) (Blank & Shiloh, 2007). Brevemente, o processo de necrose surge geralmente em consequência de agressões patofisiológicas como infecção, inflamação ou isquémia, que podem provocar depleção energética, perda de função de bombas iónicas, activação de proteases e dano das membranas lipídicas, com consequente ruptura celular. A autofagia é um mecanismo evolutivamente conservado e geneticamente programado, activado por exemplo em situação de falta de nutrientes e durante a diferenciação. É um processo adaptativo de resposta a stress metabólico, que resulta na degradação lisossomal de proteínas e organelos celulares, levando ao surgimento de estruturas vacuolares citoplasmáticas características, as vesículas autofágicas. Em condições fisiológicas normais, existem níveis basais de autofagia na maioria dos tecidos que contribuem para a adaptação celular a condições passageiras de stress. Em excesso no entanto, a autofagia leva à morte da célula. Quanto à MCM, é geralmente o processo pelo qual células tumorais morrem no decurso de alguns dias após tratamentos genotóxicos como irradiação e

quimioterapia. As células sujeitas a estes tratamentos sofrem mitoses aberrantes, que resultam em células geralmente inviáveis contendo dois ou mais micronúcleos. Por último, o processo de MCIC partilha com o processo de apoptose clássico a indução de permeabilização da membrana mitocondrial externa, com libertação de percursores apoptóticos para o citoplasma e consequente fragmentação do DNA. No entanto, como não envolve a activação da cascata proteolítica de caspases, alguns autores classificam-na como uma forma de morte não apoptótica (Okada & Mak, 2004).

1.7.2. Morte celular apoptótica

A apoptose é a via de morte celular mais bem caracterizada, nomeadamente em infecções virais. O termo apoptose foi definido por Kerr *et al.* em 1972 para descrever morfologicamente, uma forma particular de morte observada em certas células. Esta morte é acompanhada por um arredondamento da célula, retracção de pseudópodes, redução do volume celular, condensação da cromatina (picnose), fragmentação do núcleo (cariorrexis), pouca ou nenhuma modificação ultraestrutural de organelos citoplasmáticos, ondulação (“blebbing” ou “budding”) da membrana citoplasmática e manutenção desta intacta até fases tardias do processo (Kroemer *et al.*, 2005) (Fig. 2). Finalmente acaba por haver a formação de corpos apoptóticos resultantes do desmantelamento da célula em várias porções, sempre delimitadas por membrana. Estes são fagocitados *in vivo* pelas células da vizinhança, sem que haja qualquer derramamento do conteúdo celular, altamente inflamatório, para o meio intercelular. Na morte celular por apoptose está ainda incluída a que é induzida por falta de aderência ao substrato ou a outras células, denominada neste caso específico de “anoikis” (Gilmore, 2005).

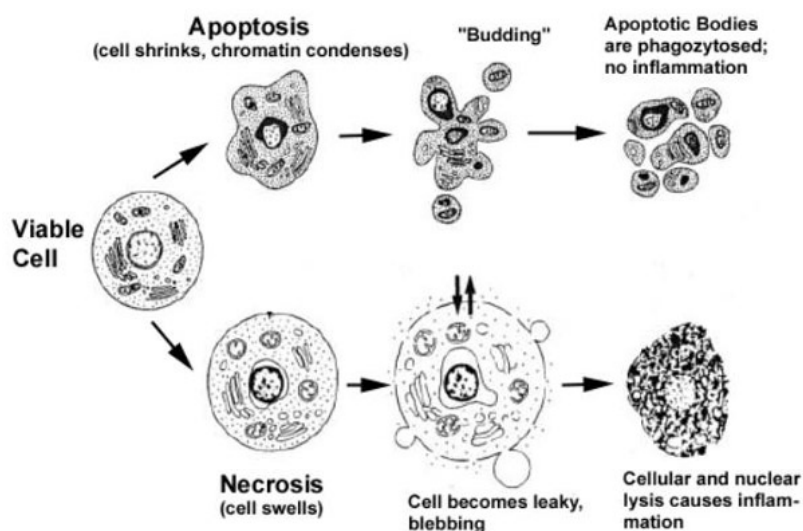


Figura 2. Características morfológicas dos processos de morte celular apoptótica e necrótica.

Adaptado de (Van Cruchten & Van Den Broeck, 2002).

A apoptose é um processo perfeitamente orquestrado que envolve uma interação em cascata de várias proteínas dentro da célula, após um estímulo indutor oriundo do exterior da célula ou do seu interior. Caso não ocorram interferências de outras proteínas reguladoras ao longo do processo, a célula é desmantelada “silenciosamente” sem que ocorram perturbações nos tecidos. Este desmantelamento é efectuado por uma família de enzimas proteolíticas características, denominadas caspases (“cysteine-dependent aspartate specific proteases”) (Fan *et al.*, 2005), que estão presentes nas células na forma latente de zimogénios (procaspases). Uma vez activadas por clivagem proteolítica de domínios específicos nas suas moléculas, as caspases podem ser responsáveis pela clivagem e activação de outras procaspases, ou pela clivagem de vários componentes da célula, levando ulteriormente ao seu desmantelamento, denominando-se caspases iniciadoras e efectoras respectivamente.

Consideram-se duas vias principais de indução de apoptose nas células eucariotas: a via extrínseca ou de receptores celulares e a via intrínseca ou mitocondrial (Fig. 3). A via extrínseca é induzida pela interacção à superfície celular de ligandos apoptogénicos com os seus receptores específicos, como por exemplo o ligando FasL e o receptor Fas (ou CD95L/CD95) e TNF- α e o receptor TNF-R1 (Gupta, 2003). Esta interacção leva ao recrutamento de proteínas adaptadoras do

citosol como as FADD (“Fas associated death domain”) e TRADD (“TNFR associated death domain”) e consequente exposição de domínios DED (“death effector domain”) presentes nas suas moléculas. Estes DED permitem a interacção com os mesmos domínios presentes em procaspases iniciadoras, como as 8 ou 10, presentes no citosol, levando ao seu recrutamento e resultante formação de um grande complexo de várias moléculas denominado DISC (“death-inducing signal complex”). No DISC ocorre auto activação da procaspase através da interacção entre duas unidades desta molécula, com a formação da caspase iniciadora activa. A caspase-8 é a mais referida e poderá actuar de duas formas, provavelmente dependendo do tipo celular. Por um lado poderá activar caspases efectoras, como as caspases 3, 6 e 7, e por outro lado pode trincar e activar Bid no citoplasma, uma proteína pró-apoptótica da família Bcl-2, que na forma truncada (tBid) é translocada para a mitocôndria onde inicia a via mitocondrial de apoptose (revisto em Fan *et al.*, 2005). A caspase-10 parece funcionar da mesma forma que a caspase-8, estando associada principalmente a apoptose em células linfoides.

Os estímulos indutores da via intrínseca ou mitocondrial de apoptose têm origem no interior da célula, sendo inúmeros os exemplos referidos na literatura: danos no DNA ou citoesqueleto, stress no retículo endoplasmático, perda de adesão ao substrato, falta de factores de crescimento, inibição da síntese macromolecular, acumulação de moléculas de stress como espécies reactivas de oxigénio e azoto, etc. Estes acontecimentos provocam a activação de moléculas pró-apoptóticas cuja acção converge ao nível da mitocôndria, alterando o seu potencial de membrana e/ou permitindo a difusão para o citoplasma de moléculas apoptogénicas, normalmente sequestradas no espaço intermembranar, como citocromo c, AIF (“apoptosis inducing factor”), EndoG (endonuclease G), Htra2/Omi (“high-temperature requirement protein A2”) e Smac/Diablo (“second mitochondria-derived activator of caspase/direct IAP-binding protein with low PI”) (Gupta, 2003).

A presença de citocromo c no citoplasma é considerada um sinal chave na via de sinalização apoptótica transduzida pela mitocôndria (Liu *et al.*, 1996). Este, na presença de ATP, leva à oligomerização e activação da molécula Apaf-1 (“apoptotic protease activation factor-1”), que recruta por sua vez uma outra procaspase iniciadora, a procaspase-9, através da interacção de domínios presentes em ambas denominados CARD (“caspase recruitment domain”). Forma-se assim um grande complexo molecular, o apoptossoma, com caspase-9 activa que por sua vez cliva e

activa as procaspases efectoras 3 e 7. A caspase-3 pode ainda clivar e activar a procaspase-9, num processo de “feedback” positivo (Fan *et al.*, 2005).

Uma vez activas, as caspases efectoras clivam variados substratos celulares, o que resulta nos diversos aspectos morfológicos observados em células apoptóticas (Blank & Shiloh, 2007). Assim, a clivagem de actina e proteínas de ligação à actina, gelsolina e fodrina (componentes do citoesqueleto) contribui para a ondulação observada da membrana plasmática. A clivagem de lamininas e de NuMA (“nuclear matrix protein”), responsáveis pela integridade do núcleo, resulta na fragmentação deste. ACINUS (“apoptotic chromatin condensation inducer in the nucleus”) e ICAD (“inhibitor of caspase-activated DNase”), ao serem clivadas, libertam enzimas activas que após translocação para o núcleo causam a condensação da cromatina e clivagem do DNA em zonas internucleossómicas respectivamente.

As caspases efectoras clivam também enzimas envolvidas no mecanismo de resposta a danos no DNA, como PARP (poly-ADP-ribose polimerase) e outras, impossibilitando a reparação deste e assim contribuindo para a irreversibilidade do processo apoptótico. Clivam ainda proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2, Bcl-xL e XIAP (Blank & Shiloh, 2007).

Existem evidências de que outras moléculas libertadas da mitocôndria durante a permeabilização da sua membrana externa, AIF e EndoG, podem induzir morte das células independentemente da acção de caspases (Penninger & Kroemer, 2003, Saelens *et al.*, 2004). AIF, que em células normais está confinada à mitocôndria onde tem um papel fulcral no metabolismo redox e bioenergético, uma vez no citoplasma é translocada para o núcleo onde induz condensação e lise da cromatina (Modjtahedi *et al.*, 2006). Endo G foi reportada também como mediando directamente a fragmentação internucleossómica do DNA nuclear (Li *et al.*, 2001). Outras moléculas libertadas da mitocôndria como a protease de serina HtrA2/Omi e Smac/Diablo actuam inibindo membros da família de inibidores de apoptose IAP (Saelens *et al.*, 2004, Srinivasula *et al.*, 2003), desta forma promovendo o processo apoptótico.

Uma via adicional de activação de caspases no processo apoptótico é através de Granzima B, um tipo de protease de serina presente em grânulos libertados por LCTs e células NK, que uma vez na célula alvo cliva Bid ou activa directamente procaspases-3, 7, 8, 9 e 10 (Adrain *et al.*, 2005).

1.7.2.1. Regulação da via de apoptose

Existem várias proteínas com capacidade de intervir ao longo da via de sinalização apoptótica, inibindo-a ou pelo contrário desencadeando-a, consoante os estímulos que a célula recebe. Estas proteínas reguladoras podem actuar por interacção directa com componentes da cascata apoptótica, com outras proteínas reguladoras do processo ou ainda através da regulação da transcrição de genes. As melhor caracterizadas têm sido: a família Bcl-2, com membros pró e anti apoptóticos que se podem inclusivamente regular entre si através de oligomerização; a família IAP (“inhibitor of apoptosis”), que interage directamente com caspases inibindo a sua actividade, a proteína supressora de tumores p53, actuando directamente por interacção com outras proteínas ou na activação da transcrição de genes pró-apoptóticos, e a via dos factores de transcrição NFκB, com a capacidade de activar transcricionalmente genes de protecção.

1.7.2.1.1. Família Bcl-2

As proteínas da família Bcl-2 caracterizam-se por conterem nas suas moléculas pelo menos um de quatro domínios de homologia conservados, BH1 a BH4, e pela presença na extremidade carboxilo em algumas destas proteínas de regiões de ligação a membranas (Cory & Adams, 2002). A primeira proteína desta família a ser caracterizada foi Bcl-2, originalmente identificada como um oncogene devido à sua presença numa translocação cromossomal em linfoma folicular de células B ("B cell lymphoma-2"), que levou à sua sobreexpressão. Actualmente estão identificados cerca de 20 membros desta família (Cory *et al.*, 2003), alguns pertencentes nomeadamente a vírus como por exemplo a E1B 19K de adenovírus, BHRF1 de Epstein-Barr (EBV), KSBcl-2 de herpesvírus de sarcoma de Kaposi ou LMW-5HL de VPSA (Hardwick & Bellows, 2003, Polster *et al.*, 2004). Algumas proteínas com dois ou mais domínios BH têm uma acção anti-apoptótica, como Bcl-2, Bcl-xL e as homólogas virais, enquanto outras são pró-apoptóticas, como Bax, Bak e Bok. Existem ainda membros que possuem apenas o domínio BH3, como Bad, Bim, Bid e Bmf ("BH3-only proteins"), com função pró-apoptótica.

A localização subcelular das várias proteínas varia, encontrando-se membros associados à mitocôndria (Bcl-2, Bax e Bak na forma activa), retículo endoplasmático (Bcl-2, Bcl-xL, Bax e Bak na forma activa), citoesqueleto (Bim, Bmf), citosol (Bcl-xL, Bad, Bax, Bid) e envelope nuclear (Bcl-2) (Annis *et al.*, 2004).

Apesar de o mecanismo de actuação dos diferentes membros da família Bcl-2 ser ainda fonte de debate (revisto em Polster *et al.*, 2004), é presentemente aceite que as proteínas pró-apoptóticas Bax e Bak actuam induzindo a permeabilização da membrana mitocondrial externa a mediadores apoptóticos como citocromo c, num processo em que parece ser necessária a sua homo-oligomerização. A proteína pró-apoptótica Bid, com um único domínio BH3, é activada por proteólise (tBid) e por seu turno activa Bax e Bak, provavelmente induzindo uma alteração conformacional nas suas moléculas que promove a sua auto-oligomerização. Existem evidências de que as várias proteínas, quer pró quer anti-apoptóticas, podem ligar-se entre si por homo ou hetero-olimerização, desta forma regulando a sua actividade mutuamente. Observaram-se ainda semelhanças estruturais com toxinas bacterianas que conseguem formar poros em membranas lipídicas. Posteriormente, vários estudos confirmaram que tanto membros pró como anti-apoptóticos têm a capacidade de

formar canais em membranas artificiais, ou de regular canais formados por proteínas mitocondriais como o ANT (“adenine nucleotide translocator”) e VDAC (“voltage-dependent anion channel”). Actualmente, pensa-se que Bax e Bak medeiam a libertação de moléculas apoptogénicas da mitocôndria através da formação de um poro, embora se desconheça se este é de natureza lipídica ou proteica (Newmeyer & Ferguson-Miller, 2003).

O desencadeamento de apoptose pode ocorrer também ao nível do retículo endoplasmático. Uma fracção das proteínas Bax e Bak localiza-se neste organelo, onde se verificou que sob estímulos apoptóticos induzem a libertação de cálcio para o citoplasma (Scorrano *et al.*, 2003). O aumento de Ca^{2+} no citoplasma pode desencadear a morte celular através da activação de caspases, da protease dependente de Ca^{2+} Calpaína (com substratos em comum com caspase-3 como Fodrina e PARP) (Wang, 2000), e/ou provocando disfunção mitocondrial devido à sua retoma do Ca^{2+} do citoplasma (revisto em Annis *et al.*, 2004). O Ca^{2+} provoca também activação da fosfatase calcineurina. Esta por sua vez activa Bad por desfosforilação (Wang *et al.*, 1999) ou medeia a activação de Bik, outro membro pró-apoptótico da família Bcl-2 (Jiang & Clark, 2001). Existem relatos de que a proteína Bcl-2 forma um complexo com calcineurina (Shibasaki *et al.*, 1997, Srivastava *et al.*, 1999), tendo sido sugerido que deste modo sequestre esta enzima em membranas, de forma a que não contacte com as suas moléculas alvo. Bcl-2 parece também interagir directamente com a bomba de cálcio SERCA (“sarcoendoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase”) (Kuo *et al.*, 1998).

A acção anti-apoptótica de membros como Bcl-2 e Bcl-xL poderá ocorrer através da sua interacção com Bax ou Bak, sequestrando-as da mitocôndria ou retículo endoplasmático, ou com proteínas de domínio BH3 único, impedindo que activem Bax ou Bak (Polster *et al.*, 2004). Os domínios BH1 e BH2 parecem ter um papel importante nesta interacção, uma vez que Bcl-2 com mutações nestes locais perdeu a capacidade de interagir com Bax e proteger as células de apoptose (Yin *et al.*, 1994). Curiosamente, estes dois domínios estão bem conservados em praticamente todas as proteínas homólogas virais conhecidas, ao contrário dos domínios BH3 e BH4, dando indicação de que estes últimos poderão não ser tão importantes para a actividade anti-apoptótica ou ter outras funções (Hardwick & Bellows, 2003). Verificou-se que BH3 e BH4 formam entre si um “loop” sujeito a fosforilação ou proteólise, tendo-se observado em vários tipos celulares que a clivagem de Bcl-2 e

Bcl-xL neste local, por caspase-3 ou calpaína, dá origem a um potente factor pró-apoptótico semelhante a Bax. Consequentemente, proteínas virais da família Bcl-2 que não possuam os domínios BH3 e BH4, não serão alvo dos mesmos processos de regulação pós-transcricional que os membros celulares (Hardwick & Bellows, 2003).

1.7.2.1.2. Família IAP

A primeira proteína da família IAP (“inhibitor of apoptosis protein”) foi identificada em baculovírus (Crook *et al.*, 1993). Actualmente estão identificadas várias IAPs presentes em vírus, leveduras e células de invertebrados e vertebrados, sendo caracterizadas pela presença nas suas moléculas de 1 a 3 motivos BIR (“baculoviral IAP repeat”) (Uren *et al.*, 1998). Os BIR permitem a ligação a caspases, tanto iniciadoras como efectoras, inibindo a sua actividade. Por outro lado, são também o local alvo de ligação de proteínas antagonistas de IAPs, como Smac/Diablo e HtrA2/Omi (Vaux & Silke, 2005), impedindo a interacção com caspases, e assim facilitando a apoptose da célula aquando da permeabilização da membrana mitocondrial. A maioria das IAP de baculovírus e suas homólogas celulares possuem um segundo domínio conservado C-terminal, denominado RING. Este recruta e liga enzimas conjugadoras de ubiquitina E₂ (UBCs), pertencendo estas IAP à classe de E3 Ligases. O domínio RING permite às IAP que o possuem catalizar a transferência de ubiquitina para as moléculas com que interagem, como as caspases, postulando-se que deste modo facilitem a sua degradação via proteassoma. No entanto, as IAP ligam-se também entre si e às antagonistas como Smac/Diablo e HtrA2/Omi, pelo que este tipo de ligação parece promover a auto-ubiquitinação da própria IAP e sua degradação, provavelmente acompanhada da molécula antagonista, num processo de co-degradação (Vaux & Silke, 2005, Yang *et al.*, 2000).

1.7.2.1.3. A proteína p53

O gene *p53* é o que mais frequentemente surge mutado em cancros humanos. A capacidade da proteína p53 para induzir apoptose em células afectadas pela expressão de oncogenes, danos no DNA e outros factores de stress, é um aspecto fulcral da sua actividade como supressora de tumores, para além de mediar a

paragem do ciclo celular, evitando a proliferação de células afectadas (Chipuk & Green, 2006, Liebermann *et al.*, 2007). A indução da transcrição de p21, uma proteína inibidora de cinases dependentes de ciclina (CDKs), é o processo fundamental pelo qual p53 induz a paragem do ciclo celular em G1 (Brugarolas *et al.*, 1995).

Na presença de vários factores de stress para a célula, ocorre uma estabilização de p53 por fosforilação ou por outras modificações como acetilação (Xu, 2003), que permitem a sua acumulação no núcleo onde actua como factor de transcrição. A p53 activa a transcrição de variados genes pró-apoptóticos, nomeadamente da família *bcl-2*, ou genes codificando para CD95 e Apaf-1, que poderão ser activados diferencialmente consoante o tipo celular e estímulo apoptótico (Chipuk & Green, 2006).

Além da sua actuação como factor de transcrição, verificou-se que mutantes para p53 sem capacidade para activação transcricional, continuaram a induzir apoptose eficazmente, através da interacção com membros da família Bcl-2 (Liebermann *et al.*, 2007). A p53 pode ligar-se às proteínas anti-apoptóticas Bcl-xL e Bcl-2, previsivelmente inibindo a sua actividade, e por outro lado pode induzir a oligomerização e consequente activação das pró-apoptóticas Bax e Bak, promovendo por a permeabilização da membrana externa mitocondrial (Chipuk & Green, 2006, Schuler & Green, 2005).

A actividade da p53 é regulada por uma proteína com um domínio RING semelhante ao das IAP, a Mdm2. Esta constitui uma E3 ligase e é responsável pela multi-monoubiquitinação de p53, mantendo-a nessa forma sequestrada no citoplasma (Li *et al.*, 2003).

1.7.2.1.4. A via de sinalização de NFκB

A família Rel/NFκB (“nuclear factor κB”) constitui um grupo de proteínas que actuam como factores de transcrição. Controlam a expressão de genes com um papel importante no desencadeamento de inflamação e da resposta imunitária, e também na proliferação celular, apoptose e oncogénese (Karin & Lin, 2002, Li & Verma, 2002). A importância da via de NFκB está patente no facto de se terem vindo a desenvolver nos últimos anos compostos para terapias imunossupressivas que têm como alvo componentes da sua via de sinalização (Li *et al.*, 2005).

As proteínas Rel/NF κ B possuem semelhanças estruturais na região N-terminal das suas moléculas devido à presença de um domínio de homologia RHD (“Rel homology domain”). Este domínio medeia a sua ligação ao DNA em locais com sequência específica κ B, a formação de dímeros com outras proteínas da mesma família, e ainda, a interacção com proteínas inibidoras específicas, as I κ B. A região C-terminal das Rel/NF κ B está envolvida na activação transcricional dos genes alvo (Kucharczak *et al.*, 2003, Papa *et al.*, 2006).

O termo NF κ B designa colectivamente os homo ou heterodímeros formados por proteínas da família Rel. Em mamíferos são expressas cinco proteínas desta família, subdivididas em duas classes: uma que engloba RelA (ou p65), c-Rel e RelB, sintetizadas na forma madura, e outra classe que engloba p50 e p52, sintetizadas a partir de precursores maiores por processamento proteolítico, p105/NF κ B1 e p100/NF κ B2 respectivamente (Kucharczak *et al.*, 2003, Papa *et al.*, 2006). Na maioria das células, os dímeros de NF κ B estão sequestrados no citoplasma na forma inactiva devido à sua ligação às I κ B (Yamamoto & Gaynor, 2004). Quando surge um estímulo pró-inflamatório indutor, como por exemplo ligação de TNF- α ou outras citocinas à superfície celular, infecção por vírus, activação de receptores “Toll-like” (TLRs) ou receptores de antigénios, é transduzida sinalização para o interior da célula que promove a activação do complexo de cinases IKK (IKK α , IKK β catalíticas e IKK γ /NEMO reguladora) que fosforila I κ B em resíduos específicos. Esta fosforilação de I κ B promove a sua degradação via ubiquitina-proteassoma e liberta NF κ B, que se transloca para o núcleo onde pode activar a transcrição de genes alvo específicos. Estes codificam nomeadamente para citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão, factores de crescimento, receptores celulares ou proteínas pró-sobrevivência (Hayden & Ghosh, 2004). Por outro lado, uma vez no núcleo NF κ B promove também a re-síntese de I κ B α , originando um processo de auto-regulação negativo (Kucharczak *et al.*, 2003).

A inibição da morte celular induzida por TNF- α é o exemplo mais bem caracterizado da actividade anti-apoptótica de NF κ B. Apesar de TNF ter a capacidade de desencadear apoptose por sinalização transduzida para o meio intracelular através do seu receptor TNF-R1, como acontece por exemplo durante a indução de apoptose de linfócitos T activados (AICD: “activation induced cell death”), paradoxalmente isto apenas acontece quando a actividade de NF κ B ou as sínteses de RNA ou proteína estão bloqueadas (Kucharczak *et al.*, 2003). Este mecanismo foi

parcialmente elucidado em anos recentes (Fig. 4). Uma vez ligado por TNF- α , o receptor TNF-R1 recruta as proteínas adaptadoras contendo “Death Domain” (DD), TRADD e RIP1, do citoplasma. A partir daqui podem formar-se dois tipos de complexos moleculares: um complexo I, com a molécula TRAF2 (“TNF receptor associated factor 2”) que promove a activação de NF κ B ligada, e um complexo II, que surge na sequência de ubiquitinação de TRADD e RIP1, que nesta forma se separam de TNF-R1 passando a localizar-se no citosol. Neste local o complexo II associa-se com FADD, que por sua vez recruta e activa as procaspases-8 e/ou -10, desencadeando assim a via de apoptose (Bubici *et al.*, 2004). NF κ B suprime a via apoptótica paralela à sua principalmente através da indução da transcrição de vários genes anti-apoptóticos, como os que codicam para IAPs (c-IAP1, c-IAP2, XIAP) e para membros da família Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-xL, Bfl-1/A1, NR13). Induz ainda a transcrição de TRAF-1 e -2, assim aumentando a sua activação em “feedback” positivo, e de c-FLIP, uma molécula cataliticamente inactiva homóloga de caspase-8, que ao ser recrutada por FADD no complexo II, exclui a caspase-8 e impede a sua activação (Kucharczak *et al.*, 2003).

Mais recentemente foi descrita outra via através da qual NF κ B previne a apoptose induzida por TNF, a via de sinalização da cinase activada por stress JNK (“Jun-N-terminal kinase”) (Fig. 4). Esta faz parte da via geral de sinalização por MAPKs de eucariotas (“mitogen activated protein kinases”), que consiste na transdução de sinais desencadeados por vários estímulos através da fosforilação sequencial e hierárquica de várias cinases de proteínas (Chang & Karin, 2001). A via JNK é maioritariamente pró-apoptótica e parece ter um papel obrigatório na morte induzida por TNF- α . Este normalmente desencadeia uma activação potente de JNK, que é no entanto transiente por ser bloqueada através de NF κ B (revisto em Papa *et al.*, 2006). Foi descrito que JNK induz um processamento da proteína pró-apoptótica Bid da família Bcl-2 num local específico da molécula. O fragmento activo resultante, jBid, transloca-se para a mitocôndria onde induz a libertação preferencial de Smac/Diablo em lugar de citocromo c. A indução de apoptose parece ser através de inactivação de c-IAP1 por Smac/Diablo, assim facilitando a activação de caspases (Deng *et al.*, 2003).

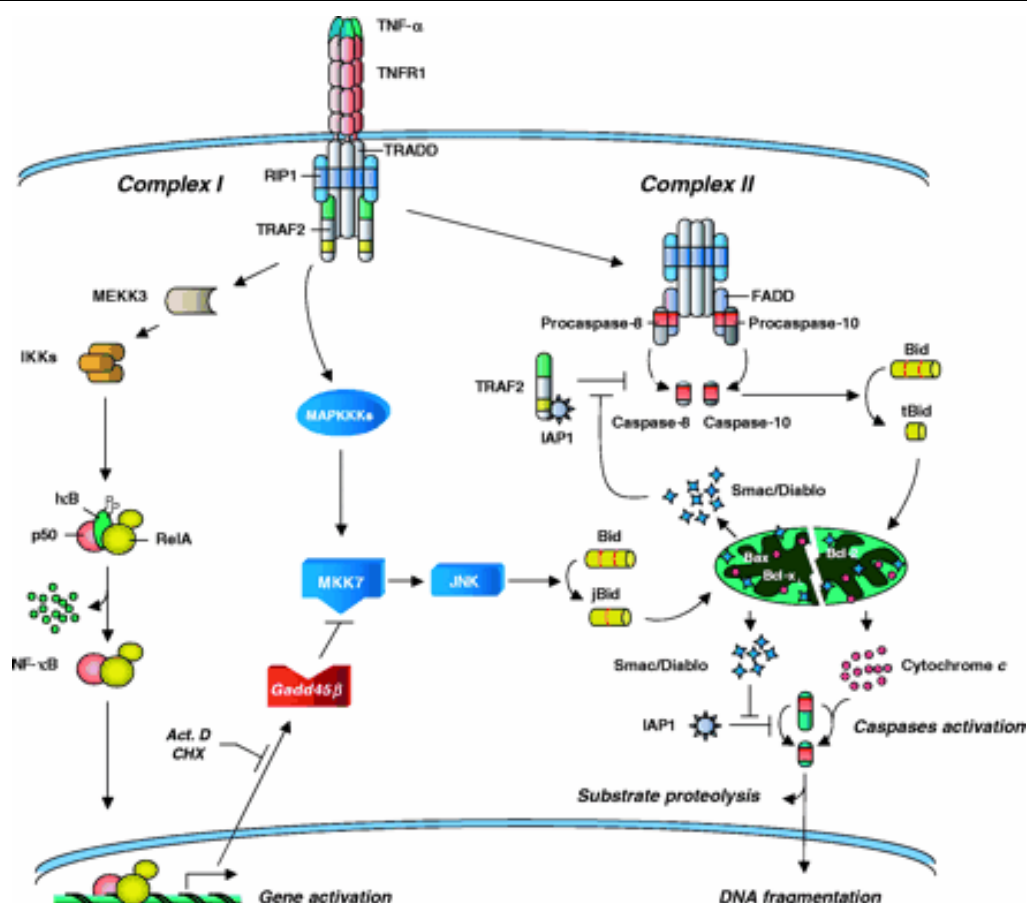


Figura 4. Vias de modulação de apoptose induzidas através do TNF-R1.

A formação do complexo I leva a activação da via de NFκB e sobrevivência. A formação do complexo II leva a activação de apoptose pela via intrínseca ou mitocondrial. Adaptado de Papa *et al.*, 2004.

NFκB contrapõe a indução de apoptose via JNK através da activação transcricional de um grupo específico de genes (revisto em Bubici *et al.*, 2004, Papa *et al.*, 2006). Alguns exemplos descritos são *Gadd45β*, *XIAP* ou *A20*, que actuam directamente na cascata de activação de JNK, e genes que inibem a formação de espécies reactivas de oxigénio (ROS), indutoras da via JNK por oxidarem e inactivarem fosfatases de MAPKs (MKP), como o gene da FHC (“ferritin heavy chain”) e da Mn-SOD (“Mn²⁺ superoxide dismutase”) (Fig. 5).

O leque de genes sobre os quais NFκB actua e suas repercussões em várias vias de sinalização é vasto e ainda em parte desconhecido. O tipo de genes alvo de NFκB parece depender ainda do tipo de tecido e estímulo a actuar sobre a célula. De modo interessante, a flexibilidade desta via parece permitir ao organismo montar uma resposta anti-apoptótica nos mais variados contextos biológicos.

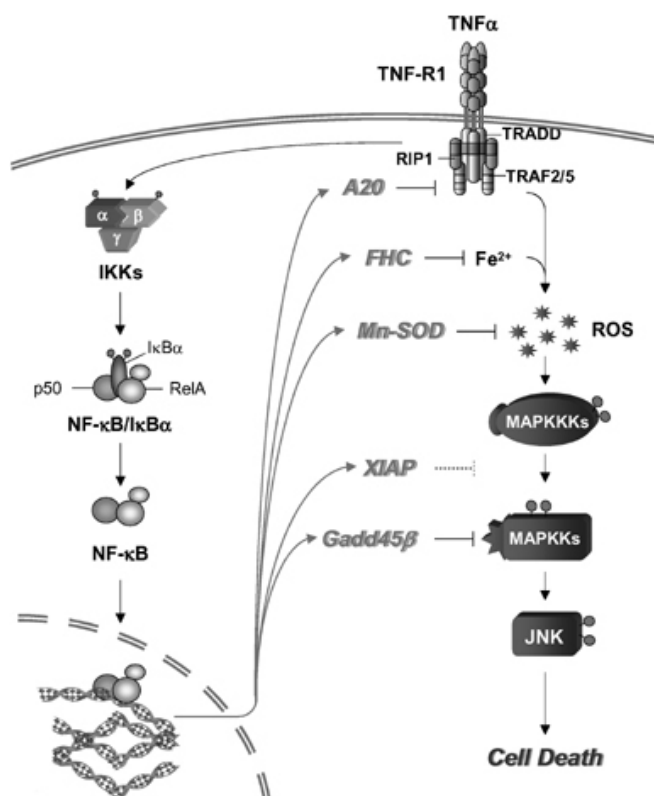


Figura 5. Genes indutíveis por NFκB inibidores da via JNK.

Os genes *A20*, *XIAP* e *Gadd45β* estão descritos como actuando directamente na cascata de JNK. Genes como *FHC* e *Mn-SOD* bloqueiam JNK indirectamente através da inibição de acumulação de ROS (“oxygen reactive species”). Adaptado de Papa *et al.*, 2006.

É reconhecido à via de NFκB um papel fundamental nomeadamente na sobrevivência de células do sistema imunitário (revisto em Kucharczak *et al.*, 2003). A proliferação de linfócitos B em resposta a antígeno parece depender da activação de NFκB mediada pelo receptor da célula B (BCR) e consequente activação de genes anti-apoptóticos. Também em linfócitos T “naïve”, a estimulação do seu receptor T (TCR) em conjunto com co-estimulação pela molécula CD28 induz uma activação de NFκB que se traduz em sobrevivência celular. No entanto existem também relatos de uma acção pró-apoptótica em linfócitos T activados, em que NFκB parece induzir a expressão de ligando Fas (FasL), desencadeando o processo de morte destas células denominado AICD (“activation induced cell death”). A acção de NFκB parece ser assim altamente complexa e depender do contexto celular em que é activado.

1.8. O VPSA e apoptose

Uma das principais características da infecção por VPSA virulento em suínos domésticos é o desencadeamento de intensa apoptose em populações linfocitárias na vizinhança de células com replicação viral activa (Carrasco *et al.*, 1996a, Gomez-Villamandos *et al.*, 1995a, Oura *et al.*, 1998, Ramiro-Ibanez *et al.*, 1996). Em órgãos linfoides há numa rápida e drástica perda de tecido (Carrasco *et al.*, 1996a, Oura *et al.*, 1998, Ramiro-Ibanez *et al.*, 1996, Salguero *et al.*, 2005). A comparação *in vivo* entre infecção com vírus de elevada e de moderada virulência, mostrou uma maior destruição de tecido linfoide e apoptose de linfócitos na infecção com o isolado altamente virulento, em associação com um maior número de macrófagos infectados (Oura *et al.*, 1998).

O mecanismo de indução de apoptose em linfócitos, células que não são alvo de infecção, ainda não está definido. A libertação de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α de macrófagos infectados tem sido referido como uma causa possível por vários autores (Carrasco *et al.*, 1996a, Gomez-Villamandos *et al.*, 1995a, Oura *et al.*, 1998, Salguero *et al.*, 2005). A observação de apoptose *in vivo* nas células alvo principal da replicação, os macrófagos, foi relatada em animais infectados com isolados altamente virulentos (Ramiro-Ibanez *et al.*, 1996, Salguero *et al.*, 2005), apresentando esses macrófagos simultaneamente infecção por VPSA.

A indução de apoptose em infecções *in vitro* foi referida anteriormente por alguns autores, em culturas de macrófagos de suíno infectadas com isolados virulentos (Neilan *et al.*, 1997a, Ramiro-Ibanez *et al.*, 1996) e em células de linha celular Vero infectadas com isolados adaptados (Carrascosa *et al.*, 2002, Hernaez *et al.*, 2004, Hurtado *et al.*, 2004, Nogal *et al.*, 2001). Em infecção de células Vero, modelo que tem sido utilizado na grande maioria dos estudos de apoptose, o sinal indutor de apoptose parece surgir logo após a descapsidação viral no citoplasma, não sendo necessária a síntese precoce de proteínas virais ou replicação do genoma viral para que a apoptose seja desencadeada (Carrascosa *et al.*, 2002). A proteína viral estrutural p54 foi apontada como potencialmente implicada neste processo. Está envolvida no transporte do vírus ao longo do citoplasma em direcção ao local da fábrica viral após entrada na célula, interagindo com o complexo motor microtubular via DLC8, uma dineína citoplasmática de cadeia leve (Alonso *et al.*, 2001). A p54 foi também reportada como indutora de apoptose quando expressa em células Vero,

induzindo actividade de caspase-3 e fragmentação nuclear (Hernaez *et al.*, 2004). Contudo, durante a infecção, indicadores claros de apoptose como activação de caspases-9 e -3, e translocação da proteína pró-apoptótica Bim da família Bcl-2 da sua localização microtubular para a mitocôndria, começam a ser detectados a partir das 12h (Hernaez *et al.*, 2004, Hurtado *et al.*, 2004). Presença de citocromo c no citoplasma, clivagem do substrato PARP de caspase-3 e fragmentação internucleossómica do DNA são referidos às 16h (Carrascosa *et al.*, 2002, Nogal *et al.*, 2001). Nestas fases da infecção, a replicação do VPSA está em vias de ser concluída, e consequentemente, a apoptose da célula hospedeira não virá limitar a formação de progenia viral. Foi também detectada neste sistema de infecção actividade de caspase-8, uma caspase iniciadora da via de apoptose extrínseca ou mediada por receptores, tendo no entanto níveis muito menos expressivos do que a actividade de caspase 9, iniciadora da via intrínseca ou mitocondrial (Carrascosa *et al.*, 2002, Hurtado *et al.*, 2004, Nogal *et al.*, 2001). Este facto aponta para uma indução de apoptose preferencialmente pela via intrínseca ou mitocondrial, em detrimento da via mediada por receptores, durante a infecção por VPSA.

A proteína celular p53 supressora de tumores é também induzida durante infecção de células Vero por VPSA adaptado. Detectou-se um aumento de p53 a partir das 3h de infecção, sendo esta transcricionalmente activa, estabilizada por fosforilação e de localização nuclear a partir das 4h de infecção (Granja *et al.*, 2004a). De acordo com esta observação, a expressão de outras proteínas cuja transcrição é dependente de p53, como p21 e a pró-apoptótica Bax, estão também claramente aumentadas 13h pós-infecção, uma fase em que se observa também actividade de caspases. No entanto, a activação de caspase-3 em infecção por VPSA não parece ser um processo dependente de p53, uma vez que após tratamento com o inibidor da tradução proteica cicloheximida, apesar de não ser detectada p53, continua a ocorrer activação de caspase-3 às 13h de infecção.

Estudos de apoptose em macrófagos infectados *in vitro* foram realizados apenas com isolados virulentos de VPSA, revelando indução de fragmentação internucleossómica do DNA a tempos tardios de infecção, entre as 16 e 24h (Neilan *et al.*, 1997a, Ramiro-Ibanez *et al.*, 1996).

Embora o macrófago seja considerado o alvo preferencial da infecção por VPSA, existem também descrições de infecção *in vivo* em células vasculares endoteliais (Gomez-Villamandos *et al.*, 1995a, Gomez-Villamandos *et al.*, 1995c, Ramiro-Ibanez

et al., 1996), com desencadeamento de anomalias de coagulação e hemorragias características da PSA. Células endoteliais de suíno infectadas *in vitro* com o isolado virulento Malawi Lil 20/1 revelaram uma indução de apoptose muito precoce, surgindo clivagem de PARP indicativa de actividade de caspase-3 às 4h pós-infecção (Vallee *et al.*, 2001). A observação de fragmentação e condensação do DNA às 18h de infecção, nas células com fábricas virais e portanto com replicação viral activa, mostrou que estas morrem por apoptose. Apesar disso, os autores referem que a infecção é produtiva, com produção de progenia viral a níveis semelhantes aos de culturas de macrófagos alveolares de suíno infectados nas mesmas condições, pelo que o vírus conseguirá completar o seu ciclo de vida antes da morte efectiva das células endoteliais. Em correlação com a precocidade no desencadeamento de apoptose nestas células, os autores observaram que a subunidade de 65 kDa ou RelA (p65) do NFκB é degradada a partir das 4h de infecção, desaparecendo pelas 18h, num processo inibido por um bloqueador geral de caspases, zVAD-fmk, e portanto dependente destas proteases. Igualmente, o fenótipo pró-inflamatório parece ser inibido durante a infecção, tendo os autores detectado inibição da expressão à superfície da molécula de adesão E-selectina, de MHC classe I, e da transcrição das citocinas pró-inflamatórias IL-6 e IL-8. Por outro lado, o fenótipo pró-coagulante foi induzido, verificando-se um aumento da expressão de TF ("tissue factor"), um iniciador essencial da coagulação sanguínea.

1.8.1. Mecanismos potenciais de modulação de apoptose na célula hospedeira

Ao infectar uma célula, a maioria dos vírus induz sinalização pró-apoptótica que permite aos organismos hospedeiros limitar a sua disseminação. Os vertebrados superiores desenvolveram dois mecanismos principais para controlar as infecções virais, com base na eliminação de células infectadas por apoptose. Um destes mecanismos baseia-se numa resposta imunitária, na qual péptidos virais são apresentados na superfície celular, no contexto de antigénios de histocompatibilidade. Estes são reconhecidos por LCTs, que por sua vez dão um sinal indutor de apoptose à célula infectada. O outro mecanismo de defesa é autónomo da célula infectada, que "detecta" uma activação não planeada do seu ciclo celular por proteínas virais, desencadeando ela própria a sua morte por

apoptose. Por outro lado, no processo de apoptose, a fragmentação celular em corpos apoptóticos, que são fagocitados sem provocar uma resposta imunitária, poderá representar um meio pelo qual o vírus induz a morte da célula hospedeira, limitando a resposta inflamatória e outras respostas imunitárias, ao mesmo tempo que dissemina a sua progenia (O'Brien, 1998). Muitos vírus desenvolveram estratégias de evasão controlando o desencadeamento de apoptose na célula hospedeira (Aubert & Jerome, 2003, Benedict *et al.*, 2002, Hay & Kannourakis, 2002). Igualmente, o VPSA possui no seu genoma o gene *5-HL* (denominado *A179L* no isolado adaptado a células Vero Ba71V), homólogo ao conhecido inibidor de apoptose, *bcl-2* (Neilan *et al.*, 1993, Yanez *et al.*, 1995). A ORF *LMW5-HL* foi identificada primeiramente no isolado virulento Malawi Lil-20/1, possui 537 pb e codifica para uma proteína de 179 aminoácidos com uma massa molecular de 18 kDa. Possui um elevado grau de semelhança com *bcl-2*, com 26% identidade e 47% conservação relativamente à sequência de aminoácidos (Neilan *et al.*, 1993), e contém todos os domínios BH da proteína Bcl-2 (Afonso *et al.*, 1996). A proteína viral é detectada precocemente em macrófagos infectados, após 3-5h, aumentando os seus níveis de expressão a tempos mais tardios (Afonso *et al.*, 1996, Neilan *et al.*, 1993). É altamente conservada em diferentes isolados de PSA, tanto virulentos como adaptados a linha celular Vero (Afonso *et al.*, 1996). O elevado grau de conservação em conjunto com a impossibilidade até a data de criar vírus delectados para este gene, sugerem fortemente que o *5-HL* poderá ser um gene essencial para a propagação viral. A sua funcionalidade na modulação de apoptose foi verificada em células de linha, transfectadas com vectores de expressão para *A179L* e posteriormente induzidas a morrer por apoptose. A expressão da proteína viral nessas condições diminuiu efectivamente os níveis de apoptose das células (Afonso *et al.*, 1996, Brun *et al.*, 1996, Revilla *et al.*, 1997), embora se tenha mostrado menos eficaz que Bcl-2 expressa do mesmo modo (Afonso *et al.*, 1996, Revilla *et al.*, 1997). De modo interessante, a protecção de apoptose na linha celular de insecto Sf9 após infecção com baculovírus recombinante expressando *5-HL*, depende da adesão celular, uma vez que em células em suspensão a expressão da proteína viral já não inibe apoptose provocada pela infecção (Brun *et al.*, 1998). É conhecido o papel que a adesão celular tem para a transdução de sinalização pró-sobrevivência e proliferação, uma vez que a maioria das células normalmente aderentes entra em apoptose quando não tem ligação à matriz extracelular, um processo denominado

de “anoikis” (Gilmore, 2005). Este estudo parece indicar uma interligação entre a proteína viral e componentes de um citoesqueleto celular organizado, que na célula infectada poderá permitir a transdução intracelular de sinais de sobrevivência.

Uma outra ORF de VPSA tem homologia aos genes *iap*, tendo sido denominada 4-CL no isolado Malawi Lil-20/1 (Neilan *et al.*, 1997a) e A224L no isolado Ba71V (Yanez *et al.*, 1995). Codifica para uma proteína com um único domínio conservado BIR no terminal NH₂, e uma sequência C-terminal que poderá constituir um domínio “zinc finger” do tipo 4-cisteína (C4) (Chacon *et al.*, 1995), ao contrário do que acontece em IAPs de baculovírus e celulares, que geralmente possuem na região C-terminal um domínio “RING finger” (C3HC4). Existe uma semelhança de 94,6% e 91,5% identidade ao nível de aminoácidos entre a proteína de Malawi e de Ba71V, possuindo a de Ba71V menos 14 aminoácidos na zona amino-terminal que a proteína prevista para Malawi. A análise da sequência desta ORF em diferentes isolados, Europeus, das Caraíbas, de argasídeos e de suínos Africanos, mostrou um elevado grau de conservação, sendo o Malawi Lil-20/1 aquele que possui a maior diferença neste *locus* comparativamente com os outros isolados (Neilan *et al.*, 1997a).

Em infecção de células Vero, A224L é descrito como sendo expresso em fase tardia da infecção, codificando para uma proteína estrutural tardia com 27 KDa que é englobada nos novos viriões (Chacon *et al.*, 1995). A acção deste gene viral tem no entanto gerado alguma controvérsia. A sua deleção do isolado Malawi Lil-20/1 parece não ser relevante para a replicação em macrófagos *in vitro* nem para a virulência em suínos. Observaram-se ainda níveis de sobrevivência e de apoptose semelhantes em infecção *in vitro* por vírus delectado e vírus parental, pelo que ausência desta proteína neste modelo de infecção não parece conduzir a maior apoptose das células hospedeiras (Neilan *et al.*, 1997a). Em oposição, um outro estudo de transfecção e sobreexpressão do gene A224L em células de linha contínua Vero, mostrou inibição da actividade de caspase-3 após indução exógena de apoptose, com staurosporina ou TNF- α e cicloheximida (Nogal *et al.*, 2001). A infecção com vírus delectado em A224L resultou igualmente numa maior actividade de caspase-3 e menor viabilidade celular a tempo tardio, comparativamente com infecção por vírus parental Ba71V. Ainda, A224L parece ser co-precipitada com o fragmento proteolítico de caspase-3, indicando que à semelhança de outras proteínas da família IAP, a proteína viral parece interagir com o fragmento activo de

caspase-3, desse modo putativamente inibindo a sua actividade (Nogal *et al.*, 2001). A discrepância de resultados obtidos nestes dois estudos poderá dever-se aos diferentes sistemas de infecção, no primeiro caso com vírus virulento em macrófagos de suíno, a célula natural alvo de infecção, e no segundo com vírus avirulento adaptado a células Vero. No entanto, as proteínas também são diferentes, uma vez que A224L possui menos 14 aminoácidos que 4-CL. Serão necessários mais estudos para esclarecer estas diferenças.

Foi ainda descrita uma nova função para a proteína A224L, a de induzir activação de NFκB. Esta acção foi observada em células Jurkat expressando o gene viral (Rodriguez *et al.*, 2002), num processo cuja via molecular é ainda desconhecida mas que parece envolver a activação de IKKs celulares, responsáveis pela fosforilação e consequente degradação dos inibidores IκB de NFκB. Esta via de actuação de A224L, em conjunto com a inibição da actividade de caspase-3 atrás descrita, poderá constituir uma importante ferramenta viral no controlo da apoptose na célula hospedeira. Existe no entanto outra proteína viral com o efeito oposto sobre NFκB, a homóloga de IκB, A238L. A vantagem para o vírus na inibição de NFκB reside no facto de esta família de factores de transcrição poder induzir a transcrição de genes imunomoduladores, responsáveis pelo recrutamento de células inflamatórias para locais de infecção. No entanto, NFκB está também envolvido na activação transcricional de genes anti-apoptóticos, pelo que a sua inibição terá em contrapartida um efeito pró-apoptótico. Estes genes virais estão descritos como sendo expressos em fases diferentes da infecção, A238L em fases precoces e A224L em fases tardias. A224L poderá travar a via de execução de apoptose a tempos mais tardios de infecção, enquanto o homólogo de *bcl-2*, 5-HL/A179L poderá actuar no mesmo sentido a tempo precoce. Por outro lado, A238L também inibe a actividade de fosfatase da calcineurina (Miskin *et al.*, 1998), que além da activação do factor de transcrição NFAT como atrás referido, parece activar também por desfosforilação a proteína pró-apoptótica Bad da família Bcl-2 (Wang *et al.*, 1999). Deste modo, inibindo a calcineurina será previsível que A238L tenha por esta via um papel anti-apoptótico, em oposição ao que acontece com a inibição de NFκB. A238L parece ter assim um importante e complexo leque de efeitos reguladores na célula infectada.

A proteína de VPSA homóloga de lectinas animais de tipo C, denominada 8-CR no isolado patogénico Malawi Lil-20/1 (Neilan *et al.*, 1999) e EP153R no isolado

adaptado a células Vero Ba71V (Yanez *et al.*, 1995), está envolvida no processo de hemadsorção (Galindo *et al.*, 2000a). Recentemente foi descrita também como inibidora de apoptose em modelo de infecção de células Vero (Hurtado *et al.*, 2004), sendo detectada a partir das 6h de infecção nestas células (Galindo *et al.*, 2000a). Na infecção com um mutante de deleção em *EP153R*, observou-se um aumento de actividade de caspase-3 e da percentagem de células apoptóticas, em comparação com a infecção com vírus parental (Hurtado *et al.*, 2004). Estudos de expressão em células Vero dos mesmos autores, mostraram que a presença de *EP153R* provoca uma diminuição da actividade de p53 como factor de transcrição e da actividade de caspase-3, após tratamentos com drogas indutoras de apoptose. No entanto, em modelo de infecção *in vitro* em macrófagos de suíno com vírus delectado em *8-CR*, o crescimento viral foi semelhante ao de infecção com vírus parental Malawi Lil-20/1 (Neilan *et al.*, 1999), pelo que este gene não parece ser essencial para a replicação viral. Concordantemente, apesar de *8-CR* ser conservado entre isolados virulentos de VPSA, a infecção *in vivo* com o mutante de deleção provocou o mesmo curso de doença que a infecção com o isolado parental, com 100% de mortalidade entre os animais infectados (Neilan *et al.*, 1999). A existência de outros genes no genoma viral com capacidade de inibir apoptose nas células hospedeiras, como *5-HL* e *4-CL*, poderá compensar a acção de *8-CR* na modulação de apoptose no macrófago hospedeiro da infecção.

O VPSA é um vírus complexo que possui vários genes permitindo manipular o desencadeamento de apoptose na célula infectada, para além de respostas imunológicas do hospedeiro. O facto de o seu alvo preferencial de infecção serem células de defesa imunitária, os macrófagos, torna os estudos de mecanismos de morte celular nestas células essenciais para o esclarecimento da patogénese da doença e evasão viral.

2. OBJECTIVOS

A infecção preferencial de macrófagos de suíno por VPSA constitui provavelmente o facto de maior relevância na patogenia da doença, em virtude daquelas células desempenharem um papel primordial no desencadeamento de respostas imunitárias inespecíficas, e na orquestração e activação de mecanismos específicos de protecção. A patogenia da infecção por VPSA de diferente virulência dependerá entre outros, da sua capacidade em modular diferentes funções dos macrófagos, em particular os mecanismos de morte celular que podem influenciar aspectos relevantes na infecção, estimulando ou impedindo o(s) processo(s) conducente(s) ao desenvolvimento de mecanismos de protecção imunitária.

A apoptose é um mecanismo de morte celular silencioso, que culmina no desmantelamento das células em corpos apoptóticos que são fagocitados por células vizinhas, sem derramamento do conteúdo celular e portanto sem desencadeamento de processos inflamatórios. É induzida muitas vezes em resultado de infecção viral, pelo que muitos vírus desenvolveram estratégias para a sua modulação de modo a conseguirem completar o seu ciclo de vida antes da morte efectiva das células hospedeiras. Esta modulação de apoptose é ainda pouco conhecida na infecção de macrófagos de suíno por isolados de diferente virulência de VPSA. Neste contexto, o presente trabalho teve como objectivo comparar diferentes aspectos do desencadeamento e da evolução de apoptose, num modelo de estudo *in vitro* em que se utilizaram culturas de macrófagos de suíno infectadas em paralelo com os isolados L60, altamente virulento, e NHV, de baixa virulência. Para tal, foram pesquisados e quantificados indicadores bioquímicos reveladores do desencadeamento de apoptose nas células, como fragmentação internucleossómica do DNA, activação de caspase-3, avaliação da morfologia nuclear, e ainda viabilidade celular, em fase precoce da infecção, enquanto decorre a replicação viral (cerca das 8h de infecção), e fase tardia, com o ciclo viral concluído (cerca das 18h de infecção).

Explorou-se a possibilidade de a infecção viral poder conduzir a protecção dos macrófagos contra apoptose induzida por indutores exógenos. Com o objectivo de esclarecer os mecanismos subjacentes à eventual modulação da apoptose na célula hospedeira pelos isolados de VPSA em estudo, estudou-se a expressão dos genes

virais putativamente inibidores de apoptose, *5-HL* homólogo de *bcl-2* e *4-CL* homólogo de *iap*, ao longo de ambas as infecções.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Obtenção de culturas primárias de macrófagos de suíno

Foram colhidas amostras de sangue de suínos Large White x Land Race no momento da sangria no matadouro. Para o efeito, utilizaram-se frascos de vidro estéreis contendo heparina (10 – 20 UI/ml de sangue) e uma suspensão de Dextran T500 a 5% (p/v) em solução salina balanceada de Hanks (SSBH), na concentração final de 10% (v/v) do fluido sanguíneo. Após incubação de cerca de 15 minutos a 37 °C, de modo a permitir a sedimentação dos eritrócitos, os sobrenadantes enriquecidos em leucócitos foram colhidos, diluídos 1:1 em meio de cultura completo (RPMI 1640 com 100 IU/ ml penicilina, 100 µg/ml estreptomicina e 20 mM HEPES) e distribuídos em frascos de cultura de tecidos (T175, Nunc), em volumes de 100 ml/frasco. Estes foram incubados em estufa a 37 °C, durante 48h, de modo a permitir a aderência e consequente diferenciação de monócitos em macrófagos. Os tapetes celulares de macrófagos assim obtidos foram lavados duas vezes com PBS (NaCl 137 mM, KCl 3 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂HPO₄ 2 mM, pH 7,4) aquecido a 37 °C, de modo a retirar as células não aderentes. As células aderentes foram destacadas após incubação com uma solução a 0,03% (p/v) de Na₂EDTA em PBS durante 15 minutos a 4 °C. As suspensões celulares assim obtidas foram centrifugadas a 400xg durante 10 minutos a 4 °C. O “pellet” de células obtido foi lavado em meio de cultura completo por centrifugação a 400xg, 10 minutos a 4 °C, e finalmente ressuspensão em meio completo suplementado com 10% SFB. A quantificação das células obtidas e o índice de viabilidade celular foram determinados através coloração com corante vital Azul Tripiano e contagem em câmara de Neubauer. Os macrófagos foram então ressuspensos em meio de cultura completo suplementado com 10% SFB, à concentração desejada para os diferentes ensaios e nos suportes de cultura adequados. Foram incubados durante cerca de 4h a 37 °C, 5% CO₂, humidade relativa superior a 80%, de forma a permitir a aderência das células antes do início dos ensaios (condições de rotina de cultura).

3.2. Propagação de VPSA em culturas enriquecidas de macrófagos

Culturas de macrófagos obtidas como descrito em 3.1., após incubação de 48h em frascos de cultura de tecidos, foram lavadas com tampão PBS aquecido a 37 °C de modo a remover células não aderentes. Adicionaram-se às culturas as suspensões virais a propagar (NHV e L60), e estas foram incubadas durante 1h a 37 °C, 5% CO₂, humidade relativa superior a 80%, de modo a facilitar a adsorção viral às células. Após incubação, adicionou-se meio de cultura completo suplementado com 10% SFB e a incubação prosseguiu em estufa até se observar efeito citopático (ECP - células com morfologia característica, de contorno arredondado e agrupadas em cacho, com citoplasma granular) em aproximadamente 80% das células (cerca de 72h após infecção). As culturas foram então submetidas a 3 ciclos de congelação a -70 °C e descongelação, de modo a promover a lise celular e consequente libertação de vírus para o meio. As suspensões virais assim obtidas foram clarificadas por centrifugação a 1300xg, 30 minutos a 4 °C (centrífuga Beckman GPR, rotor GH 3.7) e os sobrenadantes resultantes congelados a -70 °C até à sua utilização.

3.3. Semipurificação de VPSA

Suspensões virais obtidas como descrito em 3.2. foram centrifugadas a 21.500xg durante cerca de 16h a 4 °C (Sorvall RC5C, rotor GSA). Os sedimentos resultantes foram ressuspensos numa solução de Tris 20mM, EDTA 1mM, NaCl 1M, durante a noite a 4 °C. Foram de seguida colocados sobre almofada de sacarose a 25%, e ressedimentados por ultracentrifugação a 103.745xg (RCF_{av}, Beckman XL-90, rotor SW 28), durante 90 minutos a 15 °C. Seguiu-se nova ressuspensão em 2 ml de meio de cultura completo, durante cerca de 16h a 4 °C, e conservação a -70 °C até à sua utilização.

3.4. Titulação de VPSA

Suspensões de macrófagos obtidos como descrito em 3.1. foram colocados a uma concentração de 3 a 5 x 10⁵ células/ml em meio RPMI completo suplementado com 10% SFB e 30% de sobrenadante de células L929 como fonte de CSF ("colony

stimulating factor”). Após adição de eritrócitos de suíno numa concentração final de 0,01% (v/v), foram distribuídos em microplaca de cultura de células de 96 alvéolos (Nunc) (100 µl por alvéolo) e incubados durante cerca de 16h a 37 °C, 5% CO₂, humidade relativa superior a 80%.

Foram feitas diluições logarítmicas seriadas de base 10 de suspensões virais a titular, em meio de cultura completo suplementado com 10% SFB. Estas diluições foram inoculadas nas culturas de macrófagos em microplaca (5 alvéolos por diluição, 100 µl de inóculo por alvéolo) seguindo-se incubação a 37 °C, 5% CO₂, em humidade relativa superior a 80% durante 7 dias. Após este tempo, consideram-se positivos os alvéolos contendo células com efeito citopático ECP e hemadsorção (HAD) apenas no caso do vírus hemadsorvente (L60) (Malmquist & Hay, 1960a) (Fig. 6). O título viral foi determinado pelo método de Kärber (Karber, 1931) e expresso em TCID₅₀/ml (“tissue culture infectious dose”, quantidade de agente patogénico capaz de provocar uma alteração patológica em 50% dos animais ou culturas celulares inoculados).

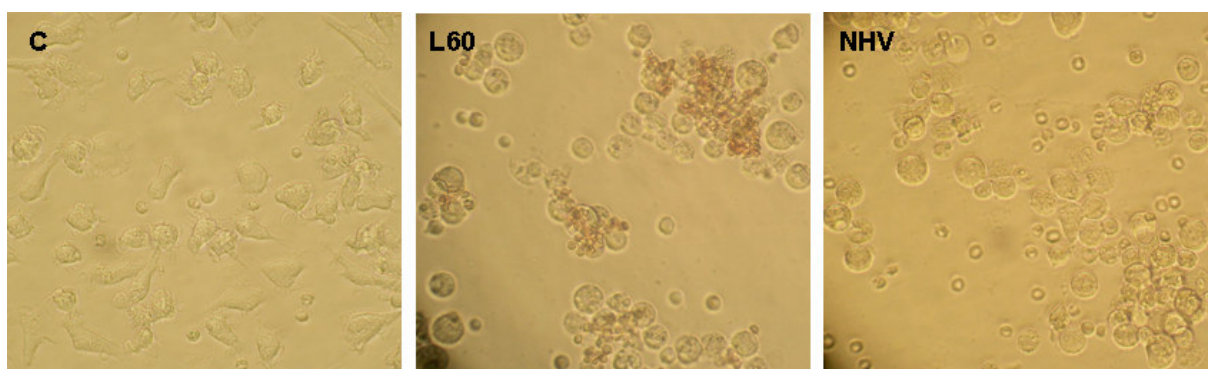


Figura 6. Observação da morfologia de macrófagos em cultura através de microscopia óptica: células controlo não infectadas (C), efeito citopático e hemadsorção em infecção com L60, e efeito citopático em infecção com NHV.

3.5. Infecção *in vitro* de culturas de macrófagos com VPSA

Culturas de macrófagos obtidas tal como descrito em 3.1. foram lavadas antes da infecção com meio de cultura aquecido a 37 °C de forma a remover células não aderentes. Os isolados virais ASFV/L60 (L60) e ASFV/NH/P68 (NHV), na forma semi-purificada, foram adicionados na multiplicidade de infecção (MOI) desejada,

num volume mínimo de meio de cultura completo de modo a cobrir o tapete celular. Seguiu-se 1h de incubação em estufa a 37 °C e 5% CO₂, humidade relativa superior a 80%, de modo a promover a adsorção viral e sincronização da infecção. Após duas lavagens das células com meio de cultura aquecido para remoção do excesso de vírus não adsorvido, repôs-se o meio de cultura completo, suplementado com 10% SFB, e prosseguiu-se a incubação em estufa durante os tempos estipulados para cada ensaio realizado.

3.6. Avaliação de parâmetros da infecção com L60 e NHV em culturas de macrófagos

3.6.1. Quantificação de progenia viral no sobrenadante de culturas

Culturas de macrófagos em placas de cultura de tecidos de 48 alvéolos ($1,5 \times 10^5$ células por alvéolo com 0,5 ml de meio de cultura) foram infectadas em paralelo com MOI 5 de cada isolado viral. Após 18h de infecção, os sobrenadantes foram colhidos e titulados segundo o procedimento referido em 3.4.

3.6.2. Determinação do número de células infectadas em cultura

Foram feitas culturas de macrófagos sobre lâminas com câmaras de cultura (Lab-Tek Chamber Slide, Nunc, com 8 câmaras) (1×10^5 células/câmara, 300 µl de volume de cultura). Para evitar o destacamento das células, principalmente a tempos tardios de infecção, as lâminas foram previamente revestidas com Poly-L-Lisina. Para tal, adicionou-se solução contendo este polímero (P 8920, Sigma) a cada câmara de forma a cobrir a superfície de cultura, deixando-se actuar 5 minutos à temperatura ambiente. Escorreu-se o excesso de solução e as lâminas foram secas à temperatura ambiente durante a noite e finalmente esterilizadas sob UVs, durante 30 minutos, em ambiente estéril de câmara de fluxo laminar. Culturas realizadas neste suporte foram infectadas paralelamente com L60 e NHV. Culturas não infectadas tratadas do mesmo modo foram utilizadas como controlo dos ensaios. Após 8h ou 18h de infecção ou cultura, o meio foi retirado e as células foram fixadas com uma solução de formaldeído a 4% em PBS durante 10 minutos à temperatura ambiente. Seguiram-se duas lavagens com PBS, permeabilização através de

solução a 0,1% Triton em PBS durante 20 minutos, e nova lavagem das células com 0,05% Tween em PBS, 5 minutos à temperatura ambiente.

As preparações de células com 8h de infecção ou cultura foram incubadas com um soro de coelho anti-VP32, uma proteína viral precoce expressa a partir das 2h de infecção (Prados *et al.*, 1993), durante 1h à temperatura ambiente (anticorpo primário). Seguiram-se 3 lavagens com 0.05% Tween em PBS e incubação com um soro revelador anti-Ig de coelho (anticorpo secundário), conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC), durante 1h à temperatura ambiente no escuro (ambos os soros foram gentilmente cedidos por Michael Parkhouse, IGC, Oeiras). As preparações de células com 18h de infecção ou cultura foram incubadas directamente com um soro anti-VPSA conjugado com FITC durante 30 minutos a 37 °C, em ambiente com humidade relativa elevada para prevenir a secagem das lâminas durante a incubação, no escuro.

Após incubações com os diferentes soros, as lâminas foram lavadas 3 vezes com 0,05% Tween em PBS e incubadas com o fluorocromo de DNA Hoechst 33258 (Sigma) numa concentração de 5 µg/ml em PBS, durante 3 minutos. Seguiram-se novas lavagens como anteriormente e finalmente as lâminas foram montadas com PBS/glicerol 3:1 v/v sob lamela e visualizadas ao microscópio de fluorescência com filtro para fluoresceína, de modo a visualizar as células infectadas, e filtro para DAPI, permitindo visualizar os núcleos celulares.

Foram contadas no mínimo 200 células em diferentes campos da lâmina para cada condição.

3.7. Determinação da viabilidade celular

A viabilidade celular foi determinada em culturas de macrófagos em microplaca de 96 alvéolos (5×10^4 células/alvéolo num volume de 100 µl), após os diferentes tratamentos e/ou infecções, através de adição da solução “CellTiter 96 AQueos One Solution Cell Proliferation Assay” (Promega), segundo as instruções do fabricante. O composto MTS componente desta solução é reduzido pelas células metabolicamente activas, dando origem a coloração do meio de cultura com intensidade proporcional ao nº de células viáveis. A absorvância é medida a 490 nm directamente na placa de cultura através de um leitor de placas (iEMS Reader MF, Labsystems).

3.8. Pesquisa de indicadores de apoptose

3.8.1. Fragmentação internucleossómica (FIN) de DNA

3.8.1.1. Visualização do padrão de migração do DNA em electroforese

Após as diferentes infecções e/ou tratamentos de culturas de macrófagos em placas de 12 alvéolos (6×10^5 células por alvéolo num volume de 1 ml), o sobrenadante foi retirado para microtubos e as células aderentes lisadas no local adicionando-se directamente sobre estas 200 µl de tampão de lise do kit “High Pure Viral Nucleic Acid Kit” (Roche). Após centrifugação dos sobrenadantes a cerca de $750 \times g$ 3 minutos, ressuspendeu-se o sedimento de células obtido num volume mínimo, que se adicionou aos volumes de lise das células aderentes, prosseguindo-se o processo de extracção segundo instruções do fabricante. No final da purificação o DNA foi eluído num volume de 100 µl (em Tris 10 mM pH 8,5) e quantificado por espectrofotometria através da leitura de absorvâncias a 260 e 280 nm.

Para verificar a origem de uma banda observável nas electroforeses de DNAs extraídos por esta metodologia, alguns dos DNAs obtidos (alíquotas de 0,4 µg), foram tratados com 2 µg/ml RNase A (Gentra) durante 20 minutos à temperatura ambiente.

Em alguns dos ensaios iniciais utilizou-se outro kit para extracção de DNA, o “Suicide-Track DNA ladder isolation kit” (Oncogene). Brevemente, após remoção dos sobrenadantes das culturas, adicionaram-se 55 µl de solução de lise (“Solution 1”) directamente sobre as células aderentes. Os lisados obtidos foram transferidos para microtubos, e a extracção prosseguida segundo as instruções do fabricante para isolamento de DNA total (“Procedure 2”), que incluiu tratamento para eliminação de RNA, precipitação do DNA, lavagem em soluções etanólicas e finalmente ressusensão em 10 mM Tris pH 7.5, 1 mM EDTA.

1 µg de DNA (ou 0,4 µg no caso de tratamento com RNase) foi misturado com tampão de aplicação de amostra em gel (6 x: sacarose 40% (p/v) e azul de bromofenol 0,25% (p/v) em água), na proporção de 6 para 1 (v/v), e submetido a electroforese em gel horizontal de agarose a 1,2% (p/v) em tampão TAE 1x (40 mM Tris base, 1 mM EDTA pH 8, 20 mM ácido acético). Aplicou-se uma voltagem de 5 V/cm até se observar a banda indicadora azul a 1-2 cm do final do gel. Após

incubação em solução com brometo de etídio (0,5 µg/ml) durante cerca de 20 minutos, o gel foi observado e fotografado sobre transiluminador para visualização do padrão de migração do DNA. Um padrão de migração em escada, de fragmentos de tamanhos múltiplos de 180 pb, é indicativo de células apoptóticas.

3.8.1.2. Quantificação de oligonucleossomas de DNA por ELISA

Fragmentos de DNA associados a histonas (mono e oligonucleossomas de DNA), resultantes de clivagem internucleossómica do DNA em células apoptóticas, foram quantificados através do kit “Cell death detection ELISA^{PLUS}” (Roche) segundo instruções do fabricante. Brevemente, após os diferentes tratamentos e/ou infecções em culturas de macrófagos em placas de 96 alvéolos (3×10^4 células por alvéolo, num volume de 100 µl), estas foram centrifugadas e o sobrenadante retirado cuidadosamente. As células na placa foram lisadas por adição de tampão de lise do kit, com consequente libertação das fracções citoplasmáticas contendo oligonucleossomas de DNA para o meio (Fig. 7, A). Após nova centrifugação, uma alíquota de 20 µl foi transferida para microplaca revestida com estreptavidina. Os fragmentos de oligonucleossomas presentes na amostra são ligados por anticorpos contra histonas conjugados com biotina, e contra DNA conjugados com peroxidase, que são adicionados a cada poço da placa de ELISA, formando um complexo em “sandwich” (Fig. 7, B). Após lavagens para remoção de anticorpos não ligados, a adição de um substrato da peroxidase (ABTS) dá origem a uma reacção colorimétrica, quantificável por espectrofotometria. No final das reacções registaram-se as absorvâncias a 405 e 490 nm num leitor de placas (iEMS Reader MF, Labsystems), sendo o resultado final obtido pela diferença $Abs_{405nm} - Abs_{490nm}$. Cada amostra foi analisada em duplicado.

Em alguns ensaios quantificaram-se igualmente os nucleossomas de DNA no sobrenadante das culturas (resultado de lise celular, devido a necrose ou apoptose tardia), transferindo-se alíquotas de 20 µl destes para a placa revestida com estreptavidina, e seguindo-se o mesmo procedimento descrito para as alíquotas das fracções citoplasmáticas. Esta quantificação foi realizada nos casos em que se pretendeu verificar se os diferentes tratamentos ou infecções estariam a induzir lise celular.

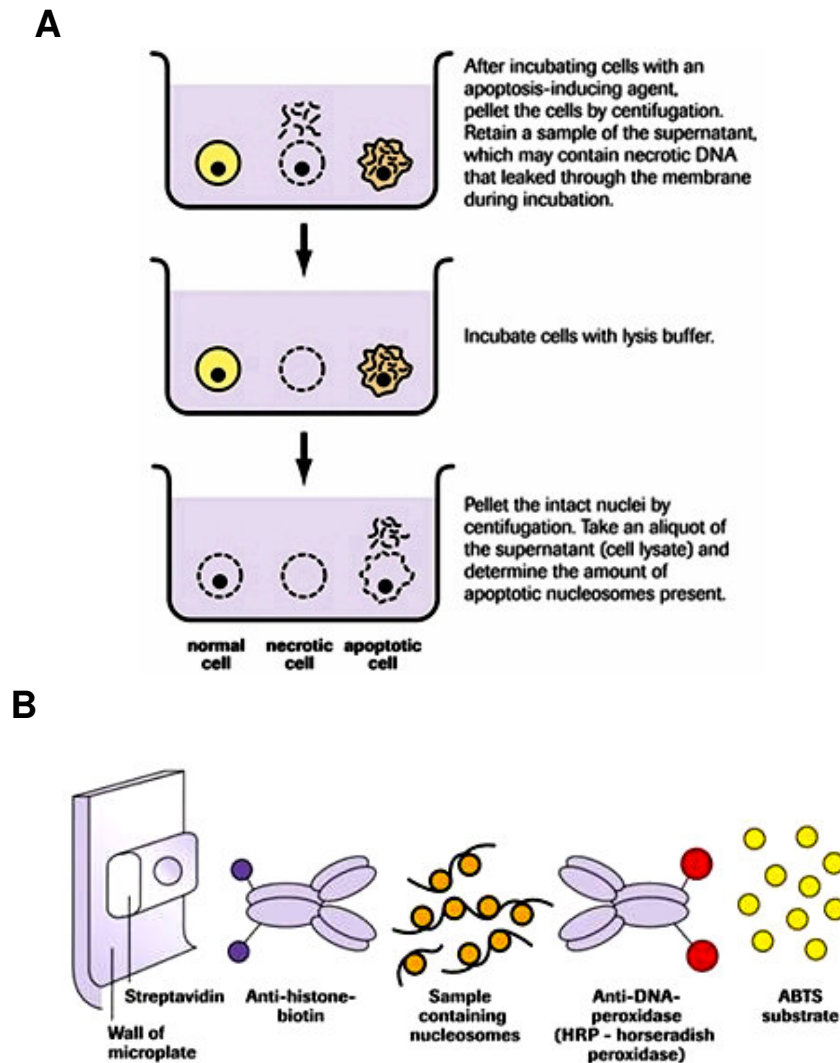


Figura 7. Representação esquemática da metodologia ELISA “sandwich” para quantificação de oligonucleossomas de DNA.

Amostras constituídas por lisados celulares ou sobrenadantes de cultura (**A**) são transferidas para microplaca revestida com estreptavidina e incubadas com uma mistura de anticorpos anti-histona-biotina e anti-DNA-peroxidase (**B**). Estes ligam-se aos nucleossomas presentes na amostra e após lavagem dos anticorpos não ligados, a quantidade de peroxidase retida no imunocomplexo é determinada fotometricamente através da sua reacção com o substrato ABTS. Adaptado da informação para o produto “Cell Death Detection ELISA^{PLUS}” em www.roche-applied-science.com.

3.8.2. Avaliação morfológica de apoptose: condensação e fragmentação da cromatina nuclear

Culturas de macrófagos sobre lâminas com câmaras de cultura, obtidas como descrito em 3.6.2., após os diferentes tratamentos e/ou infecções, foram visualizadas ao microscópio de fluorescência com filtro para DAPI para observação

da morfologia nuclear. Os núcleos de células apoptóticas identificaram-se por apresentarem cromatina condensada (picnose) e por vezes fragmentada, que cora fortemente com o fluorocromo de DNA Hoechst 33258, enquanto que os núcleos de células normais coram uniformemente. Foram avaliadas cerca de 200 células por cada infecção e/ou tratamento de modo a determinar uma percentagem de células apoptóticas.

3.8.3. Actividade de caspase-3

Foram realizadas culturas de macrófagos em placas de Petri (Nunc 150326) numa concentração de 3×10^6 células por placa em 3 ml de meio de cultura. Após os diferentes tratamentos e/ou infecções, os sobrenadantes foram colhidos para tubos de 15 ml (Nunc) e colocados em gelo. As placas de Petri contendo células aderentes foram também colocadas sobre gelo e lavadas com PBS a 4 °C, adicionando-se os volumes de lavagem aos do sobrenadante. Estes foram centrifugados (500xg, 10 min, 4 °C) de forma a colher as células que se tivessem destacado para o meio, e às células aderentes adicionou-se 100 µl de tampão de lise do kit “CasPACE Assay System, Colorimetric” (Promega). As células aderentes foram de seguida colhidas utilizando raspadores (“cell lifters” - Costar) e transferidas para microtubos, aos quais se juntou o sedimento de células obtido após centrifugação dos sobrenadantes. Procedeu-se à lise celular através de congelamentos/descongelamentos sucessivos (banho de etanol a -70 °C / banho maria a 35 °C), e os extractos celulares assim obtidos foram processados segundo as instruções do fabricante de forma a obter extractos proteicos. A proteína presente nos diferentes extractos foi quantificada pelo método de Bradford (Sigma B691620). Utilizaram-se 30 µg de proteína em reacção com o substrato colorimétrico de caspase-3/7, DEVD-pNA, segundo instruções do fabricante do kit acima referido, em microplaca de 96 alvéolos. A reacção colorimétrica foi quantificada através da leitura de absorvância a 405 nm em leitor de placas (iEMS Reader MF, Labsystems).

3.8.3.1. Inibição de caspases com zVAD-fmk

Para verificar a eficácia da inibição de caspases por zVAD-fmk, foram testadas duas concentrações deste inibidor sobre culturas de macrófagos obtidas como

referido em 3.8.3, nas quais foi induzida simultaneamente apoptose através de CHX. A culturas realizadas em paralelo começou por se adicionar zVAD-fmk numa concentração final de 50 μ M [recomendada pelo fabricante do kit “CasPACE Assay System, Colorimetric” (Promega), do qual é componente o zVAD-fmk utilizado] ou de 100 μ M, seguida da adição de 10 μ g/ml CHX. Uma das culturas realizadas em paralelo não sofreu qualquer tratamento (controlo negativo de apoptose), e a outra adicionou-se apenas a CHX (controlo positivo de apoptose). Após 8h de incubação foi quantificada a actividade de caspase-3 nas várias condições pela metodologia acima descrita.

Nos ensaios em que se pretendeu inibir a actividade de caspases, o zVAD-fmk foi adicionado no início das infecções (após o período de adsorção viral), ou das culturas não infectadas realizadas em paralelo.

3.9. Indução exógena de apoptose

Com o objectivo de induzir exogenamente apoptose em culturas primárias de macrófagos de suíno, foram testados alguns compostos descritos na literatura como indutores de apoptose: a citocina TNF- α (proteína recombinante de suíno, Biosource PSC 3014), os químicos cicloheximida (CHX) e staurosporina (STS) (Sigma, C 4859 e S 5921 respectivamente). Foi ainda testada a privação de soro do meio de cultura (PS).

Paralelamente a cada tratamento, culturas não tratadas (dos mesmos animais dadores) foram mantidas em parelo como controlo negativo de apoptose. O TNF- α foi adicionado ao sobrenadante de culturas nas concentrações de 100 e 200 ng/ml (de volume de cultura). Após 7h, 12h e 16h pesquisou-se a indução de apoptose através da visualização do padrão de migração do DNA em electroforese (3.8.1.1). Foi também testado o TNF- α em conjunto com CHX, nas concentrações de 100 ng/ml e 5 μ g/ml respectivamente, adicionados simultaneamente ao sobrenadante da cultura, e a CHX por si só, na concentração de 10 μ g/ml. A indução de apoptose foi pesquisada após 16h de incubação, por visualização do padrão de migração do DNA. A CHX na concentração de 10 μ g/ml foi ainda testada como indutora de apoptose num curto periodo de incubação, de 3h. Após este tempo quantificaram-se nas culturas tratadas os oligonucleossomas de DNA citoplasmáticos, a actividade de

caspase-3 e avaliou-se a morfologia nuclear (como descrito em 3.8.1.2., 3.8.3. e 3.8.2. respectivamente). Para avaliação da lise celular induzida por CHX, quantificaram-se numa cultura tratada por um período de 7h os oligonucleossomas do sobrenadante para além dos citoplasmáticos (como descrito em 3.8.1.2).

A STS foi testada preliminarmente adicionando-se nas concentrações de 0,05, 0,1, 0,25 e 0,5 μM ao sobrenadante das culturas. Após 7h de incubação pesquisou-se apoptose por visualização do padrão de migração electroforético do DNA. A indução de apoptose num período de incubação de 3h, semelhante à CHX, foi testada com uma concentração de 1 μM STS, utilizando-se as mesmas metodologias que para aquele composto, para pesquisa de apoptose em igual período de tempo. A avaliação de lise celular induzida por STS foi realizada como referido para a CHX, mas após um período de 3h de tratamento.

Para verificar se a PS induzia apoptose no nosso modelo celular, foram realizadas em paralelo culturas de macrófagos com soro adicionado ao meio, na concentração normal de 10% soro fetal de bovino (SFB), e sem adição de soro. Após 8h e 18h de cultura, pesquisou-se apoptose pelas metodologias de quantificação de oligonucleossomas citoplasmáticos de DNA, actividade de caspase-3 e avaliação da morfologia nuclear.

3.10. Estudo da expressão de genes virais envolvidos na inibição de apoptose durante infecção por L60 e NHV

3.10.1. Desenho de oligómeros

Todos os oligómeros utilizados nos nossos estudos e mais adiante referidos foram desenhados utilizando o programa “Primer 3” (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) (Rozen & Skolnik, 2000). Subsequentemente, a sua especificidade para as sequências alvo foi testada através da ferramenta BLAST da NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) (Altschul *et al.*, 1990). Seleccionaram-se apenas os oligómeros que mostraram 100% de identidade com as sequências alvo dos vários isolados de VPSA disponíveis, e que apresentaram simultaneamente níveis baixos de identidade com sequências de outros genomas da base de dados da NCBI.

3.10.2. Sequenciação dos genes virais *5-HL* e *4-CL* de L60 e NHV

3.10.2.1. Obtenção de DNA viral

Culturas de macrófagos em placa de cultura de 12 alvéolos (Nunc), na concentração de 6×10^5 células por alvéolo com 1 ml de meio, foram infectadas com MOI 3 de L60 e NHV. Após 16h de infecção retirou-se cuidadosamente o sobrenadante e adicionou-se directamente sobre as células 200 µl de tampão “binding buffer” e 50 µl proteinase K, componentes do kit de extracção de DNA utilizado “High Pure Viral Nucleic Acid Kit” (Roche). Prosseguiu-se a extracção como recomendado pelo fabricante e eluíu-se o DNA no final em 50 µl de tampão de eluição do kit.

3.10.2.2. Amplificação de regiões genómicas contendo *5-HL* e *4-CL*

Foram desenhados oligómeros para amplificarem regiões dos genomas de L60 e NHV contendo os genes *5-HL* e *4-CL*, com base na sequência nucleotídica do isolado Ba71V de VPSA totalmente sequenciado à data (acesso GenBank: NC_001659). Os oligómeros utilizados foram:

- **seq5HL** (5'-3'): TTT CCT CCT GGT CGA GTT TG (*forward*) e GTT TCC TGT GTG CCC AAC TT (*reverse*), amplificando uma sequência de 899 pb, com início 280 pb a montante do codão de iniciação e término 79 pb a jusante do codão de terminação da tradução do gene *5-HL*.

- **seq4CL** (5'-3'): CTT TAT GAG AAC CTA CCT TCT TCG (*forward*) e CAG GGG AAA TAT AAC CGA GGA (*reverse*), amplificando uma sequência de 1022 pb, com início 129 pb a montante do codão de iniciação e término 218 pb a jusante do codão de terminação da tradução do gene *4-CL*.

2 µl de DNA obtido como descrito em 3.10.2.1. foram amplificados em PCR com 0,6 µM de cada oligómero *forward* e *reverse*, através de uma mistura de reacção comercial 2 x concentrada contendo uma polimerase “proofreading” e todos os componentes necessários à polimerização, excepto oligómeros e DNA molde (Accuzyme Mix, Bioline). As condições de amplificação em termociclador para cada par de oligómeros foram:

- seq5HL: 95 °C 4 min.; 37 ciclos de 95 °C 30 seg., 65 °C 30 seg, 72 °C 2 min. e 15 seg.; 72 °C 20 min. e 4 °C ∞.
- seq4CL: 95 °C 4 min.; 38 ciclos de 95 °C 30 seg., 59 °C 30 seg, 72 °C 2 min. e 15 seg.; 72 °C 20 min. e 4 °C ∞.

Os produtos amplificados foram submetidos a electroforese em gel de agarose a 1,5%, confirmando-se a obtenção de produtos do tamanho esperado (Fig. 8).

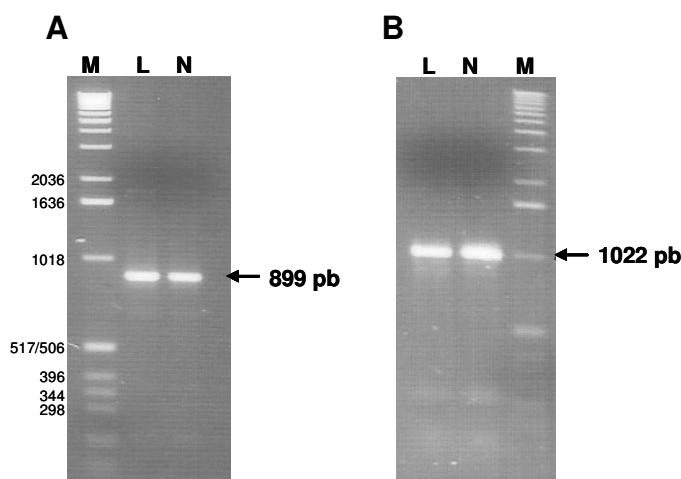


Figura 8. Electroforese de produtos de amplificação em DNA de L60 (L) e NHV (N), correspondentes a regiões genómicas contendo os genes 5-HL (A) e 4-CL (B). M - marcador de pesos moleculares de DNA (X – Roche).

As bandas foram excisadas do gel e o DNA nelas presente extraído através do kit “High Pure PCR Product Purification Kit (Roche), segundo as instruções do fabricante, num volume final de 50 µl. Uma alíquota de cada DNA foi quantificada por espectrofotometria através da leitura da absorvâncias a 260 e 280 nm.

3.10.2.3. Clonagem das sequências amplificadas e sequenciação

Uma vez que os amplificados obtidos através de enzimas “proofreading” possuem extremidades cegas, procedeu-se a uma reacção de “A tailing” para clonagem em vector pGEM-T (Promega) (Fig. 9). 50 ng de DNA amplificado foram utilizados em reacção com tampão de Taq DNA polimerase 1 x (Amersham), 0,2 mM dATP e 5U Taq DNA Polimerase (Amersham), num volume total de 10 µl, a 70 °C durante 30 min. 4 µl deste volume foi utilizado em reacção de ligação a vector pGEM-T (25 ng), segundo as instruções do kit de clonagem “pGEM-T Vector System II” (Promega), numa proporção de 1:2 de vector/inserto.

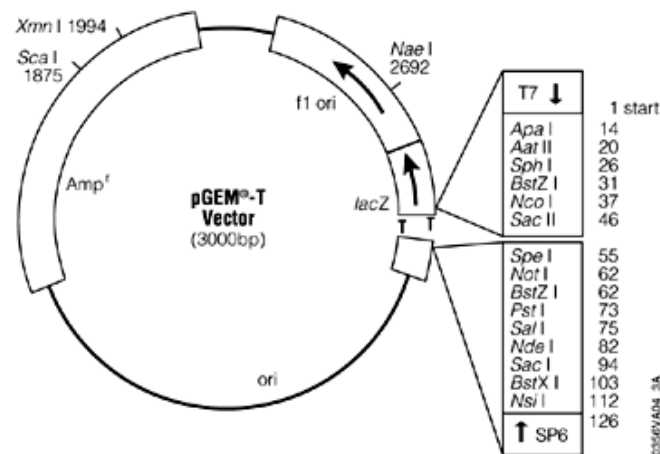


Figura 9. Mapa circular do vector utilizado para clonagem e posterior sequenciação dos genes virais 4-CL e 5-HL.

Adaptado de www.promega.com.

Após uma incubação de cerca de 16h a 4 °C, utilizaram-se 2 µl de cada reacção de ligação às quais de juntaram 33 µl de células competentes JM109 para transformação, componentes do kit de clonagem. Após 20 minutos em gelo, aplicou-se um choque térmico de 45-50 segundos a 42 °C seguido de 2 minutos em gelo, ao fim dos quais se adicionou às células 970 µl de meio de cultura (LB Broth, Miller, L 3152 Sigma) à temperatura ambiente. Seguiu-se uma incubação de 1,5h a 37 °C com agitação suave, centrifugação a 750xg para sedimentar e concentrar as células transformadas num volume de cerca de 300 µl, e finalmente plaqueamento destes volumes em duplicado em placas de agar (LB Agar, Miller, L3027 Sigma), contendo 100 µg/ml ampicilina, 0,5 mM IPTG e 80 µg/ml X-Gal. As placas foram incubadas a 37 °C durante cerca de 24h para permitir o crescimento de colónias e colocadas de seguida a 4 °C até à sua utilização. Para confirmar a presença de fragmento inserido, algumas das colónias brancas obtidas (clones recombinantes) para cada tipo de sequência foram repicadas para tubos de 0,2 µl de PCR contendo 10 µl de água. A cada tubo foram adicionados os componentes necessários à amplificação por PCR, através dos oligómeros seq5HL e seq4CL, como descrito em 3.10.2.2. Aliquotas de cada PCR foram submetidas a electroforese, confirmando-se a presença dos clones esperados em praticamente todas as colónias testadas. Repicou-se uma colónia de cada clone recombinante e transferiu-se para frasco “erlenmeyer” contendo 7 ml de meio LB com 100 µg/ml ampicilina. Seguiu-se

incubação a 37 °C com agitação suave durante a noite e extracção de plasmídeo das culturas através do kit “High Pure Plasmid Isolation Kit” (Roche) segundo instruções do fabricante, eluindo-se no final o DNA plasmídico purificado em 75 µl de tampão de eluição do kit.

Alíquotas de 0,5 µl de cada plasmídeo foram amplificadas através dos oligómeros seq5HL e seq4CL, como descrito em 3.10.2.2., ao que se seguiu electroforese em gel de agarose, confirmando-se a presença das sequências de *4-CL* e *5-HL* em cada plasmídeo purificado. 2,5 µg de cada plasmídeo foi enviado para sequenciação automática, de ambas as cadeias de DNA, recorrendo-se aos serviços externos de empresa especializada (STAB VIDA). O produto de amplificação para *5-HL* foi também sequenciado directamente sem recorrer a clonagem.

3.10.3. Extracção de RNA e tratamento com DNase

Foi isolado RNA total de culturas de macrófagos em placa de 6 alvéolos contendo $1,5 \times 10^6$ células, controlo não infectadas e infectadas com MOI 3 de L60 e NHV, utilizando-se o reagente Trizol (Gibco-BRL). Após diferentes tempos de cultura ou infecção (1,5h, 4h, 8h, 12h, 16h), o sobrenadante foi aspirado cuidadosamente e as células aderentes foram lisadas adicionando-se 1 ml de Trizol por cada alvéolo. O procedimento seguido para obtenção de RNA foi o recomendado pelo fabricante, ressuspendendo-se no final o RNA em 20 µl de água tratada com DEPC (Diethyl Pirocarbonato, Calbiochem) para inactivação de RNases.

Um volume de 10 µl do RNA obtido foi tratado com DNase (sistema “Turbo DNA-free”, Ambion), num volume total de reacção de 15 µl segundo as instruções do fabricante. Para confirmar a eficácia da eliminação de DNA, uma alíquota de 1 µl de cada RNA foi testado por PCR para verificar se ocorria amplificação. Em RNA de células infectadas foram utilizados oligómeros específicos para regiões conservadas do gene codificante de uma proteína viral, a VP72 (*forward*: 5' GACGCAACGTATCTGGACAT 3'; *reverse*: 5' TTTCAGGGGTTACAAACAGG 3'), que amplificam uma sequência de 370 pb. Em RNA de células controlo não infectadas utilizaram-se oligómeros específicos para o gene constitutivo da ciclofilina de suíno previamente descritos por outros autores (Dozois *et al.*, 1997), amplificando uma sequência de 369 pb. Nas reacções de amplificação foram utilizadas as concentrações de 0,6 µM de cada oligómero, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP,

1x tampão de reacção (Amersham) e 0,25 U Taq Polimerase (Amersham), num volume total de 50 µl. As condições de amplificação em termociclador foram: 94 °C 3 minutos; 35 ciclos de 94 °C 30 segundos, 58 °C 30 segundos, 72 °C 30 segundos; 72 °C 10 minutos; 4 °C ∞. Como controlo positivo da amplificação foram submetidas a PCR, paralelamente com as amostras de RNA, amostras de DNA contendo sequências alvo de cada par de oligómeros (DNA extraído de macrófagos de suíno não infectados e infectados, para amplificação correspondente a ciclofilina e a VP72 respectivamente). Uma alíquota de 8 µl de cada volume de PCR foi submetida a electroforese em gel de 2% agarose. A não visualização de qualquer produto de amplificação nas amostras de RNA confirmou a eficiência do tratamento com DNase (Fig. 10). Seguiu-se a quantificação por espectrofotometria através da leitura da absorvância de uma alíquota de cada RNA a 260 e 280 nm. Rácios obtidos de $Abs_{260nm} / Abs_{280nm}$ entre 1,8 – 2 confirmaram a sua pureza.

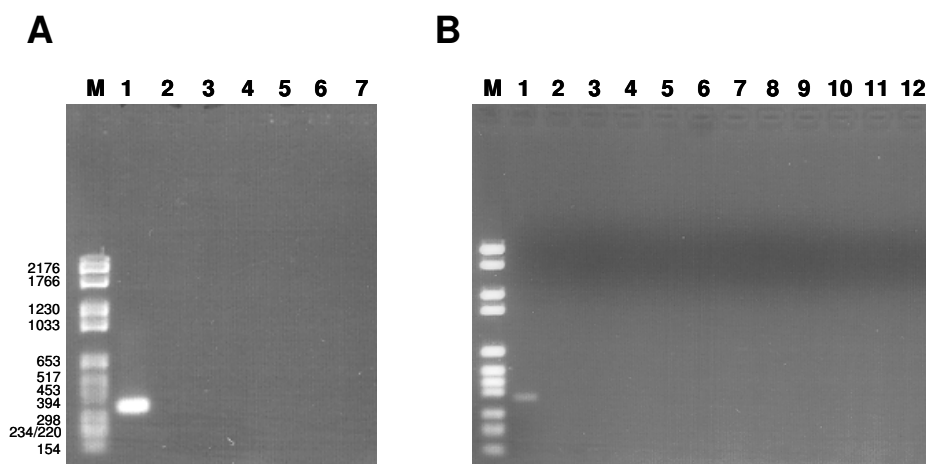


Figura 10. Eficácia do tratamento com DNase na eliminação de DNA contaminante em amostras de RNA para síntese de cDNA.

Alíquotas de cada RNA, pós-tratamento com DNase, foram submetidas a PCR e os produtos de amplificação separados em electroforese em gel de agarose. **A.** PCR com oligómeros específicos para a sequência do gene da ciclofilina de suíno (amplificando 369 pb) sobre: DNA de macrófagos de suíno (1); RNA de culturas não infectadas incubadas durante 1,5h (2), 4h (3), 8h (4), 12h (5), 16h (6); água (7). **B.** PCR com oligómeros específicos para a sequência do gene viral VP73 (amplificando 370 pb) sobre: DNA extraído de cultura de macrófagos infectada (1); RNA de culturas infectadas com L60 durante 1,5h (2), 4h (3), 8h (4), 12h (5), 16h (6); RNA de culturas infectadas com NHV durante 1,5h (2), 4h (3), 8h (4), 12h (5), 16h (6); água (7). M: marcador de pesos moleculares de DNA (VI, Roche). Os resultados são representativos de um de cinco ensaios independentes, em que foi extraído RNA de culturas de macrófagos ao longo de 16h de cultura ou infecção para estudos de expressão genética.

3.10.4. Síntese de cDNA

Foram utilizadas alíquotas de 0,6 µg de cada RNA para a transcrição reversa em cDNA, através da enzima Superscript II Reverse Transcriptase (Invitrogen), segundo as instruções do fornecedor, com pequenas alterações. Assim, o RNA tratado com DNase foi colocado num volume total de 11 µl ao qual foi adicionado 10 µl de água tratada com DEPC, 1 µg Oligo pdT₁₂₋₁₈ (Amersham Pharmacia Biotech), 2 µl dNTPs 10 mM. A mistura foi aquecida a 65 °C 5 minutos e rapidamente arrefecida em gelo. Seguiu-se a adição de 8 µl tampão 5x "First strand buffer", 4 µl DTT 0,1 M, 2 µl (60U) RNAGuard (Amersham Pharmacia Biotech) e incubação 2 minutos a 42 °C. Adicionou-se finalmente 1 µl (200U) de enzima transcriptase reversa e incubou-se 50 minutos a 42 °C e 15 minutos a 70 °C, num volume total de 40 µl. O cDNA assim obtido foi guardado em alíquotas a -20 °C até à sua utilização.

3.10.5. Oligómeros específicos para os genes virais 5-*HL* e 4-*CL*

Para amplificação de sequências correspondentes aos genes de VPSA 5-*HL* e 4-*CL*, foram desenhados oligómeros com base nas sequências nucleotídicas conservadas publicadas à data em *GenBank Data Bank* para diferentes isolados. Para o gene 5-*HL* compararam-se as sequências dos isolados Malawi Lil/20 (L09548), Kenia 1950 (AY261360), Tengani 62 (AY261364), Warthog (AY261366), Pretorisuskop/96/4 (AY261363), Warmbaths (AY261365), Mkuzi 1979 (AY261362) e Ba71V (NC_001659). Para o gene 4-*CL* as sequências foram as dos isolados Lis60 (L60) (U91736), Ba71V (U18466), E70 (U91733), E75 (U91734) e Malawi Lil-20/1 (U91738).

As várias sequências disponíveis foram alinhadas através do programa "Multalin" (<http://prodes.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>) (Corpet, 1988), de forma a escolher como sequências alvo dos oligómeros zonas perfeitamente conservadas entre os diferentes isolados virais. Os pares de oligómeros escolhidos bem como a sua localização nas sequências codificantes de ambos os genes virais estão representadas na tabela 1.

Tabela 1. Oligómeros *forward* (*for*) e *reverse* (*rev*) desenhados para o estudo da expressão dos genes virais em qPCR.

Oligómeros	Gene alvo	Sequência 5' – 3'	Posição relativa a ATG	Amplificado
5HL	5- <i>HL</i> (540 pb)	<i>for</i> : CCA gTT TAC Tgg ggT TgT gAC	+203 a +223	217 pb
		<i>rev</i> : gAA AgC CAA AAA CTC CTC TTg A	+398 a +419	
4CL	4- <i>CL</i> (675 pb)	<i>for</i> : gCT CCA TAg ATg CAC gAA ATC	+80 a +101	193 pb
		<i>rev</i> : AAg CCg CAg TTT CTA CTC CA	+253 a +272	

Estão descritos para cada gene o número de pares de bases das sequências codificantes com base na informação para o isolado Ba71V de VPSA totalmente sequenciado (acesso *GenBank* NC_001659).

3.10.6. Oligómeros específicos para genes constitutivos de suíno

Os oligómeros para as sequências dos genes constitutivos de suíno *GAPDH* (“glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase”) e *HPRT1* (“hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1”) foram desenhados tendo como alvo zonas de junção exão-exão, de forma a impossibilitar a amplificação de DNA genômico. Para o gene constitutivo da Ciclofilina A (“peptidylprolyl isomerase A”), os oligómeros foram desenhados tendo como alvo diferentes exões separados por um intrão. Todos os oligómeros para estudos de qPCR foram desenhados para amplificarem sequências de tamanho aproximado e pouco extensas (\approx 200 pb), de forma a permitir a obtenção de boas eficiências de amplificação.

A localização dos intrões na sequência dos genes de suíno foi inferida através da informação existente sobre estes genes em *Homo sapiens*, obtida a partir da base de dados da NCBI *Entrez Gene* (*GAPDH*: GeneID 2597; *HPRT1*: GeneID 3251; *Ciclofilina A*: GeneID 5478).

As sequências de mRNA de cada um dos genes foram obtidas da base de dados da NCBI *Entrez Nucleotide*, através dos acessos *GenBank*:

- AF017079 para *GAPDH*, NM_001032376 para *HPRT1* e NM_214353 para *ciclofilina A* de *Sus scrofa*;
- NM_002046 para *GAPDH*, NM_000194 para *HPRT1* e NM_021130 para *ciclofilina A* de *Homo sapiens*.

Encontrou-se também publicada a sequência de mRNA de um pseudogene da *ciclofilina A* de suíno (acesso *GenBank* AF543683).

Através do programa “Multalin”, alinharam-se as sequências de mRNA de cada gene, de suíno e humanas, com a sequência do gene humano, de forma a situar os

intrões e desenhar os oligómeros com base nessa informação. No caso da *ciclofilina A* de suíno, o mRNA do seu pseudogene foi também utilizado no alinhamento, e os oligómeros seleccionados de forma a hibridarem em locais da sequência contendo vários “mismatch” (3 nucleótidos no oligómero forward e 4 no reverse) para o mRNA deste pseudogene.

Os pares de oligómeros escolhidos e a sua localização na sequência codificante dos respectivos genes, estão patentes na tabela 2.

Tabela 2. Oligómeros *forward* (*for*) e *reverse* (*rev*) desenhados para o estudo da expressão de genes constitutivos de suíno em qPCR.

Oligómeros	Gene alvo	Sequência 5' – 3'	Posição relativa a ATG	Amplificado
CIC	<i>Ciclofilina A</i> (495 pb)	<i>for.</i> ggA gAA Agg ATT Tgg TTA TAA Agg TT ^(a)	+126 a +151	157 pb ⁽¹⁾
		<i>rev.</i> ACC CgT ATg CTT CAg gAT AAAA ^(b)	+261 a +282	376 pb ⁽²⁾
GAP	<i>GAPDH</i> (1002 pb)	<i>for.</i> gTC ggA gTg AAC ggA TTT g ^(c)	+10 a +28	168 pb ⁽¹⁾
		<i>rev.</i> CTT gAC TgT gCC gTg gAA ^(d)	+160 a +177	
HPR	<i>HPRT1</i> (657 pb)	<i>for.</i> gAC TgA AgA gCT ACT gTA ATg ACC A ^(e)	+302 a +326	183 pb ⁽¹⁾
		<i>rev.</i> TTg CAA CCT TgA CCA TCT TT ^(f)	+465 a +484	

A posição relativa a ATG refere-se à sequência em cDNA de suíno. Estão igualmente descritos para cada gene o número de pares de bases das sequências codificantes com base na informação da NCBI para cada gene de *Sus scrofa* (acessos *GenBank*: NM_214353 para *ciclofilina A*, AF017079 para *GAPDH*, NM_001032376 para *HPRT1*).

^(a) sobre o terceiro exão; ^(b) sobre o quarto exão; ^(c) sobre junção do primeiro e segundo exões; ^(d) sobre o terceiro exão; ^(e) sobre a junção do terceiro e quarto exões; ^(f) sobre a junção do quinto e sexto exões.

⁽¹⁾ em cDNA; ⁽²⁾ em DNA.

3.10.7. Especificidade dos oligómeros

A especificidade de cada par de oligómeros foi testada através de PCR sobre alíquotas de DNA e cDNA, obtidas a partir de culturas de macrófagos de suíno. As condições de amplificação por PCR foram: 0,6 µM de cada oligómero, 1,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 1x tampão de reacção (Immobuffer, Bioline) e 0,125U Immolase DNA Polimerase (enzima “hot-start”, Bioline), num volume total de 25 µl. As condições de amplificação em termociclador foram: 95 °C 7 minutos; 35 ciclos de 95 °C 30 segundos, 59 °C 30 segundos, 72 °C 15 segundos; 72 °C 10 minutos; 4 °C ∞. Os resultados de amplificação foram visualizados através de electroforese em gel de agarose a 2,5%, TAE 1x, com alíquotas de 8 µl de cada PCR.

3.10.8. Obtenção de DNA de concentração conhecida (DNA standard) para construção de rectas padrão em PCR em tempo real (qPCR)

Os oligómeros atrás descritos – GAP, HPR, 5HL e 4CL – foram utilizados para obter produtos de amplificação, a partir de cDNA, para cada gene em estudo.

As condições de PCR utilizadas para cada par de oligómeros, permitindo obter produtos específicos, foram as mesmas que as descritas em 3.10.7. Uma alíquota de cDNA obtido de macrófagos infectados (1,5h pós-infecção com NHV MOI 3) foi diluída 1:20, utilizando-se 0,5 µl desta diluição em PCR com oligómeros para *GAPDH* e 2 µl para *HPRT1*, *5-HL* e *4-CL*. Os volumes de amplificação assim obtidos foram submetidos a electroforese em gel de agarose a 2,5%, confirmando-se a obtenção de bandas de amplificação específicas. Após excisão das bandas do gel, o DNA nelas contido foi purificado através de um kit de purificação de produtos de PCR (“High Pure PCR Product Purification Kit” – Roche) segundo as instruções do fabricante, num volume final de 75 µl. Uma alíquota de 1 µl de cada produto de amplificação assim obtido foi submetido a uma segunda amplificação por PCR seguida de nova purificação, nas mesmas condições que as descritas anteriormente, de forma a obter uma quantidade generosa de DNA que permitisse uma quantificação rigorosa em espectrofotómetro. Obtiveram-se mais uma vez amplificados específicos, confirmados através de electroforese em gel de agarose a 2,5%.

Alíquotas de cada produto amplificado foram quantificadas em espectrofotómetro, determinando-se a absorvância a 260 e 280 nm. Rácios de $Abs_{260nm} / Abs_{280nm}$ de 1,8-1,9 confirmaram o seu grau de pureza. Seguidamente converteu-se a quantidade de DNA em µg para pmol através da fórmula: pmol (dsDNA) = µg (dsDNA) x 1515 / Nbp (pmol = picomoles, dsDNA = DNA de dupla cadeia, Nbp = nº de pares de bases) (em <https://www.roche-applied-science.com/labfaqs/>), e por sua vez a quantidade de pmol para nº de moléculas através do nº de Avogadro (1 mol = $6,022 \times 10^{23}$ moléculas).

3.10.9. Optimização das reacções de qPCR: eficiências da amplificação e obtenção de produtos específicos

3.10.9.1. Eficiência de amplificação do DNA standard

As condições óptimas de especificidade e eficiência de amplificação para cada par de oligómeros em qPCR foram determinadas ensaiando diferentes temperaturas de emparelhamento e/ou extensão (entre 55 e 60 °C) e diferentes concentrações de cada oligómero (de 100 a 900 nM). Para experimentar cada diferente condição, foram feitas diluições seriadas de 1:5 de cada DNA standard obtido como descrito em 3.10.8., de forma a obter uma gama de concentrações variada, de 100 000, 20 000, 4 000, 800, 160 e 32 moléculas/ μ l. Foram utilizados volumes de 2 μ l por diluição nas reacções de qPCR nas diferentes condições para optimização (utilizaram-se no mínimo 4 e máximo 6 diluições por reacção para construção das rectas padrão). Uma vez que não se observaram variações importantes entre réplicas de uma mesma diluição em ensaios consecutivos de optimização, passou a utilizar-se apenas uma diluição por cada ponto da recta. Obteve-se sempre, como parâmetro de qualidade das rectas, um coeficiente de regressão elevado ($R^2 > 0,99$).

Para amplificação utilizou-se uma mistura comercial de reacção 2 x concentrada, contendo o fluorocromo intercalador de DNA Sybr Green I bem como todos os restantes componentes necessários à polimerização, excepto oligómeros e DNA molde (iTaq SYBR Green Supermix with ROX, Bio Rad), num volume final de 20 μ l de reacção. O aparelho de qPCR utilizado foi o “7300 System” da Applied Biosystems.

Os dados de quantificação resultam da intercalação do Sybr Green I nas novas moléculas de DNA sintetizadas à medida que a amplificação progride, emitindo uma quantidade de fluorescência proporcional ao nº de moléculas existente em reacção e que é detectada pelo aparelho de qPCR. Os valores são obtidos numa fase exponencial das amplificações, antes que ocorra depleção de algum dos componentes da reacção. Para tal, é estabelecido automaticamente (pelo software do aparelho de qPCR) ou manualmente, um nível de “cycle threshold” (Ct). Este representa os ciclos de amplificação aos quais é detectado sinal de fluorescência claramente acima do “background” inicial, resultado da acumulação de produtos amplificados.

Construíram-se deste modo rectas padrão, representando o logaritmo das concentrações (em nº de moléculas) *versus* o Ct para cada DNA standard, através do software do aparelho de qPCR. O declive das curvas padrão (S) permitiu calcular a eficiência da amplificação (E) para cada condição experimental, através da fórmula: $E = 10^{-1/S} - 1$ (Revilla-Fernandez *et al.*, 2005). Foram consideradas condições óptimas aquelas em que se obteve uma eficiência de amplificação igual ou superior a 95% ($E \geq 0,95$), tendo-se verificado eficiências desta ordem para todos os pares de oligómeros, a uma concentração 500 nM, nas seguintes condições de amplificação: desnaturação inicial a 95 °C 2 min. e 45 seg.; 40 ciclos de desnaturação a 95 °C 15 seg., emparelhamento a 57 °C 15 seg., extensão a 60 °C 45 seg. Estas condições foram confirmadas pelo menos uma vez antes das quantificações de amostras.

3.10.9.2. Eficiência de amplificação de cDNA

Uma vez estabelecidas as condições óptimas de amplificação para o DNA standard, confirmou-se se a eficiência da amplificação sobre cDNA com cada par de oligómeros, nas mesmas condições, era semelhante. Este estudo foi realizado tendo em linha de conta que nas amostras de cDNA estarão presentes componentes ou concentrações de iões diferentes das do DNA standard, podendo afectar a eficiência do qPCR sobre cDNA, cuja quantificação é inferida a partir do DNA standard.

Foram feitas diluições seriadas de 1:2 de cDNA contendo sequências alvo para cada oligómero (cDNA obtido de macrófagos às 8h pós-infecção com MOI 3 de L60). Uma vez que as sequências alvo nesta amostra não tinham sido ainda quantificadas, atribuiu-se um nº de moléculas fictício a cada primeira diluição, de modo a que o software do aparelho de qPCR pudesse construir rectas padrão. Verificou-se que as sequências alvo possuíam quantidades diferentes no cDNA, pelo que foram testadas várias diluições deste, de modo a obter amplificação ao longo de pelo menos quatro diluições e em ciclos não muito tardios. Finalmente foram utilizadas as seguintes diluições de cDNA (2 µl por reacção) para cada par de oligómeros: HPR – 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64; GAP – 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256; 5HL – 1:16, 1:32, 1:64, 1:128; 4CL – 1:10, 1:20, 1:40, 1:80.

A título descritivo, a cada primeira diluição foram atribuídas: 200 moléculas a HPR, 2000 a GAP, 250 a 5HL e 6000 a 4CL. As diferentes diluições foram então

amplificadas nas condições optimizadas anteriormente para DNA standard, e a eficiência de amplificação em cDNA inferida a partir do declive das rectas padrão assim obtidas, tal como descrito anteriormente para DNA standard.

Não se utilizou a mesma amostra de cDNA (de 1,5h PI) que em 3.10.8. porque se verificou que o número de sequências alvo para o gene *5-HL* aí presentes era muito baixo, não permitindo fazer um número adequado de diluições para construção de uma recta padrão.

3.10.9.3. Especificidade dos produtos de amplificação

3.10.9.3.1. Análise de curvas de dissociação

O aparelho de qPCR utilizado foi programado para elevar a temperatura lentamente ao longo de vários minutos no final dos ciclos de amplificação. Quando o DNA de dupla cadeia resultante de uma reacção de qPCR se dissocia (quando é atingida a sua temperatura de “melting” – T_m), o aparelho grava a diminuição na fluorescência emitida pelo Sybr Green I devido à libertação deste da cadeia dupla de DNA. O software do aparelho de qPCR constrói um gráfico com os valores de fluorescência em função da temperatura, cuja análise permite verificar se existe apenas uma T_m , correspondente a um único produto de amplificação, ou se pelo contrário na mesma reacção existe mais do que uma T_m , situação em que ocorreu amplificação inespecífica.

3.10.9.3.2. Análise dos amplificados por electroforese

No final da reacção de qPCR, uma alíquota de 8 μ l foi submetida a electroforese em gel de agarose a 2,5%, TAE 1x, em paralelo com marcadores de peso molecular de DNA, de modo a confirmar a obtenção de bandas de amplificação únicas e do tamanho esperado.

3.10.10. Quantificação das sequências alvo em cDNA por qPCR

Cada amostra de cDNA foi diluída 1:10, utilizando-se alíquotas de 2 μ l em cada reacção de qPCR. Para cada sequência alvo, as alíquotas dos vários tempos de

cultura/infecção de cada ensaio foram amplificadas (em duplicado ou triplicado) em paralelo, na mesma reacção de qPCR. Paralelamente, amplificaram-se também diluições do correspondente DNA standard para construção da recta padrão. Cada recta foi obtida com 5 a 6 diluições seriadas (de 1:5, abarcando as 200 000, 40 000, 8 000, 1600, 320 e 64 moléculas), de modo a que as quantidades presentes nas amostras ficassem entre os pontos das diluições da recta.

Para normalização dos resultados de expressão dos genes virais, o nº de moléculas correspondentes a *5-HL* e *4-CL* foi dividido pelo nº de moléculas correspondentes ao gene constitutivo escolhido como controlo interno, presentes na mesma amostra de cDNA.

3.10.11. Northern blot: detecção de transcritos do gene viral *4-CL*

3.10.11.1. Electroforese de RNA e transferência para suporte sólido

1 µg de RNAs obtidos de culturas de macrófagos como descrito em 3.10.3., com 1,5h, 8h e 16h de infecção, ou de cultura controlo não infectada com 16h, foram submetidos a electroforese em hidrogel específico para RNA (Clearose RNA Mini, Elchrom) segundo as instruções do fabricante. O RNA de cultura controlo foi utilizado em paralelo para confirmar a ausência de sequências virais ou com as quais houvesse hibridação inespecífica, e por tal motivo, não se utilizaram outros tempos de cultura. Cada amostra de RNA foi misturada com um tampão contendo o desnaturante glioxal [1,5 M Glioxal (Sigma, Molecular biology grade), 75% DMSO (v/v) (Sigma, Molecular biology grade), 0,015 M TMAP pH 7 (tetramethylammonium phosphate, Elchrom)] numa proporção de 1:3. Seguiu-se desnaturação a 55 °C durante 25 minutos e transferência do tubo para gelo alguns minutos antes da electroforese. Adicionou-se a cada tubo tampão de aplicação de amostra em gel (Loading buffer 5x, 1 dye BPB, Elchrom) aplicando-se um volume máximo de 16 µl por poço. Marcadores de pesos moleculares de RNA (3 µl) foram tratados de modo semelhante (RNA Markers, Promega) antes da aplicação em gel. A electroforese decorreu em tampão TAE 1x, no aparelho de electroforese “Owl EasyCast™ horizontal B2 mini gel system” (Termofisher Scientific), aplicando-se uma voltagem de 8 V/cm durante 90 minutos. O gel foi seguidamente corado por imersão em solução de brometo de etídio (0,5 µg/ml) em água ultrapura Milli-Q durante 20

minutos, observado sobre transiluminador e fotografado com régua (Fig. 11) de forma a localizar posteriormente as distâncias de migração de cada banda do marcador de pesos moleculares de RNA em autorradiografia. A observação de bandas definidas de ambos os RNAs ribossomais permitiu verificar que o RNA não se encontrava degradado.

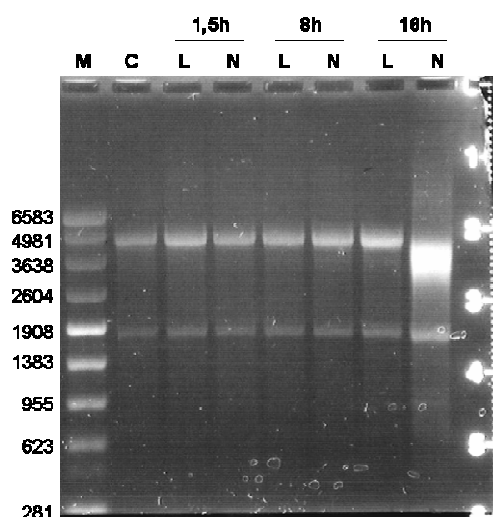


Figura 11. Electroforese de RNA total de macrófagos não infectados e infectados com L60 e NHV a vários tempos PI.

Os RNAs foram obtidos às 16h no caso de macrófagos não infectados como controlo (C), e às 1,5h, 8h e 16h PI com L60 (L) e NHV (N). Ensaio representativo de dois ensaios independentes realizados. M: marcador de pesos moleculares de RNA; o nº de bases de cada banda está assinalado do lado esquerdo da figura.

O gel foi de seguida equilibrado em tampão de transferência TAE 1,3x (Elchrom) durante 20 minutos e colocado sobre papel de filtro (Trans-blot paper, Bio Rad) e sob membrana de nylon positivamente carregada (Hybond-N⁺, Amersham Pharmacia Biotech), cortada à medida exacta do gel e alinhada com os poços deste. Colocou-se papel de filtro também sobre a membrana e o conjunto, montado em cassete de transferência, foi colocado em tanque de transferência electroforética (Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell, Bio Rad) contendo tampão previamente arrefecido a cerca de 8 °C. Foi aplicada uma amperagem de 500mA durante 4h, no final das quais o gel se tornou a corar com brometo de etídio para confirmar a transferência. A membrana húmida foi colocada sobre transiluminador, com a face contendo o RNA exposta à fonte de radiação UV (λ 300nm) durante 3 minutos, para fixação deste. As membranas assim obtidas foram guardadas a 4 °C até à sua utilização.

3.10.11.2. Construção de sondas

3.10.11.2.1. Sonda de RNA

A sonda de RNA para Northern blot foi obtida por transcrição *in vitro* a partir de plasmídio recombinante pGEM-T (Fig. 12), com a sequência do gene *4-CL* clonada entre promotores de RNA polimerases SP6 e T7. O plasmídio utilizado para esta transcrição *in vitro* foi aquele obtido para sequenciação do gene *4-CL* de L60, como descrito em 3.10.2.

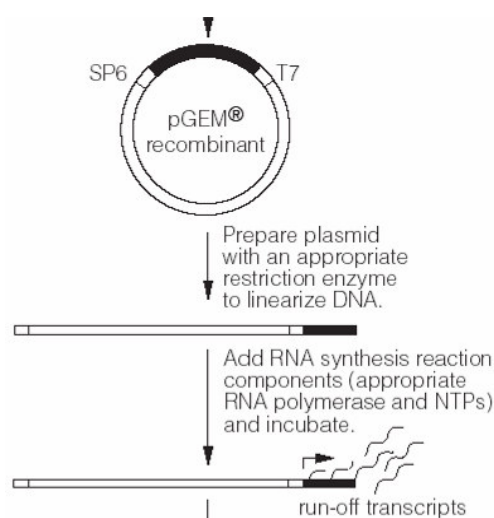


Figura 12. Representação esquemática da obtenção de sondas de RNA por transcrição *in vitro* a partir de plasmídio recombinante pGEM-T com sequências promotoras das RNA polimerases SP6 e T7.

Adaptado do folheto informativo TM016 para o produto “Riboprobe in vitro Transcription Systems” da Promega.

Conhecendo-se a orientação do inserto graças à sua prévia sequenciação, utilizou-se a RNA polimerase SP6 para transcrever a cadeia complementar ao mRNA de *4-CL* (Fig. 13, A). Para tal, o plasmídio foi linearizado com uma enzima de restrição que clivasse na sequência clonada próximo ao ATG do gene para se obter uma sonda de tamanho razoável. Utilizou-se o software disponibilizado em “SDSC Biology Workbench” (<http://workbench.sdsc.edu>, do departamento “Bioinformatics and Systems Biology” da Universidade de San Diego, California), para encontrar locais de restrição adequados na sequência de *4-CL*. Escolheu-se a enzima HindIII, com sequência alvo 100pb a jusante de ATG (Fig. 13, A), que deixa extremidades 5’ “overhang” evitando-se assim a transcrição de sequências indesejadas.

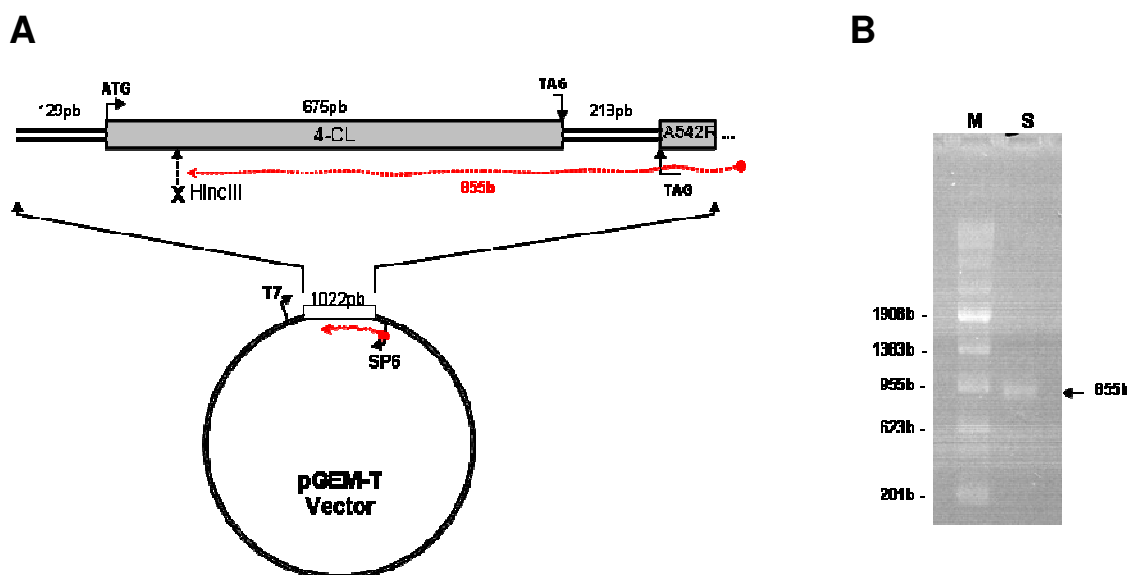


Figura 13. Sonda de RNA utilizada para detecção de mRNA de 4-CL por Northern blot.

A. Representação esquemática do processo de obtenção da sonda, por transcrição *in vitro* a partir de um plasmídeo no qual foi clonado, em local flanqueado por promotores de RNA polimerases (SP6 e T7), uma sequência de DNA viral de 1022pb incluindo o gene 4-CL. Após linearização do plasmídeo com HindIII, clivando a sequência de 4-CL cerca de 100pb a jusante de ATG, a transcrição realizou-se através de SP6 de forma a transcrever a cadeia complementar ao mRNA. Estão incluídos na sequência clonada cerca de 100pb da extremidade final do gene A542R, próximo a 4-CL mas de orientação de transcrição inversa. A vermelho está representada a sonda de RNA obtida, com cerca de 855 bases. **B.** Visualização através de electroforese em gel de agarose a 2% de uma alíquota da sonda transcrita *in vitro* (S). M: marcador de pesos moleculares de RNA (Promega). ATG e TGA: códons de iniciação e terminação da tradução respectivamente do gene 4-CL.

Utilizaram-se 3 µg de plasmídeo em digestão com 15 U de enzima HindIII (Roche) e tampão de incubação (M, Roche) num volume total de 25 µl, durante 2h a 37 °C. 1 µl do volume de digestão foi sujeito a electroforese em gel de agarose a 0,7% para confirmar a completa linearização do plasmídeo. Seguiu-se purificação deste através do “High pure PCR Product purification kit” (Roche), eluindo-se num volume final de 50 µl. Após quantificação em espectrofotómetro, utilizou-se 750 ng do plasmídeo linearizado em transcrição *in vitro* na presença de 1xNTPs (1 mM ATP, CTP, GTP; 0,65 mM UTP; 0,35 mM Biotin-16-UTP, do “Biotin RNA Labeling Mix, 10x conc.”, Roche), 40U RNA polimerase SP6 e respectivo tampão de transcrição 1x (Roche), num volume total de 20 µl. Após 2h a 37 °C adicionou-se 0,8 µl EDTA 0,5 M (pH 8,0) para parar a reacção. Para remoção de nucleótidos não incorporados, o volume de transcrição foi precipitado adicionando-se 2µl NH₄OAc 5M e 44µl de etanol 100% seguido de arrefecimento a -20 °C 1,5h. Após uma centrifugação de 20 minutos a

12000xg 2 °C, o sedimento foi lavado com 200µl etanol a 75%, centrifugado novamente 15 minutos a 12000xg 2 °C e ressuspendido em 30 µl de água livre de nucleases. Uma alíquota de 1 µl foi utilizada em electroforese em gel de agarose a 2% para confirmar a obtenção de transcritos com o tamanho desejado de 850 bases (Fig. 13, B), desnaturando-se antes da electroforese de forma semelhante à descrita para RNA em 3.10.11.1. Após quantificação em espectrofotómetro, a sonda de RNA assim obtida foi guardada a -70 °C até à sua utilização.

3.10.11.2.2. Sonda de DNA

Este tipo de sonda foi obtido por incorporação de nucleótidos marcados com biotina durante amplificação de uma região interna à sequência codificante do gene *4-CL* por PCR. Para tal foram utilizados os oligómeros (5'-3'): TGT TTC CTA AAA TAA ATA CAA TAG ATC C (*forward*) (hibridando na posição +2 a +29) e AAG CCG CAG TTT CTA CTC CA (*reverse*) (hibridando na posição +253 a +272), amplificando um total de 270 pb (Fig. 14, A). Para PCR foi utilizado cDNA obtido de culturas de macrófagos infectados, neste caso com o isolado NHV durante 12h (0,8 µl), em conjunto com 0,6 µM de cada oligómero *forward* e *reverse*, mistura de dNTPs 1x [componentes de “North2South Biotin Random Prime Kit”, Pierce, contendo dCTP conjugado com biotina (Biotin-N⁴-dCTP)], tampão de reacção 1x (Amersham) e 1,5U Taq Polimerase (Amersham), num volume total de 50 µl. Paralelamente a este, realizou-se um segundo PCR com todos os componentes semelhantes excepto os dNTPs utilizados, sem qualquer marcação com biotina, na concentração de 200 µM cada. As condições de amplificação em termociclador foram: 95 °C 2 minutos; 30 ciclos de 95 °C 20 segundos, 60 °C 30 segundos, 72 °C 30 segundos; 72 °C 7 minutos; 4 °C ∞. Alíquotas de 5 µl de cada PCR foram submetidas a electroforese em gel de agarose a 1,5% para verificar a especificidade e peso dos amplificados obtidos (Fig. 14, B). O amplificado para utilização como sonda, devido aos nucleótidos ligados a biotina incorporados, migrou mais lentamente que o amplificado com dNTPs normais como esperado, confirmando-se assim a obtenção de sonda de DNA marcada com biotina.

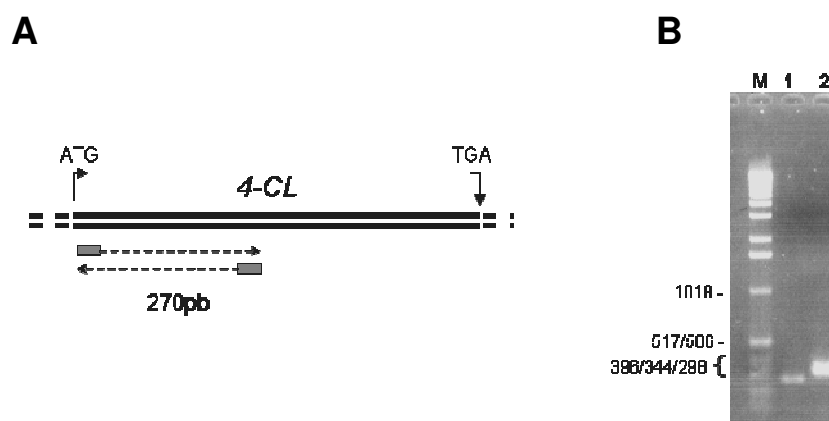


Figura 14. Sonda de DNA marcada com biotina para detecção de mRNA de *4-CL* em Northern blot.

A. Representação esquemática do processo de obtenção da sonda por PCR. Os retângulos cinzentos no esquema representam a localização dos oligómeros utilizados para amplificação da região inicial da sequência codificante do gene *4-CL*, da posição +2 à +272.

B. Visualização através de electroforese em gel de agarose a 2%, de alíquotas de PCR com os oligómeros atrás referidos utilizando dNTPs normais (1) e com dCTP conjugado com biotina (2), que aumenta o peso molecular da sequência amplificada. M: marcador de pesos moleculares de DNA (X, Roche).

3.10.11.3. Hibridação e detecção por quimioluminescência

Neste processo utilizaram-se soluções de hibridação, lavagem e detecção do kit “North2South Chemiluminescent Hybridization and Detection Kit” (Pierce), segundo instruções do fabricante com pequenas alterações. Brevemente, as membranas contendo RNA foram colocadas em tubos de 50 ml (Nunc) e lavadas com 15 ml de solução contendo 2 x SSC (0,3 M NaCl, 0,03 M Citrato de sódio, pH 7,0), 0,5% SDS e 1 mM EDTA durante 30 minutos a 55 °C com o tubo em rotação. Removeu-se esta solução e adicionou-se no caso de sonda de RNA, solução de hibridação (≈ 6 ml) previamente aquecida a 70 °C, suplementada com 30 µg/ml RNA de levedura (Roche) e 1% SDS. Seguiram-se 30 minutos de pré-hibridação a 70 °C em estufa de hibridação com rotação. Desnaturou-se sonda de RNA a 80 °C 10 minutos seguido de arrefecimento em gelo 5 minutos, e adicionou-se à solução de hibridação numa concentração final de 5 ng/ml. A hibridação decorreu durante 16h a 70 °C em estufa de hibridação com rotação. No caso de sonda de DNA, não se adicionou SDS à solução de hibridação e a temperatura de pré-hibridação e hibridação foi de 55 °C. A desnaturação desta sonda foi a 100 °C, adicionando-se um volume de 2 µl por ml de solução de hibridação.

As lavagens adstringentes pós hibridação das membranas foram feitas com 20ml de solução contendo 0,5 x SSC, 0,2% SDS, previamente aquecida a 70 °C no caso de sonda de RNA ou a 55 °C no caso de sonda de DNA, num total de 3 lavagens durante 20 minutos em estufa de hibridação com rotação.

No processo de detecção quimioluminescente utilizaram-se as soluções componentes do kit segundo as instruções do fabricante sem alterações. Brevemente, esta detecção é baseada na incubação das membranas com solução contendo estreptavidina conjugada com enzima peroxidase (HRP, “horse radish peroxidase”), que se liga à biotina presente nas sondas hibridadas ao RNA da membrana. Seguiu-se a incubação da membrana com uma solução substrato com peróxido e luminol e exposição a filme de radiografia, por períodos de 1 a 30 minutos consoante a intensidade de sinal desejada.

3.10.11.4.Determinação da dimensão de transcritos de 4-CL

A dimensão de cada transcrito foi determinada a partir das distâncias de migração das bandas de marcador de pesos moleculares de RNA em cada electroforese. Para tal, construiu-se uma recta padrão com o logaritmo do nº de bases de cada banda do marcador *versus* a distância migrada em gel durante electroforese. A partir da equação da recta obtida (construída através do programa Microsoft Excel), foi inferida a dimensão de cada transcrito desconhecido, determinando-se a sua distância de migração medida a partir da imagem de autorradiografia de Northern blot.

3.11. Western blot

3.11.1. Preparação de extractos proteicos de macrófagos

Foram obtidos extractos proteicos de culturas de macrófagos após diferentes infecções e/ou tratamentos através de duas metodologias: a partir de fracção de fenol-etanol guardada durante a extracção de RNA com Trizol (em 3.10.3), que foi posteriormente processada segundo as instruções do fabricante (Invitrogen) de forma a extrair proteína das mesmas amostras, e através do kit “CasPACE Assay System, Colorimetric” (Promega) (como descrito em 3.8.3). A proteína presente nos

diferentes extractos foi quantificada através do reagente Bradford segundo instruções do fornecedor (Sigma).

3.11.2. Electroforese de proteínas em gel de poliacrilamida / SDS

25 µg de proteína foram fraccionadas por cada condição através de electroforese em géis de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE). Utilizaram-se géis descontínuos compostos por um gel concentrador com 4% (p/v) de poliacrilamida e um gel de resolução com 12% (pesquisa de proteína 4-CL) ou 15% (pesquisa de caspase-3) de poliacrilamida. Os géis de resolução prepararam-se com as seguintes soluções de trabalho:

<u>Solução concentrada:</u>	<u>Proporção do volume final:</u>
30% Acrilamida/Bisacrilamida (Bio Rad)..... (mistura 37,5:1)	o volume necessário para a concentração final pretendida
Tris HCl 1,5 M pH 8,8.....	25% (v/v)
SDS 10%.....	1% (v/v)
H ₂ O.....	q.b. para o volume pretendido
<u>Para polimerização:</u>	
Persulfato de amónio 10% (p/v).....	0,05% (v/v)
N,N,N',N'-tetrametiletenodiamina (TEMED)...	0,05% (v/v)

O gel de resolução assim preparado foi vertido entre duas placas de vidro (componentes do aparelho de separação electroforética utilizado Mini-PROTEAN 3, Bio Rad) e sobreposto por um pequeno volume de água até polimerizar. Removeu-se a água e verteu-se de seguida o gel concentrador, preparado como descrito acima para o gel de resolução mas substituindo a solução Tris HCl 1,5 M pH 8,8 por uma solução Tris HCl 0,5 M pH 6,8 e utilizando o dobro da quantidade de TEMED. Colocou-se de seguida um pente apropriado para a criação de poços no gel para aplicação das amostras e deixou-se polimerizar. Às amostras de proteína foi adicionado na proporção de 1:1 tampão de amostra 2x concentrado contendo: 2% SDS (p/v), 25% glicerol (v/v), 0,0625 M Tris HCl pH 6,8, 0,01% azul de bromofenol (p/v) e 5% β-Mercaptoetanol (v/v), seguindo-se desnaturação em banho em água fervente durante 5 minutos e banho de gelo até aplicar no gel. No caso de Western

blot para detecção da proteína viral 4-CL, aplicou-se também em gel uma alíquota de 0,5 µg desta proteína purificada (gentilmente cedida por Yolanda Revilla, CBMSO, Madrid). Em paralelo com as amostras, uma mistura de proteínas de massa molecular conhecida composta por: Miosina (200 kDa), β-galactosidase (116,25 kDa), Fosforilase b (97,4 kDa), Albumina sérica (66,2 kDa) Ovalbumina (45 kDa), Anidrase carbónica (31 kDa) Inibidor de tripsina (21,5 kDa), Lisozima (14,4 kDa), Aprotinina (6,5 kDa) e α-lactoalbumina (14,4 kDa) (SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range – Biorad) foi misturada com tampão de amostra na proporção de 1:20 e desnaturada de forma semelhante. A electroforese decorreu em tampão de corrida Tris-Glicina contendo 25 mM Tris base, 192 mM Glicina, 0,1% SDS (p/v) sob uma diferença de potencial de 200 V durante cerca de 40 minutos.

3.11.3. Transferência para suporte sólido

O gel de poliacrilamida foi transferido para cassete de transferência (componente do aparelho de transferência utilizado “Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer cell”, Bio Rad) colocando-se sobre papel de filtro espesso (Trans-blot paper, Bio Rad) e sob uma membrana de nitrocelulose (Bio Rad) cortada à medida exacta do gel. Colocou-se novo papel de filtro sobre a membrana e o conjunto assim montado foi colocado no aparelho de transferência com tampão composto por 25 mM Tris base, 192 mM glicina, 0,1% SDS (p/v) e 20% metanol (v/v), previamente arrefecido a 8 °C. Aplicou-se uma voltagem de 30 V para transferência durante a noite ou de 100 V para transferência rápida de 1h, com refrigeração. Terminada a transferência, a membrana foi corada em solução Ponceau-S (Schleicher and Schuell) até se visualizarem os marcadores de peso molecular. Retirou-se o excesso de corante com água e cortou-se a porção da membrana com os marcadores, guardando-se entre papel de filtro. O gel foi corado por imersão em solução corante (azul de coomassie R250 (Merck) 0,2% (p/v), metanol 50% (v/v), ácido acético 10% (v/v)) por um tempo não inferior a 2h, com agitação constante, de forma a confirmar a eficácia da transferência. Para remover o excesso de corante colocou-se o gel numa solução de metanol 5% (v/v), ácido acético 7,5% (v/v), juntamente com um pequeno pedaço de esponja para absorver o corante.

3.11.4. Detecção de proteínas

As membranas foram transferidas para tubos de 50 ml (Nunc) e bloqueadas em 15 ml de solução de TBS (25 mM Tris base, 137 mM NaCl, pH 7,6) com 0,1% Tween 20 (v/v) e 5% leite magro em pó (p/v), em rotação constante, à temperatura ambiente durante 2h ou durante a noite a 4 °C. Seguiram-se 3 lavagens de 5 minutos em rotação com solução TBS com 0,1% Tween (TBS/T) (cerca de 10 ml) e adição de um volume de cerca de 6 ml de nova solução de TBS/T/5% leite magro com o anticorpo primário pretendido: contra caspase-3 a 1:1000 (v/v) (9662, Cell Signaling Technology), contra proteína viral 4-CL a 1:750 (v/v) (soro obtido em coelho cedido gentilmente por Yolanda Revilla, CBMSO – Madrid). A hibridação decorreu durante a noite a 4 °C com os tubos em rotação. Para remoção do excesso de anticorpo não ligado lavaram-se as membranas 3 vezes 10 minutos em 15 ml TBS/T, ao que se seguiu a incubação com anticorpo secundário conjugado com peroxidase (soro policlonal de cabra contra imunoglobulinas de coelho – P 0448, Dako) diluído 1:50000 em TBS/T/5% leite magro, durante 1-2h à temperatura ambiente em rotação. Após novas lavagens como anteriormente, para a detecção dos anticorpos ligados adicionou-se à superfície da membrana um substrato quimioluminescente (West Femto – Pierce) segundo instruções do fabricante. Envolheu-se de seguida a membrana em película aderente e expôs-se sob chapa de autorradiografia (Kodak) em cassete protegida da luz. A revelação foi realizada em revelador automático. As bandas reveladas em autorradiografia foram quantificadas por análise de densitometria através do programa de análise de imagem “ImageMaster TotalLab” v1.00 (Amersham Pharmacia Biotech).

3.12. Análise estatística de resultados

A análise estatística dos resultados obtidos foi realizada através do teste Anova para medições repetidas, com pós-teste de Tukey, e do teste t emparelhado (paired t-test). No caso em que não foi possível obter amostras emparelhadas foi referido no respectivo texto o tipo de teste estatístico utilizado. Antes de qualquer análise, os dados foram transformados nos seus logaritmos ($Y = \text{Log}_{10}$) para uma aproximação máxima à distribuição normal. Utilizou-se o software Instat Graphpad v.3. considerando-se estatisticamente significativas diferenças em que $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Avaliação de parâmetros da infecção com L60 e NHV em culturas de macrófagos de suíno

Os nossos estudos tiveram como objectivo comparar o efeito da infecção *in vitro* pelos isolados de VPSA de diferente virulência, L60 de alta virulência, e NHV de baixa virulência, nos mecanismos de morte celular de macrófagos de suíno. Para tal, compararam-se em primeiro lugar alguns aspectos relativos à infecção com ambos os isolados em culturas primárias de macrófagos, nomeadamente a propósito da capacidade de produção de progenia viral e do número de células infectadas em cultura.

Para identificar possíveis diferenças ao nível da capacidade de replicação viral nas células hospedeiras, quantificou-se a progenia viral libertada de células infectadas em paralelo com cada isolado viral a uma MOI 5, utilizada em rotina do laboratório para infecção de culturas de macrófagos e posterior isolamento de vírus. Às 18h pós-infecção (PI) o sobrenadante das culturas foi colhido e titulado, mais uma vez em paralelo, de forma a comparar a quantidade de vírus acumulado no meio de cultura. Como representado na Figura 15, não se encontrou uma diferença significativa nos títulos virais resultantes de infecção por L60 ou NHV em culturas de macrófagos de suíno.

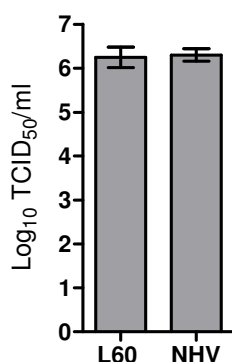


Figura 15. Títulos virais no sobrenadante de culturas de macrófagos de suíno após 18h de infecção com MOI 5 de L60 e NHV.

Os resultados representam a média de quatro ensaios independentes \pm erro padrão, com infecções realizadas em paralelo em células com origem no mesmo suíno a cada ensaio.

O número de células infectadas em cultura foi determinado em duas fases diferentes da infecção, nas quais a maioria dos nossos estudos mais adiante reportados decorreram: às 8h PI, correspondendo uma fase precoce do ciclo viral em que a replicação do DNA viral está em curso, e às 18h PI, fase tardia que permite a conclusão da replicação e morfogénese virais. Estudos preliminares mostraram não haver uma diferença significativa no número de células infectadas com MOI 5 ou 3 de ambos os isolados, pelo que se passou a utilizar uma MOI 3, permitindo uma poupança significativa de vírus. Adicionalmente, MOIs semelhantes ou mesmo inferiores foram utilizadas por outros autores em estudos no âmbito da modulação de apoptose por VPSA (Hurtado *et al.*, 2004, Neilan *et al.*, 1997a, Ramiro-Ibanez *et al.*, 1996). Após 8h e 18h de infecção determinou-se a percentagem de células infectadas nas culturas através de imunofluorescência (Fig. 16, A). Os resultados obtidos revelaram que esta percentagem não difere significativamente entre os dois isolados virais em ambas as fases de infecção (Fig. 16, B).

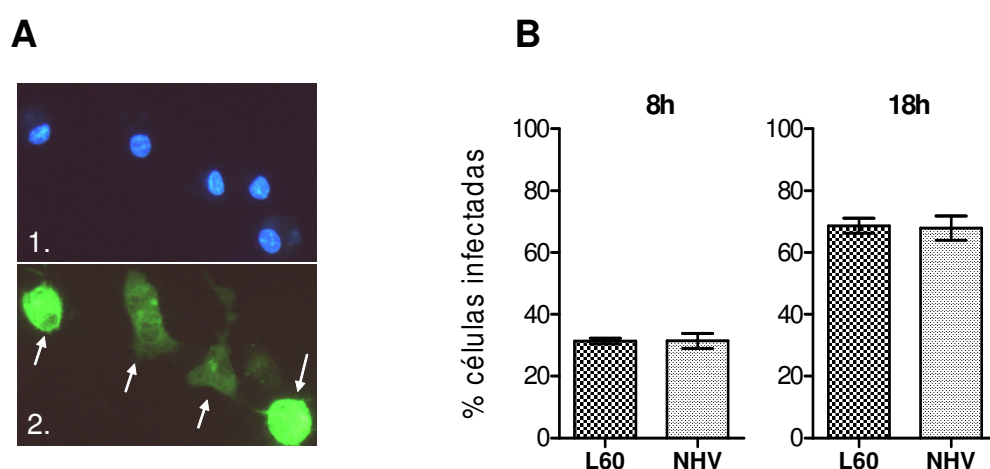


Figura 16. Quantificação de macrófagos infectados em culturas inoculadas com L60 e NHV, a tempos precoce (8h) e tardio (18h) de infecção com MOI 3.

A. Observação através de microscopia de fluorescência: visualização do nº total de células através de coloração com Hoechst 33258 (1.) e visualização das células infectadas através de imunofluorescência com soro anti-VPSA conjugado com FITC (2.), numa cultura às 18h PI. **B.** Percentagem de células infectadas. Os dados representam as médias de 4 ensaios \pm erro padrão, tendo sido contadas um mínimo de 200 células por cada infecção. As infecções foram realizadas em paralelo em culturas de macrófagos com origem no mesmo suíno a cada ensaio.

Verificou-se no entanto uma baixa percentagem de infecção a tempo precoce, de cerca de 31 % das células em cultura, que aumentou a tempo tardio para, em média, 68 %. Em estudos de outros autores, utilizando uma MOI muito superior (MOI 10) àquela por nós utilizada para infecção de macrófagos de suíno, obtidos em condições semelhantes, verificou-se que mesmo após 24h, uma proporção significativa das células permaneceu resistente à infecção (entre 30 a 60%) (McCullough *et al.*, 1999). Os autores relacionaram esta observação com o facto de os macrófagos nas culturas primárias apresentarem estádios variáveis de diferenciação. Deste modo, tendo em consideração que a utilização de MOIs muito superiores não garante uma maior proporção de células infectadas nas nossas condições de cultura, os nossos estudos foram prosseguidos com a MOI 3.

4.2. Efeito da infecção por L60 e NHV no desencadeamento de morte celular em macrófagos de suíno

4.2.1. Sobrevivência celular ao longo da infecção

Numa primeira aproximação aos estudos de morte celular após infecção com VPSA de diferente virulência, comparámos a viabilidade de culturas de macrófagos ao longo da infecção com cada um dos isolados virais em estudo. Assim, aos tempos precoce (8h), tardio (18h) e muito tardio (40h) PI, determinámos por comparação com culturas não infectadas realizadas em paralelo, o grau de sobrevivência das células a cada infecção, através da sua capacidade para metabolizarem um composto específico (MTS). Às 18h PI observou-se um decréscimo na viabilidade das células infectadas, de nível semelhante para ambas as infecções, que não foi contudo muito expressivo (Fig. 17). Às 40h PI observou-se já um decréscimo considerável na viabilidade celular, mais pronunciado na infecção com L60. A infecção pelo isolado de alta virulência parece ter um efeito mais deletério para as células hospedeiras, apenas evidente no entanto numa fase muito tardia de infecção.

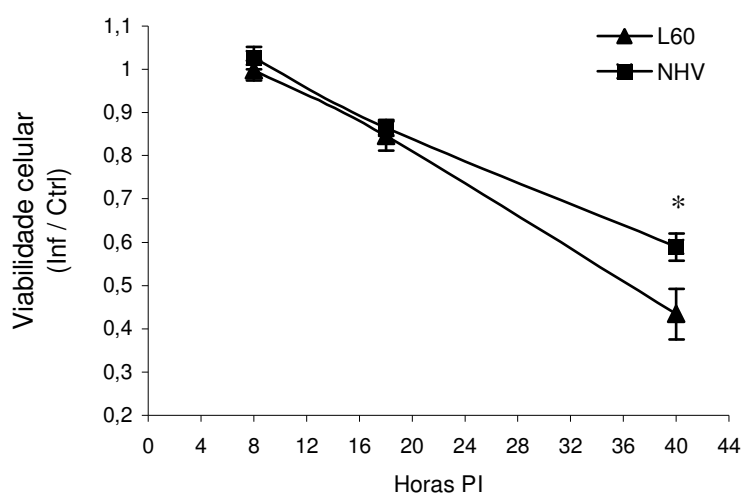


Figura 17. Determinação da viabilidade celular em infecção com L60 e NHV a vários tempos pós-infecção (PI).

Os resultados representam a média \pm erro padrão de 6 ensaios independentes às 8h e 18h e 4 ensaios às 40h. A cada ensaio os resultados corresponderam à razão entre valores obtidos em culturas infectadas e em culturas controlo não infectadas (Inf / Ctrl), realizadas em paralelo a cada ensaio com células provenientes do mesmo suíno. * $p < 0,05$.

4.2.2. Pesquisa de indicadores de apoptose em culturas infectadas

4.2.2.1. Parâmetros qualitativos indicadores de apoptose

A indução de apoptose na célula hospedeira natural da infecção, o macrófago de suíno, por isolados de VPSA altamente virulentos, quer *in vivo* quer *in vitro*, foi anteriormente descrita por outros autores (Neilan *et al.*, 1997a, Ramiro-Ibanez *et al.*, 1996, Salguero *et al.*, 2005). Com o intuito de verificar se a morte celular observada na infecção com os isolados de diferente virulência em estudo seria resultante de indução de apoptose, extraiu-se DNA de culturas infectadas e não infectadas como controlo, a diferentes tempos de infecção ou cultura. Para obtenção de um controlo positivo de apoptose, culturas realizadas em paralelo foram tratadas com os químicos CHX ou STS, que se verificou serem indutores de apoptose eficazes no nosso sistema celular (ver 4.3.1). As amostras de DNA obtidas nas diferentes condições foram submetidas a electroforese para visualização do seu padrão de migração (Fig.18).

Ao tempo precoce de 8h PI não se observou uma indução clara de apoptose, apresentando as células infectadas e células controlo um padrão semelhante de migração do DNA, ao contrário do padrão em escada claramente visível nas células tratadas com CHX ou STS, resultante de fragmentação internucleossómica (FIN) do DNA (Fig. 18, A). Num dos ensaios representados às 8h PI, observou-se um ligeiro padrão de migração em escada nas células controlo, presente no entanto com intensidade semelhante nas células infectadas do mesmo ensaio [Fig. 18, A, 8h (1)]. Este resultará de alguma apoptose basal, de expressão variável e inerente a estas culturas primárias, que se verificou em alguns dos ensaios realizados. Noutros ensaios independentes realizados ao mesmo tempo de infecção não se observou qualquer padrão apoptótico nas células controlo [Fig. 18, A, 8h (2)]. Aos tempos tardios de 16h ou 24h observou-se já um padrão de migração do DNA em escada em ambas as infecções (Fig. 18, B). A morte celular observada como descrito previamente em 4.2.1., resultará assim, pelo menos em grande parte, do desencadeamento de apoptose nas células hospedeiras, induzida não só pelo isolado de alta virulência mas também pelo de baixa virulência.

Nas electroforeses de DNAs extraídos com um dos kits utilizados para estes estudos, o “High Pure Viral Nucleic Acid Kit” (Roche), observou-se a presença de

uma banda mais intensa na região dos 1000 pb [Fig. 18, A 8h (2), B, C]. Verificou-se no entanto que esta banda corresponde a RNA (provavelmente o ribossomal 18S), purificado em conjunto com o DNA através deste kit, uma vez que o tratamento com RNase A de amostras em que era visível esta banda levou ao seu desaparecimento (Fig. 18, C).

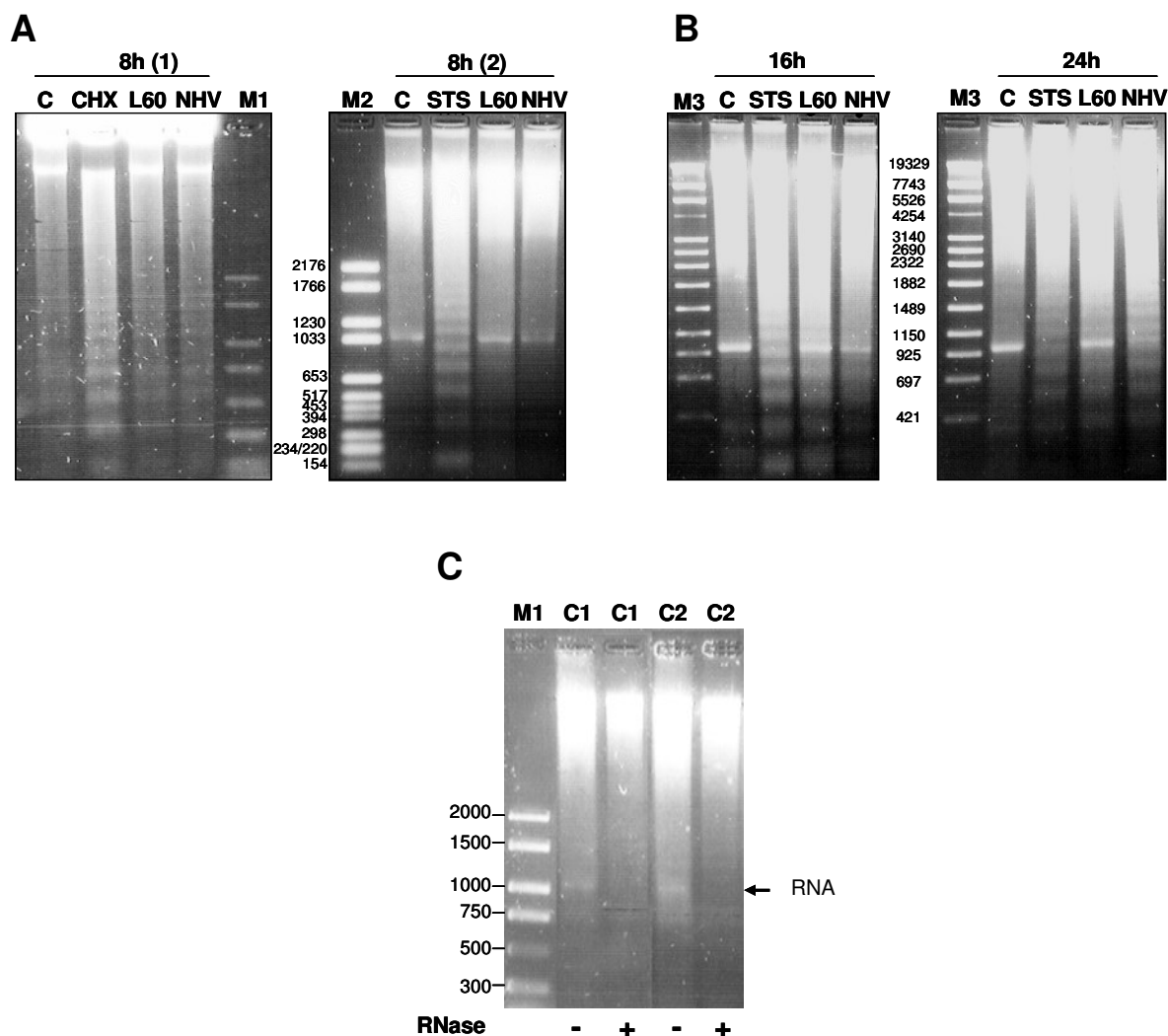


Figura 18. Visualização do padrão de migração em electroforese de DNA extraído de culturas de macrófagos a diferentes tempos de infecção (L60 e NHV) ou cultura (C).

A cada ensaio, numa das culturas foi induzida apoptose com CHX (10µg/ml durante 8h) ou STS (0,5 µM durante 8h, 0,25 µM durante 16h ou 24h), para obtenção de controlos positivos de apoptose com padrão de migração do DNA em escada. **A.** Tempo precoce de infecção. Estão representados dois ensaios independentes em que o DNA foi extraído com dois kits diferentes, o “Suicide-Track DNA ladder isolation kit” (Oncogene) (1) e o “High Pure Viral Nucleic Acid Kit” (Roche) (2), o kit utilizado nas extracções subsequentes e que purifica RNA em conjunto com DNA. **B.** Tempos tardios de infecção. **C.** DNA de culturas controlo, extraído com o kit “High Pure Viral Nucleic Acid Kit” (Roche), em dois ensaios independentes (C1 e C2), antes e após tratamento com RNase A para verificar a origem da banda que surge na região de 1000 pb. M1 – marcador de pesos moleculares de DNA fornecido com o kit “Suicide-Track DNA ladder isolation kit” (Oncogene); M2 e M3 – “DNA Molecular Weight Marker” VI e IV respectivamente (Roche).

Avaliou-se ainda o efeito dos isolados em estudo no desencadeamento de apoptose em culturas infectadas através da visualização da morfologia nuclear por microscopia de fluorescência, recorrendo-se ao fluorocromo de DNA Hoescht 33258. Em culturas controlo não infectadas e infectadas com cada um dos isolados virais, realizadas em paralelo, identificaram-se a tempos precoce e tardio de infecção (8h e 18h respectivamente) as células apoptóticas e as células não apoptóticas (Fig. 19, A).

Nestes ensaios detectou-se às 8h um aumento de células apoptóticas nas culturas infectadas, em comparação com culturas controlo (Fig 19, A e B). Observou-se ainda maior significância em infecção por NHV, embora a diferença relativamente a L60 fosse mínima (Fig 19, B). Mais tardiamente na infecção, às 18h PI, a percentagem de células em apoptose aumentou, não se detectando qualquer diferença estatística entre as infecções por L60 e NHV. No entanto, uma vez que é possível a ocorrência de subjectividade na interpretação das imagens através da metodologia utilizada, que também não permite a avaliação da extensão dos danos de apoptose nas células em estudo, recorreu-se a metodologias quantitativas de parâmetros bioquímicos indicadores de apoptose, como se reporta seguidamente.

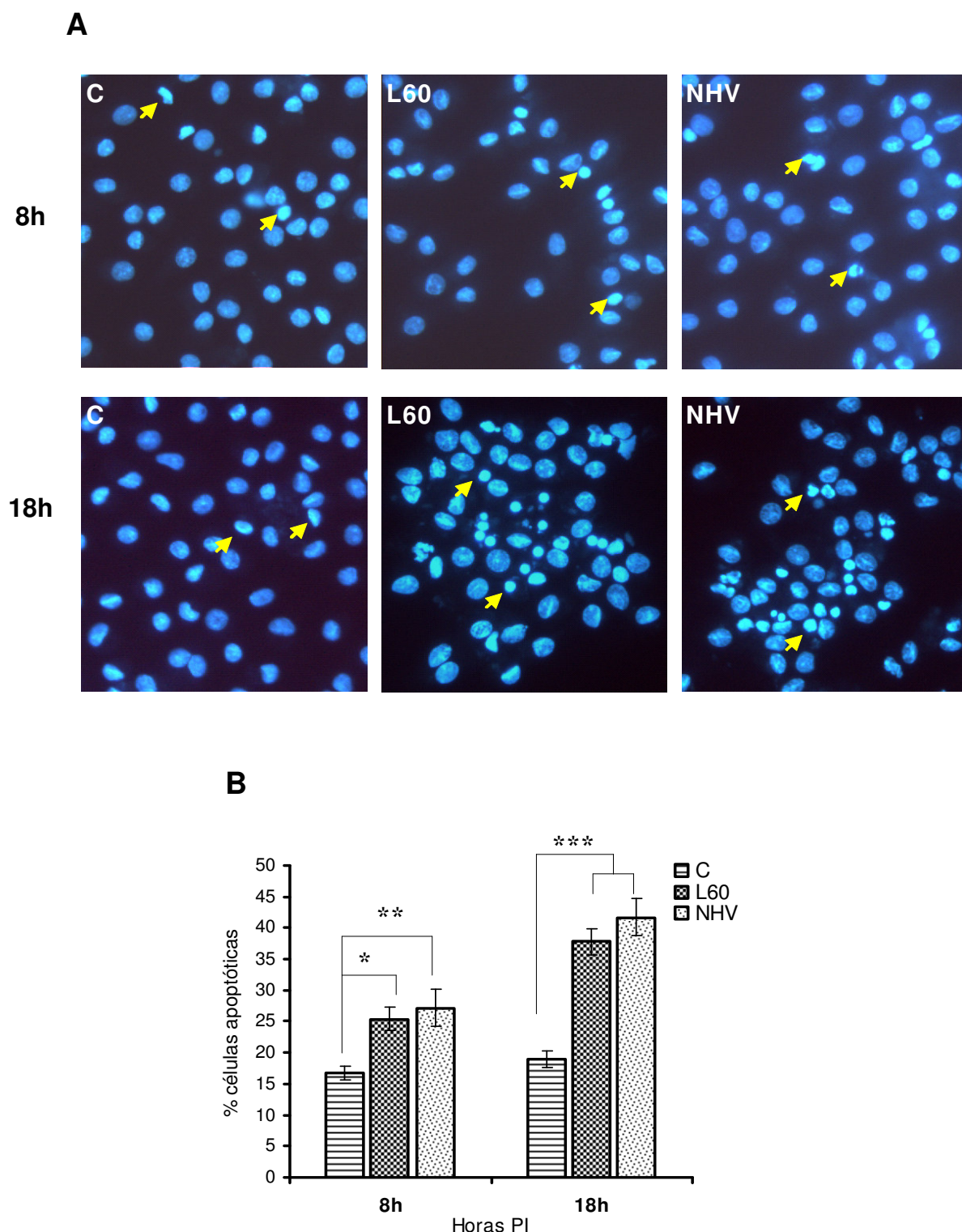


Figura 19. Avaliação de apoptose através da observação da morfologia nuclear em culturas infectadas com L60 e NHV e controle não infectadas (C) a tempo precoce (8h) e tardio (18h) da infecção.

A. Observação dos núcleos corados com Hoescht 33258 por microscopia de fluorescência; **B.** Percentagem de células apoptóticas. Os dados representam a média de 6 e 7 ensaios independentes \pm erro padrão, às 8h e 18h respectivamente. Infecções e controle foram realizadas em paralelo, em células com origem no mesmo suíno a cada ensaio.

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

4.2.2.2. Quantificação de indicadores bioquímicos de apoptose: actividade de caspase-3 e fragmentação internucleossómica de DNA

A activação de caspases efectoras como caspase-3 e FIN de DNA, constituem o culminar das vias de sinalização apoptótica, extrínseca ou de receptores membranares, e intrínseca ou mitocondrial (Fan *et al.*, 2005). Ambas foram utilizadas para comparar os níveis de apoptose ao longo da infecção em macrófagos pelos isolados de VPSA em estudo. A actividade de caspase-3 foi determinada em extractos proteicos celulares através da sua capacidade de clivagem do substrato específico DEVD-pNA. A acumulação de oligonucleossomas de DNA nos citoplasmas celulares, resultantes de FIN, foi quantificada por técnica de “sandwich” ELISA utilizando anticorpos específicos contra histonas e DNA após lise das células.

A título preliminar pesquisou-se nas infecções por L60 e NHV a ocorrência de lise celular após 8h ou 18h de infecção, através da quantificação de oligonucleossomas de DNA nos sobrenadantes destas culturas, e nos de culturas não infectadas realizadas em paralelo como controlo. A este propósito, não se observaram diferenças entre culturas infectadas e não infectadas, pelo que o VPSA não parece conduzir a lise das células nos periodos de infecção estudados, em acordo com uma indução de morte celular por apoptose como descrito nos resultados anteriores.

Detectou-se a tempo precoce de infecção um aumento, embora subtil, de actividade de caspase-3 em ambas as infecções, comparativamente com células controlo não infectadas [Fig. 20, A, 1. (8h)]. Ao mesmo tempo pós-infecção, observou-se um aumento igualmente subtil na FIN de DNA em infecção com L60, mas com NHV este aumento foi mais expressivo [Fig. 20, B (8h)]. A tempo tardio de infecção, os níveis de actividade de caspase-3 aumentaram apenas ligeiramente em infecção com L60, ao contrário de infecção com NHV, em que ocorreu um aumento expressivo deste parâmetro de apoptose [Fig. 20, A, 1. (18h)]. Detectou-se ainda claramente em Western blot, o fragmento activo de caspase-3 nas células infectadas por NHV às 18h PI, mas não por L60 [Fig. 20, A, 2. (18h)], pelo que nesta última infecção, a inibição da actividade de caspase-3 parece ocorrer ao nível do processamento proteolítico da procaspase em enzima activa. Por outro lado, a FIN de DNA aumentou em ambas as infecções a tempo tardio, e apesar de ser ligeiramente superior em infecção com NHV, resultando numa diferença

estatisticamente significativa, esta diferença parece ser pouco expressiva [Fig. 20, B (18h)]. Apesar da inibição da actividade de caspase-3 ao longo da infecção com L60 comparativamente à infecção por NHV, não se observou uma correspondente diminuição da FIN do DNA em culturas infectadas por L60.

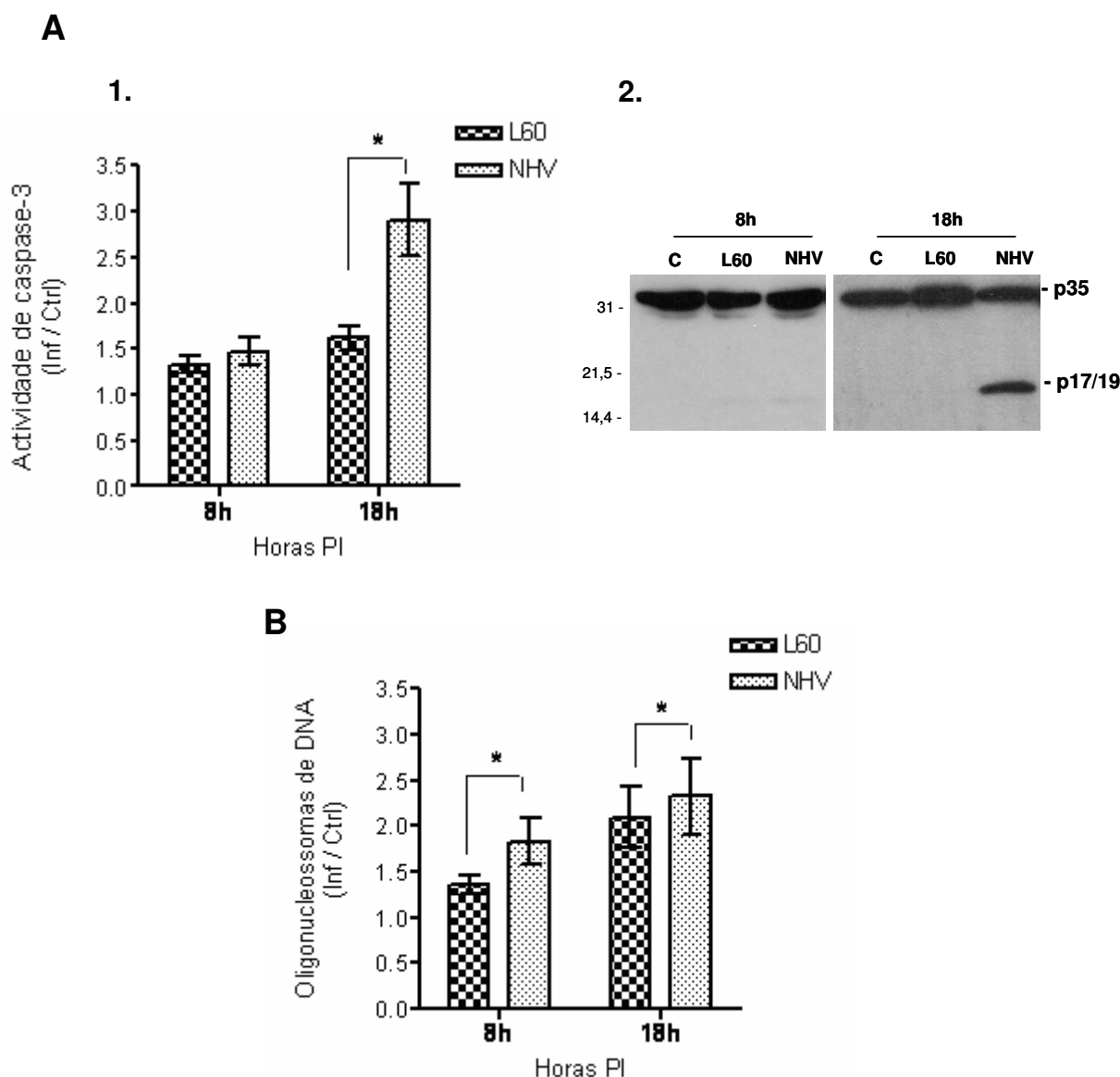


Figura 20. Quantificação de apoptose em culturas infectadas com L60 e NHV, às 8h e 18h PI, por comparação com culturas controlo não infectadas (C) realizadas em paralelo.

A. Caspase-3 em extractos proteicos celulares: quantificação da actividade enzimática (1) e visualização por Western blot, do fragmento activo (p17/19) resultante de clivagem proteolítica de procaspase-3 (p35) (2). **B.** Quantificação de oligonucleossomas citoplasmáticos de DNA por ELISA. Os resultados nos gráficos representam a média de 5 a 8 ensaios independentes \pm erro padrão. A cada ensaio os resultados corresponderam à razão entre valores obtidos em culturas infectadas e em culturas controlo não infectadas (Inf / Ctrl). O resultado de Western blot é representativo de 3 ensaios independentes realizados. Infecções e controlo foram realizados em paralelo em células com origem no mesmo suíno a cada ensaio. * $p < 0,05$.

4.2.2.3. Determinação da relevância de caspases no desencadeamento de apoptose e morte celular a tempo tardio de infecção

Com o objectivo de averiguar a importância de caspases no processo de morte celular por apoptose induzida pelas infecções em estudo, recorreu-se ao inibidor geral e irreversível de caspases zVAD-fmk (Ekert *et al.*, 1999). O zVAD-fmk foi preliminarmente testado como inibidor de caspases em macrófagos de suíno nas concentrações de 50 μ M (recomendada pelo fornecedor) e 100 μ M. Ambas as concentrações diminuíram os níveis de actividade de caspase-3 de culturas tratadas com CHX como indutor de apoptose, para níveis semelhantes ou ligeiramente inferiores aos de uma cultura controlo não tratada realizada em paralelo (Fig. 21). Passou assim a utilizar-se a concentração de 50 μ M zVAD-fmk, que se verificou ser eficaz na inibição de caspase-3 no nosso modelo celular.

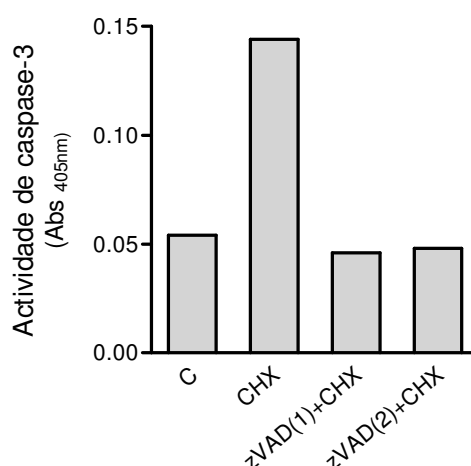


Figura 21. Efeito do inibidor de caspases zVAD-fmk nos níveis de actividade de caspase-3 em macrófagos de suíno tratados para indução de apoptose com CHX.

O composto zVAD-fmk (zVAD) foi adicionado às culturas nas concentrações de 50 μ M [zVAD(1)] e 100 μ M [zVAD(2)], seguido da adição de 10 μ g/ml CHX. Culturas sem qualquer tratamento (C) e tratadas apenas com CHX foram também utilizadas como controlos negativo e positivo de apoptose respectivamente. Após 8h de incubação determinou-se a actividade enzimática de caspase-3 nas várias condições.

Culturas não infectadas e infectadas com L60 ou com NHV, foram tratadas com zVAD-fmk no início de cada cultura/infecção, pesquisando-se mais uma vez os níveis de actividade de caspase-3 e FIN de DNA após 18h de incubação. Tal como esperado, observou-se uma clara inibição da actividade de caspase-3 após tratamentos com zVAD-fmk em culturas infectadas (Fig. 22). Curiosamente, esta

inibição foi notória também numa cultura controlo tratada paralelamente com este inibidor, parecendo indicar uma activação de níveis basais de caspase-3, talvez como resultado do envelhecimento progressivo dos macrófagos em cultura primária. Por outro lado, a activação de caspases, nomeadamente caspase-3, foi relatada como sendo um processo que ocorre durante a diferenciação de monócitos humanos em macrófagos induzida por M-CSF, sem que ao mesmo tempo seja desencadeada apoptose (Sordet *et al.*, 2002). É possível que nas culturas primárias de macrófagos de suíno utilizadas nos nossos estudos o mesmo ocorra, uma vez que são constituídas por células diferenciadas por aderência ao suporte de cultura.

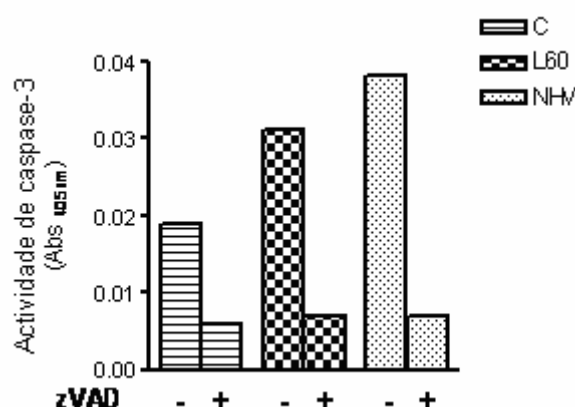


Figura 22. Efeito do inibidor de caspases zVAD-fmk, nos níveis de actividade de caspase-3 em macrófagos de suíno não infectados ou infectados com L60 e NHV durante 18h. O zVAD-fmk (zVAD) foi adicionado na concentração de 50 μ M no início da cultura (C) ou infecções (L60, NHV). Culturas sem tratamento, infectadas ou não, foram realizadas em paralelo. Após 18h de incubação, os níveis de actividade de caspase-3 foram determinados nas várias condições.

Concordantemente, não se observou diminuição dos níveis de FIN com a adição de zVAD-fmk a culturas controlo (Fig. 23, A, gráfico C), o que parece indicar que a actividade de caspase-3 observada não induzirá apoptose, podendo resultar do processo de diferenciação das células.

Em células infectadas, quer por L60 quer por NHV, o tratamento com zVAD-fmk levou a uma redução pouco expressiva da FIN de DNA, ficando esta sempre a níveis claramente superiores aos de células controlo avaliadas em paralelo (Fig. 23, A, gráficos L60 e NHV). Resultado semelhante foi obtido ao comparar o padrão de migração do DNA em electroforese (Fig. 23, B). A FIN do DNA, claramente visível a tempo tardio de infecção, ocorreu mesmo na presença de zVAD-fmk, sugerindo que

este acontecimento tardio do processo apoptótico é induzido, pelo menos parcialmente, de modo independente da actividade de caspases.

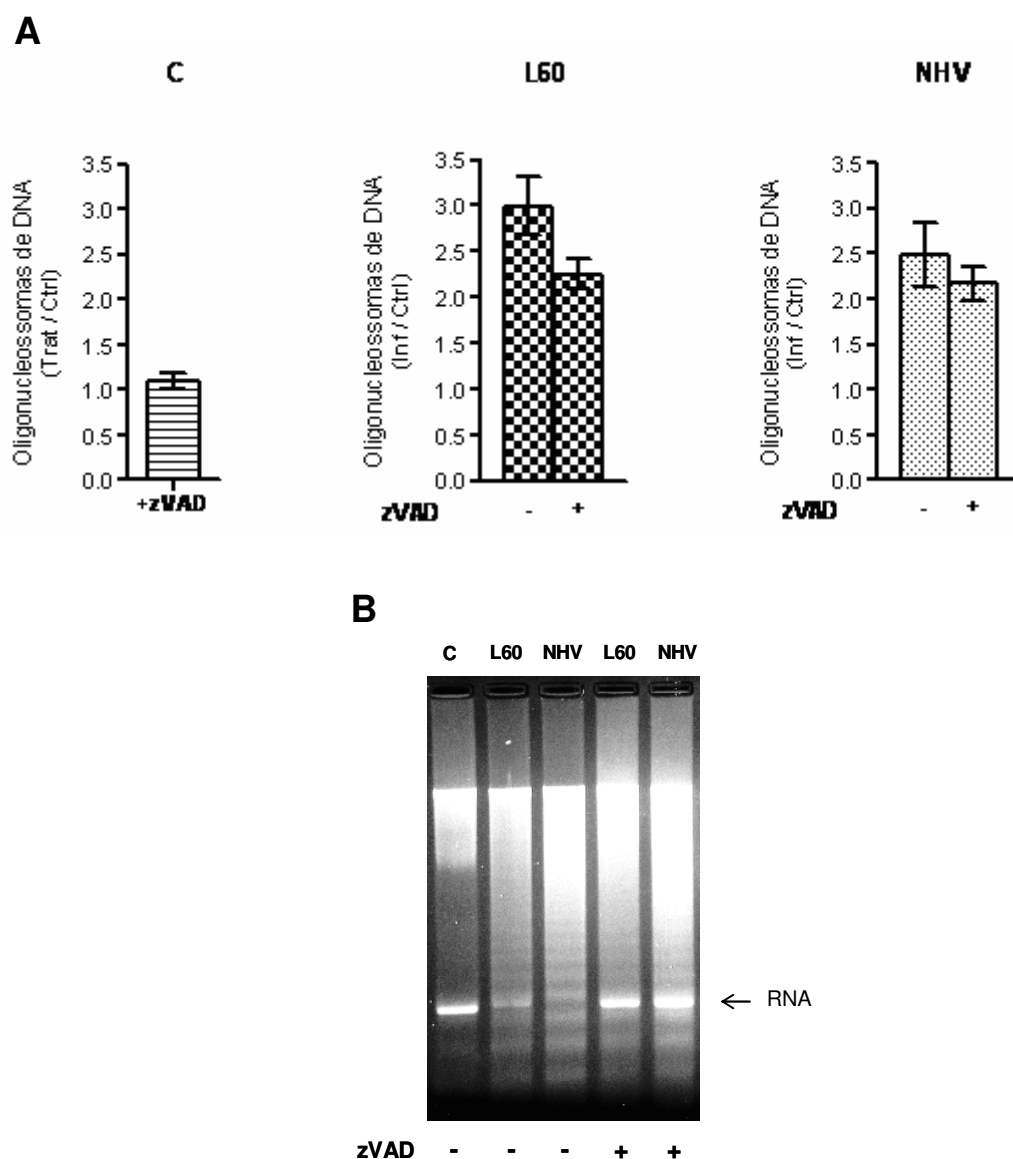


Figura 23. Efeito da inibição de caspases, por zVAD-fmk durante 18h de cultura (C) ou infecção (L60 e NHV), na FIN de DNA.

A. Quantificação de oligonucleossomas citoplasmáticos de DNA por ELISA. Os resultados representam as médias \pm erro padrão de 3 ensaios independentes em cada condição de infecção. A cada ensaio os resultados corresponderam à razão entre valores obtidos em culturas tratadas (Trat) e/ou infectadas (Inf), e não tratadas não infectadas como controlo (Ctrl); **B.** Padrão de migração em electroforese do DNA extraído de culturas nas várias condições de infecção e/ou tratamento. Culturas não tratadas e tratadas (infectadas ou não) foram realizadas em paralelo com células do mesmo suíno a cada ensaio.

Curiosamente, o zVAD inibiu visivelmente a degradação de RNA, correspondente à banda nítida observável na metade inferior do gel de electroforese (Fig. 23, B),

sugerindo um papel das caspases na degradação do RNA celular durante o processo de apoptose.

Em correlação com os resultados verificados a propósito de apoptose, a viabilidade das células em culturas infectadas a tempo tardio de infecção diminuiu mesmo na presença do inibidor zVAD-fmk, para níveis semelhantes aos de culturas não tratadas (Fig. 24). O mesmo ocorreu ao tempo muito tardio de 40h, incluído neste estudo porque se verificou anteriormente que a este tempo ocorria uma acentuada redução da viabilidade das culturas infectadas (ver Fig.17).

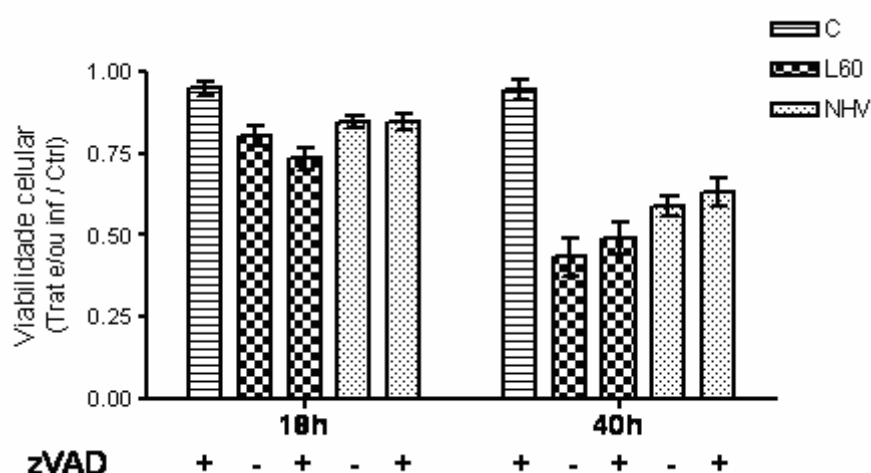


Figura 24. Efeito da inibição de caspases por zVAD-fmk durante 18h e 40h de cultura (C) ou infecção com L60 e NHV, na viabilidade celular.

Os resultados representam as médias \pm erro padrão de 4 ensaios independentes a cada tempo estudado. A cada ensaio os resultados corresponderam à razão entre valores obtidos em culturas tratadas (Trat) e/ou infectadas (Inf), e não tratadas não infectadas como controlo (Ctrl). Culturas não tratadas e tratadas com zVAD-fmk (zVAD), infectadas ou não, foram realizadas em paralelo com células do mesmo suíno a cada ensaio.

4.2.2.4. Ocorrência de apoptose em células infectadas e não infectadas de culturas inoculadas com L60 e NHV

Como se observou anteriormente em 4.1, a inoculação de culturas de macrófagos com os isolados virais em estudo a uma MOI 3, não provoca infecção na totalidade das células, quer a tempo precoce quer tardio, sendo semelhante a percentagem de células infectadas com um e outro isolado a cada tempo estudado. A percentagem de células positivas por imunofluorescência aumenta de cerca de 32% para cerca de 68% das 8h para as 18h PI, em ambas as infecções (Fig. 16, B). Os resultados anteriores mostram também um aumento de FIN característica de apoptose ao longo das infecções com L60 e NHV. Porém, uma vez que numa mesma cultura inoculada existem duas subpopulações celulares, células infectadas e não infectadas, pretendeu-se determinar se o aumento de apoptose seria atribuível a uma destas subpopulações. De facto, a infecção por VPSA *in vivo* induz apoptose em populações linfocitárias na vizinhança de macrófagos infectados, o que foi atribuído à libertação de factores apoptogénicos das células infectadas aos quais os linfócitos serão sensíveis (Carrasco *et al.*, 1996a, Gomez-Villamandos *et al.*, 1995a, Gomez del Moral *et al.*, 1999, Oura *et al.*, 1998, Salguero *et al.*, 2005). No entanto, macrófagos não infectados poderão também ser sensíveis a estes factores libertados de células com replicação viral activa. Com o intuito de esclarecer este aspecto da infecção por VPSA, identificaram-se em culturas de macrófagos inoculadas em paralelo com L60 ou NHV, as células infectadas através de imunofluorescência específica para VPSA (Fig. 25, A, ii), e observou-se em paralelo a morfologia nuclear destas e das células não infectadas da mesma cultura, através do fluorocromo de DNA Hoescht 33258 (Fig. 25, A, i). Quando da observação microscópica destas preparações, este corante permitiu também visualizar o local de replicação de DNA viral nas células infectadas, geralmente na proximidade do núcleo. Para efeitos de comparação, analisou-se também a proporção de células apoptóticas em culturas não infectadas, realizadas em paralelo como controlo.

O resultado da determinação do número de células apoptóticas em culturas controlo e em cada uma das subpopulações – células infectadas e não infectadas – presentes nas culturas inoculadas, está patente na figura 25 B. Na tabela 3 estão representadas as percentagens de apoptose dentro de cada subpopulação, considerada separadamente.

Relativamente às subpopulações infectadas, às 8h PI em média 36% (com L60) e 35% (com NHV) das células mostraram um fenótipo apoptótico, aumentando para 43% (com L60) e 49% (com NHV) às 18h PI, sem que as diferenças entre infecção por L60 e NHV resultassem significativas (Tabela 3). Considerando as subpopulações não infectadas das mesmas culturas, verificou-se um ligeiro aumento na percentagem de células apoptóticas às 8h PI, quando comparado com culturas controlo não infectadas, resultando estatisticamente significativo na infecção por NHV (Tabela 3). Às 18h PI, o número de células não infectadas em apoptose tornou-se mais expressivo, com maior relevância nas culturas inoculadas com L60, onde das 8h para as 18h se verificou um aumento de 21,6% para 35,6% em média, enquanto com NHV o aumento foi de 23,8% para 30,5% (Tabela 3).

Estes resultados indicam que a apoptose observada nos nossos estudos provém de ambas células infectadas e não infectadas de uma mesma cultura inoculada. No entanto, considerando o total da cultura, às 8h PI a proporção de células não infectadas apoptóticas é semelhante à percentagem de apoptose basal em culturas controlo (Fig. 25, B, 8h). Às 18h PI, embora o aumento na proporção de células apoptóticas entre subpopulações não infectadas resultasse mais claro, a este tempo estas subpopulações constituem uma menor proporção da cultura (Fig. 25, B, 18h), pelo que as células em apoptose dentro destas contribuem relativamente pouco para a percentagem de apoptose total da cultura. A apoptose quantificada durante as infecções por L60 e NHV no nosso modelo de estudo, será assim devida, maioritariamente, ao efeito da infecção viral nas células hospedeiras em cultura.

Figura 25. Avaliação de apoptose através da morfologia nuclear, em subpopulações de células infectadas e não infectadas, de culturas inoculadas com L60 e NHV.

A. Visualização das células por microscopia de fluorescência às 8h e 18h de cultura (C) ou infecção (L60, NHV): **i.** núcleos corados com Hoechst 33258; **ii.** células infectadas detectadas com soros anti-VP5A conjugados com FITC. As setas amarelas sinalizam exemplos de células não infectadas em apoptose; setas vermelhas sinalizam exemplos de células infectadas em apoptose. **B.** Percentagem de células normais *versus* apoptóticas, em culturas controlo (C) e em subpopulações infectadas (Inf) e não infectadas (N Inf) de uma mesma cultura inoculada com L60 ou NHV. Os resultados representam a média \pm erro padrão de 4 e 3 ensaios independentes às 8h e 18h PI respectivamente, com culturas infectadas e controlo realizadas em paralelo com células com origem no mesmo suíno.

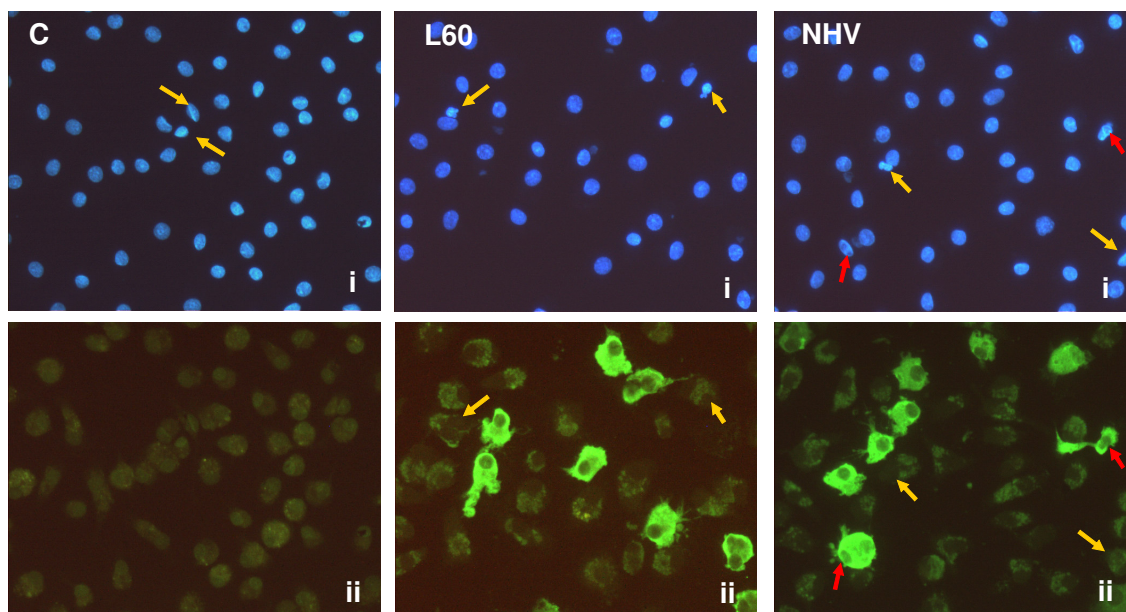
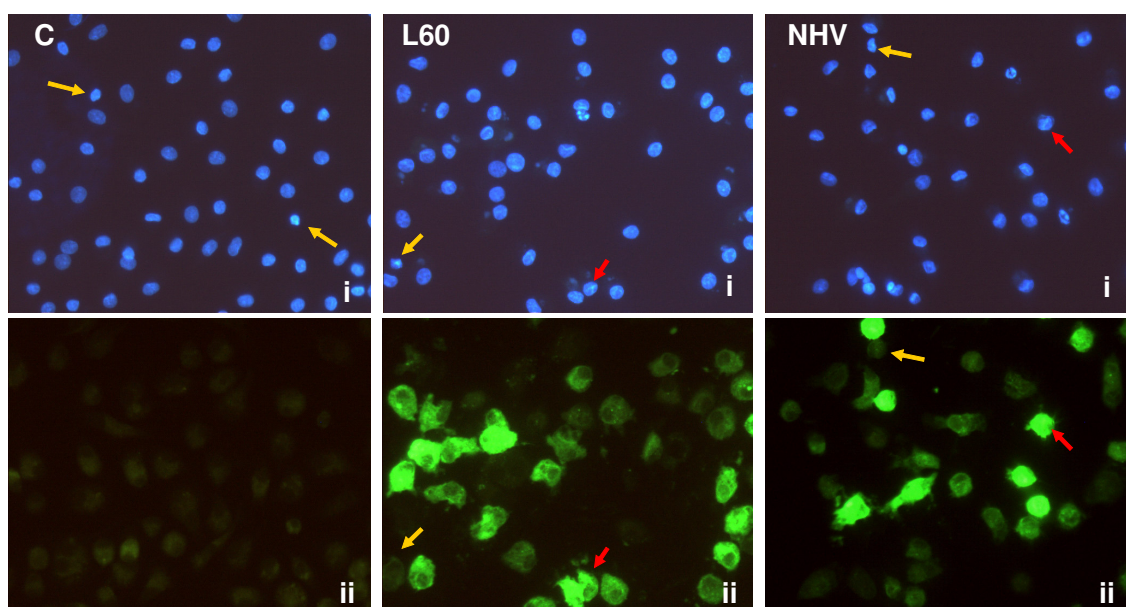
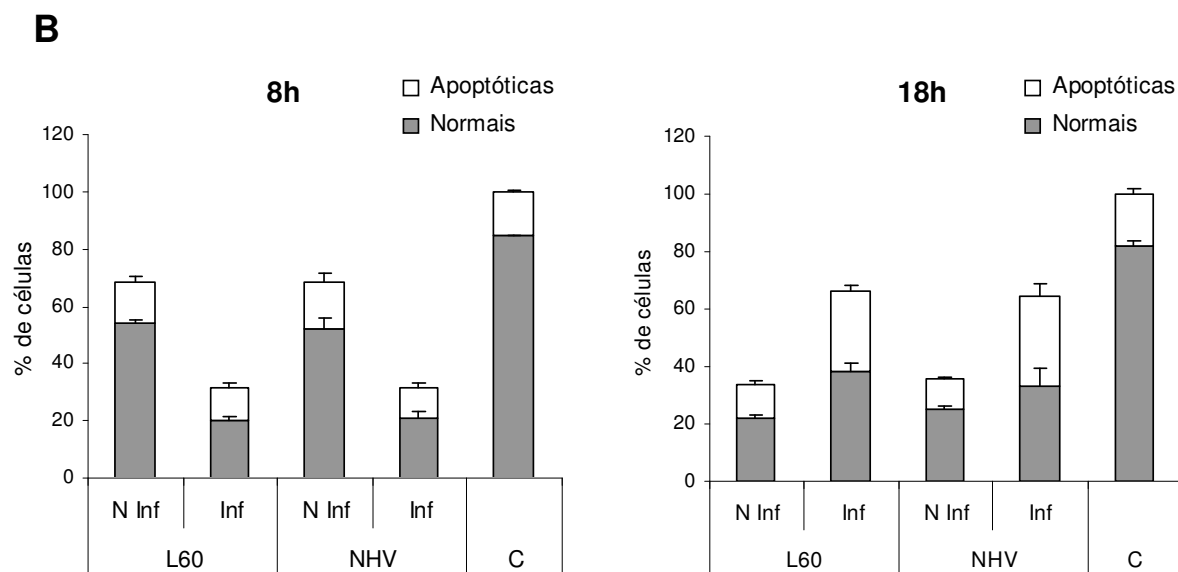
A**8h****18h**

Figura 25 (continuação):**Tabela 3.** Percentagens de células em apoptose em culturas controlo não infectadas (C), e em subpopulações de células infectadas e não infectadas de culturas inoculadas com L60 e NHV.

Tempo de incubação	Células apoptóticas (%)				
	C	Inoculação com L60		Inoculação com NHV	
		Infectadas	Não infectadas	Infectadas	Não infectadas
8h	15,5 ± 0,5	36,3 ± 5,5	21,6 ± 2,7	35,3 ± 5,3	23,8 ± 4,7 ^d
18h	18,0 ± 1,7	42,9 ± 3,6	35,6 ± 2,9 ^{a,c}	48,7 ± 8,4	30,5 ± 0,4 ^b

As células infectadas foram detectadas através de prova de imunofluorescência com soros específicos anti-VP5A. A apoptose foi avaliada por visualização da morfologia nuclear através do corante de DNA Hoescht 33258. Os valores representam as médias ± erro padrão de 4 e 3 ensaios independentes realizados às 8h e 18h PI respectivamente. A cada ensaio, culturas infectadas e controlo foram realizadas em paralelo com células com origem no mesmo suíno.

^a significativamente diferente de controlo às 18h, $p < 0,01$;

^b significativamente diferente de controlo às 18h, $p < 0,05$;

^c significativamente diferente de células inoculadas com L60, não infectadas, às 8h, $p = 0,02$;

^d significativamente diferente de controlo às 8h, $p < 0,05$.

4.3. Efeito da infecção por L60 e NHV no desencadeamento de apoptose induzida exogenamente em culturas de macrófagos

É conhecida a existência no genoma do VPSA de genes descritos como inibidores de apoptose. No entanto, é ainda desconhecido se a infecção do macrófago por VPSA inibe a apoptose quando esta é induzida exogenamente, à semelhança de outros vírus complexos de DNA como os herpesvírus HSV-1, HSV-2 e VDA (Aubert *et al.*, 1999, Geenen *et al.*, 2005, Hata *et al.*, 1999). Para tal, testaram-se diferentes indutores de apoptose em macrófagos de suíno, com o intuito de avaliar posteriormente a capacidade protectora de VPSA contra esta indução de apoptose nas suas células hospedeiras.

4.3.1. Pesquisa de indutores de apoptose em macrófagos de suíno.

4.3.1.1. TNF- α e CHX

O TNF- α é uma citocina com vários efeitos biológicos nas células alvo, mediados pela sua ligação a dois tipos de receptores da superfície celular, TNF-R1 e TNF-R2, através dos quais é induzida sinalização intracelular que se irá traduzir em regulação da inflamação, resposta imune, diferenciação e apoptose (Aggarwal, 2003, Wajant *et al.*, 2003). O TNF-R1 medeia a indução de apoptose, referida em vários tipos celulares incluindo macrófagos (Brodbeck *et al.*, 2002). No entanto, a sinalização induzida por TNF- α leva também a uma activação do factor de transcrição NF κ B, que entre outras acções promove a sobrevivência celular, pelo que na maioria das células o efeito apoptótico induzido por TNF- α é obtido apenas quando é bloqueado NF κ B ou a síntese proteica (Chu *et al.*, 1997, Kucharczak *et al.*, 2003). A CHX é precisamente um inibidor da síntese proteica, induzindo apoptose por si só em vários tipos celulares, nomeadamente macrófagos (Lemaire *et al.*, 1999, Lewis *et al.*, 1995, Lu & Mellgren, 1996, Tang *et al.*, 1999). Existem no entanto células resistentes à sua acção apoptótica, nomeadamente as de linha celular contínua Vero (Carrascosa *et al.*, 2002). Deste modo, testou-se a indução de apoptose com ambos TNF- α e CHX, em conjunto e separadamente.

Por comparação com células controlo não tratadas, nunca se observou claramente FIN típica de apoptose induzida por TNF- α em nenhum dos tempos ou

concentrações pesquisadas (Fig. 26), apesar de as concentrações de TNF- α utilizadas terem sido relativamente elevadas comparativamente às descritas por outros autores para indução de apoptose em macrófagos humanos (Brodbeck *et al.*, 2002).

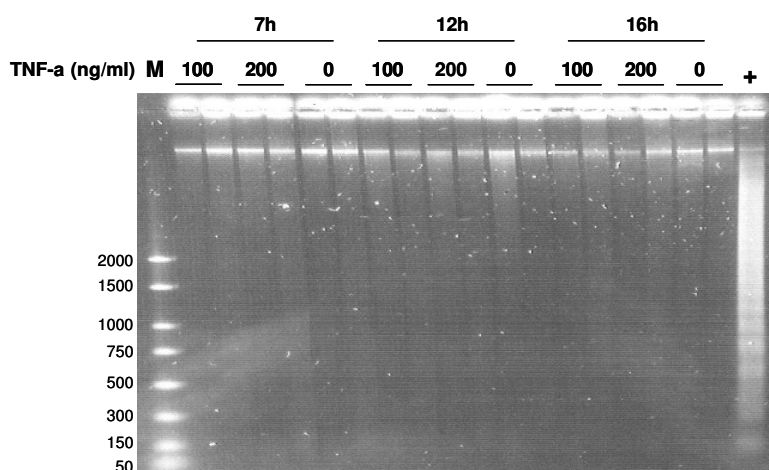


Figura 26. Padrão de migração em electroforese de DNA extraído de culturas de macrófagos tratados com TNF- α a diferentes concentrações e tempos de incubação. Foram analisados em poços paralelos, amostras de DNA de dois ensaios independentes. Foi ainda submetido a electroforese um controlo positivo de apoptose (+), constituído por DNA de células apoptóticas fornecido com o kit utilizado para extracção do DNA (“Suicide-Track DNA ladder isolation kit”, Oncogene). M: marcador de pesos moleculares fornecido com o kit.

Quando se testou a incubação das células com TNF- α em conjunto com CHX (100 ng/ml e 5 μ g/ml respectivamente), após 16h observou-se claramente apoptose, surgindo um padrão de migração do DNA em escada (Fig. 27). No entanto, a incubação com 10 μ g/ml CHX por si só teve o mesmo efeito, pelo que se abandonou a utilização do TNF- α . A sobrevivência de macrófagos de suíno em cultura primária parece assim depender da síntese de novas proteínas ao longo do tempo, provavelmente codificadas por genes de sobrevivência.

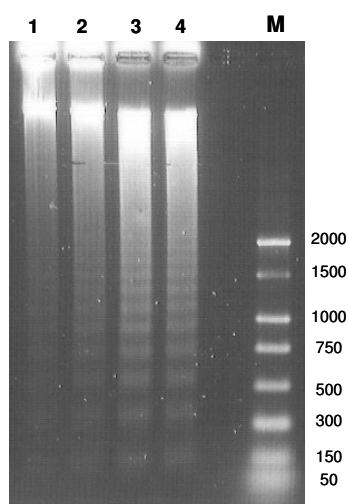


Figura 27. Padrão de migração em electroforese de DNA extraído de culturas de macrófagos após 16h de incubação com: **1**- meio de cultura; **2**- meio de cultura com 200 ng/ml TNF- α ; **3**- 10 μ g/ml CHX; **4**- 100 ng/ml TNF- α + 5 μ g/ml CHX. M: marcador de pesos moleculares fornecido com o kit de extracção de DNA (“Suicide-Track DNA ladder isolation kit”, Oncogene).

Verificou-se ainda que a CHX na concentração de 10 μ g/ml é eficaz na indução de apoptose num curto espaço de tempo, induzindo após apenas 3h de tratamento níveis apreciáveis de FIN de DNA (Fig. 28, A, 3h), actividade de caspase-3 (Fig. 28, B) e condensação e/ou fragmentação da cromatina nuclear (Fig. 28, C). A indução de apoptose com 3h de tratamento foi conveniente para que em ensaios posteriores, a tempos precoces de infecção com L60 e NHV (como descrito em 4.3.2.1), se permitisse a expressão de proteínas virais potencialmente protectoras de apoptose durante as primeiras horas de infecção.

Observaram-se ainda níveis de lise celular (quantificação de oligonucleossomas de DNA libertados no sobrenadante da cultura) muito reduzidos, mesmo após 7h de tratamento com CHX (Fig. 28, A, 7h), confirmando-se a indução de apoptose e não de lise celular com este tratamento. Passou assim a utilizar-se a concentração de 10 μ g/ml CHX para indução de apoptose em culturas primárias de macrófagos de suíno.

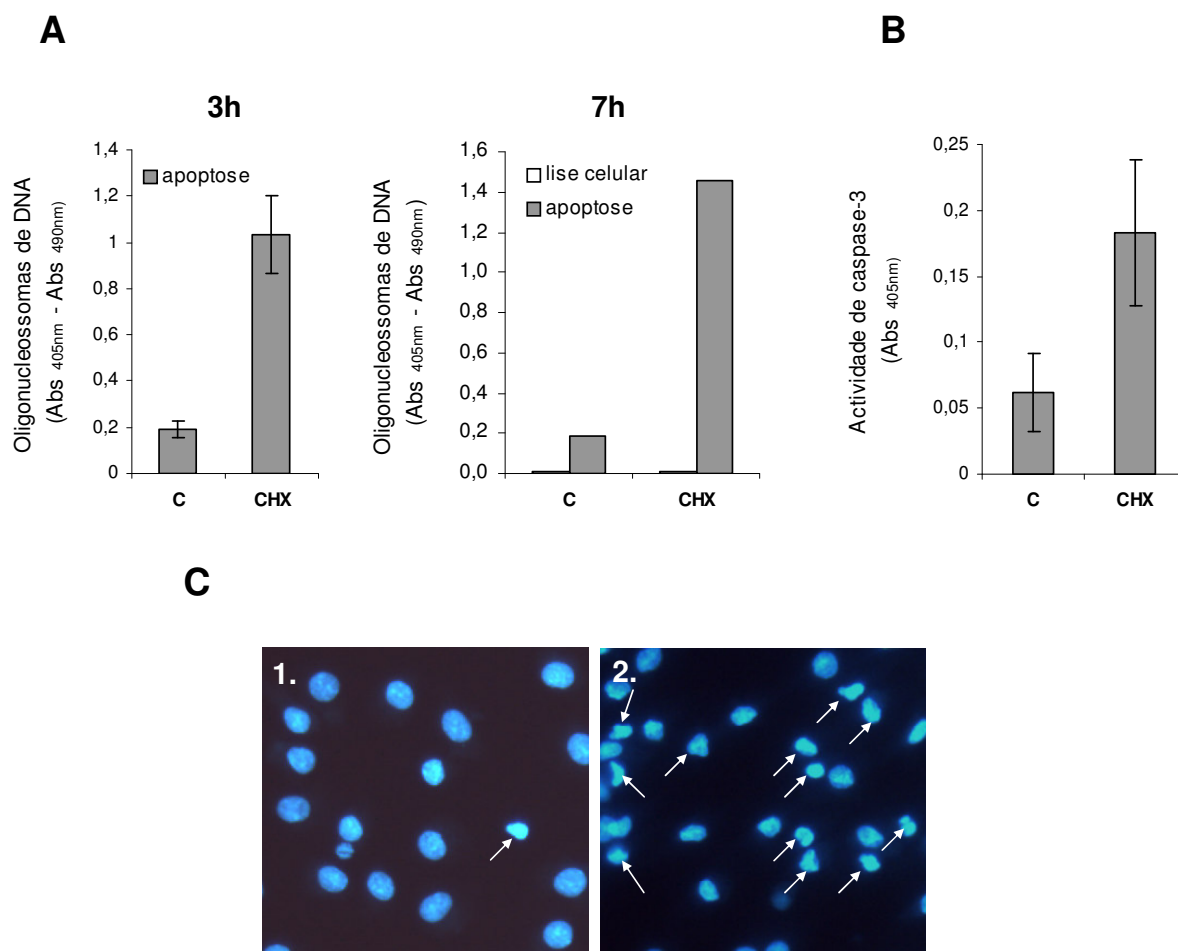


Figura 28. Apoptose em culturas de macrófagos tratadas com 10 µg/ml CHX.

A. Quantificação de oligonucleossomas de DNA através de ELISA, aos tempos de tratamento indicados. Os resultados às 3h de tratamento representam a média de 2 ensaios independentes \pm erro padrão. Às 7h de tratamento compararam-se os níveis de lise celular (oligonucleossomas no sobrenadante da cultura) e apoptose (oligonucleossomas no citoplasma após lise das células) numa mesma cultura. **B.** Quantificação da actividade de caspase-3 após 3h de tratamento. Os resultados representam a média de 3 ensaios independentes \pm erro padrão. **C.** Observação da morfologia nuclear, através do fluorocromo de DNA Hoescht 33258 sob microscopia de fluorescência, em culturas não tratadas (1.) e tratadas durante 3h (2.).

4.3.1.2. STS

A STS é um alcalóide microbiano isolado de *Streptomyces staurosporeus* e constitui um potente inibidor de cinases proteicas (Ruegg & Burgess, 1989). Embora não seja ainda totalmente conhecido o seu mecanismo de actuação na via de sinalização de morte celular, é um indutor eficaz de apoptose em variados sistemas celulares, independentemente do estado de diferenciação, fase do ciclo celular e

síntese macromolecular (Bertrand *et al.*, 1994). Foram inclusivamente descritos importantes mecanismos do processo apoptótico em células tratadas com staurosporina, como a actividade de caspases e a acção inibitória de Bcl-2 neste processo (Estoppey *et al.*, 1997, Jacobsen *et al.*, 1996). Na indução de apoptose por staurosporina alguns autores apontam como determinante o seu efeito inibitório sobre a família de cinases proteicas PKC ("protein kinase C") (Kobayashi *et al.*, 1997, Qiao *et al.*, 1996). Estas actuam na transdução de sinais de receptores membranares para o núcleo, estando envolvidas em proliferação celular e resistência a drogas anti-tumorais e apoptose (Hofmann, 2001, Hofmann, 2004). Mais especificamente, membros da família PKC têm sido implicados em inactivação das proteínas pró-apoptóticas Bad e Bax, por fosforilação em resíduos de serina específicos (Hurbin *et al.*, 2005). No entanto, em culturas primárias de timócitos de rato e hepatócitos de murino, nas quais a staurosporina induz apoptose, a inibição de PKC por si só não é suficiente para indução de apoptose (Feng & Kaplowitz, 2002, Harkin *et al.*, 1998), pelo que estas proteínas poderão não ter um papel fulcral na via de indução de apoptose por staurosporina em todos os tipos celulares. Outro modo de actuação descrito para a STS foi a inibição das cinases de I κ B, IKK α e IKK β , com a consequente inibição de NF κ B (Peet & Li, 1999), que por sua vez, induz a síntese de várias proteínas anti-apoptóticas como Bcl-x_L, A1, A20 e inibidoras de caspases da família IAP (Barkett & Gilmore, 1999). A jusante destas vias de sinalização, a via mitocondrial tem sido referida como central no mecanismo de indução de apoptose por STS, com libertação de citocromo c (Bossy-Wetzel *et al.*, 1998) e activação de caspases como caspase-3 (Bossy-Wetzel *et al.*, 1998, Feng & Kaplowitz, 2002, Jacobsen *et al.*, 1996, Stepczynska *et al.*, 2001, Yue *et al.*, 1998).

Com base na literatura acima referida, para testar a STS na indução de apoptose em macrófagos de suíno, culturas primárias foram tratadas com concentrações crescentes deste químico (0,05; 0,1; 0,25; 0,5 μ M) ou não tratadas como controlo. Ao fim de 7h, pesquisou-se a indução de apoptose através de visualização do padrão de migração do DNA destas culturas em electroforese. Observou-se um efeito crescente de fragmentação internucleossómica do DNA em correlação com uma concentração crescente de STS (Fig 29, A). Observou-se também o desaparecimento progressivo da banda correspondente a RNA, o que poderá estar relacionado com a crescente degradação dos precursores celulares.

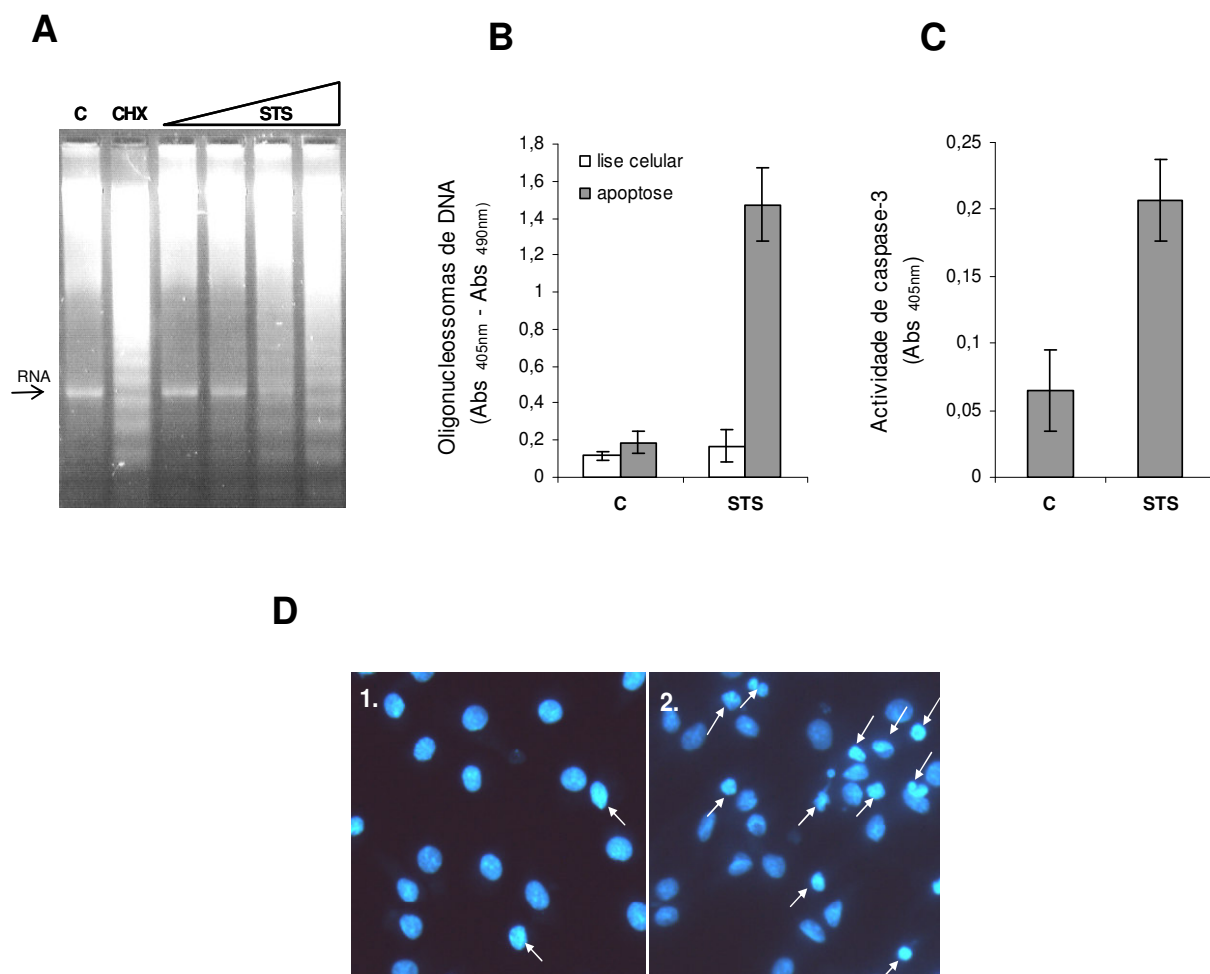


Figura 29. Apoptose em culturas de macrófagos tratados com STS.

A. Visualização através de electroforese do padrão de migração de DNA extraído após 7h de cultura (C), tratamento com 10 µg/ml CHX como controlo positivo de indução de apoptose, e com concentrações crescentes de STS: 0,05; 0,1; 0,25 e 0,5µM. **B.** Quantificação de oligonucleossomas de DNA através de ELISA após 3h de tratamento com 1 µM STS. Compararam-se os níveis de lise celular (oligonucleossomas no sobrenadante da cultura) e apoptose (oligonucleossomas no citoplasma após lise das células) na mesma cultura (média de 3 ensaios independentes ± erro padrão). **C.** Quantificação da actividade de caspase-3 após 3h de tratamento com 1 µM STS (média de 2 ensaios independentes ± erro padrão). **D.** Observação da morfologia nuclear em culturas controlo (1.) e tratadas durante 3h com 1 µM STS (2.), através do fluorocromo de DNA Hoescht 33258, sob microscopia de fluorescência.

Todavia, verificou-se que a STS é também eficaz na indução de apoptose em apenas 3h de tratamento, com uma concentração de 1 µM, como foi possível determinar através de quantificação de oligonucleossomas de DNA no citoplasma das células por ELISA (Fig. 29, B), actividade de caspase-3 (Fig. 29, C) e também por visualização da morfologia dos núcleos corados com Hoescht 33258 (Fig. 29, D).

Não se observaram ainda níveis de lise celular apreciáveis com este tratamento (Fig. 29, B), passando a utilizar-se a concentração de 1 μ M STS para indução de apoptose, durante um período de 3h de modo semelhante à CHX como atrás descrito.

4.3.1.3. Privação de soro

A privação de soro tem sido descrita como indutora de apoptose nos mais variados modelos celulares, como por exemplo condrócitos e cardiomiócitos de rato (Chao *et al.*, 2002, Zermeno *et al.*, 2006), células endoteliais humanas (Date *et al.*, 2005), linha celular de macrófagos RAW 264.7 de murino (Wei *et al.*, 2006) ou células da granulosa de suíno (Peng *et al.*, 1998). Em praticamente todos os estudos, apesar de as caspases iniciadoras do processo parecerem variar consoante o modelo celular, a referência à intervenção de caspase-3 como caspase efectora é uma constante.

Confirmou-se que também neste sistema celular a privação de soro induz apoptose visível após 8h ou 18h de cultura, tempos posteriormente utilizados para pesquisar níveis de apoptose com células infectadas (tempos precoce e tardio de infecção respectivamente), como verificado pelo aumento de FIN de DNA (Fig. 30, A), actividade de caspase-3 (Fig. 30, B) e condensação e/ou fragmentação da cromatina celular (Fig. 30, C), nas células cultivadas na ausência de SFB no meio de cultura.

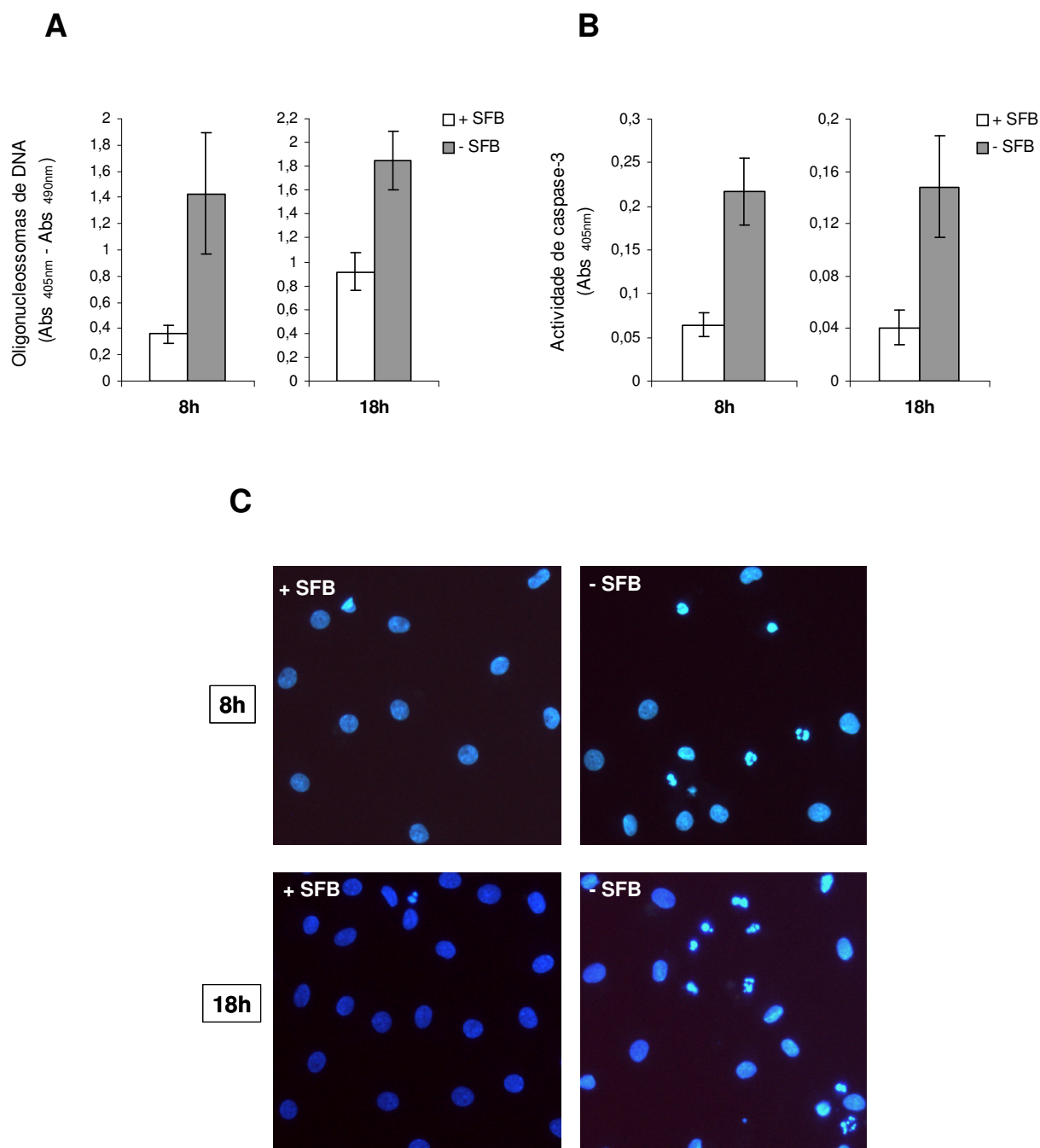


Figura 30. Apoptose em culturas de macrófagos com privação de soro fetal bovino (SFB) após 8 e 18h de cultura.

A. Quantificação de oligonucleossomos de DNA no citoplasma celular através de ELISA (média \pm erro padrão de 3 ensaios independentes às 8h e às 18h). **B.** Quantificação de actividade de caspase-3 (média \pm erro padrão de 2 e 3 ensaios independentes realizados às 8h e 18h respectivamente). **C.** Observação da morfologia nuclear das células em cultura através do fluorocromo de DNA Hoescht 33258, sob microscopia de fluorescência.

4.3.2. Determinação dos níveis de apoptose em células infectadas e tratadas para indução exógena de apoptose

Uma vez determinadas condições eficazes para induzir apoptose em macrófagos de suíno, pesquisou-se a capacidade do VPSA para proteger da apoptose quando esta é induzida exogenamente nas suas células hospedeiras, tendo em conta que apesar da presença no seu genoma de genes putativamente inibidores de apoptose, a funcionalidade destes nunca foi comprovada em macrófagos infectados. Pretendeu-se também determinar se os isolados virais utilizados neste estudo exibem diferentes capacidades inibitórias de apoptose, e ainda, se existem diferenças entre fases diferentes do ciclo de infecção.

4.3.2.1. Indução de apoptose com CHX

Como se verificou anteriormente, a inibição da síntese proteica em culturas de macrófagos de suíno por CHX conduz a apoptose. No entanto, à semelhança das proteínas celulares, a CHX inibirá também a produção das próprias proteínas virais, em virtude de o vírus depender da maquinaria celular para a sua transdução proteica. O gene viral *5-HL*, inibidor de apoptose e homólogo de *bcl-2*, está descrito como sendo de transcrição precoce, encontrando-se a proteína viral nas células hospedeiras a partir das 3h de infecção (Afonso *et al.*, 1996, Neilan *et al.*, 1993). Por outro lado, o outro gene viral referido como inibidor de apoptose e homólogo de *iap*, *4-CL*, está descrito como sendo de transcrição tardia, sendo a proteína consequentemente produzida após o início da replicação viral (Chacon *et al.*, 1995), que tem início por volta das 6h de infecção.

Para estudar um possível efeito protector de proteínas de VPSA em diferentes fases de infecção, adicionou-se CHX aos seguintes tempos PI: às 4h, para permitir a produção de proteínas virais precoces como *5-HL*; às 7h, logo após o início da replicação viral; e às 15h, tempo tardio de infecção. Culturas não infectadas foram realizadas em paralelo e tratadas de modo semelhante com CHX, ou deixadas por tratar como controlo. Após um período adicional de 3h de incubação com CHX, perfazendo um total de 7h, 10h e 18h em cultura, quantificou-se a actividade de caspase-3 e a FIN de DNA (Fig. 31).

Observou-se um decréscimo estatisticamente significativo de actividade de caspase-3 em infecção por L60 às 10h, em comparação com células apenas tratadas com CHX (Fig. 31, A), apesar de a todos os tempos estudados se ter verificado uma tendência para um decréscimo deste parâmetro nas células infectadas.

Nos níveis de FIN de DNA não se verificaram diferenças estatisticamente significativas entre células tratadas na presença ou ausência de infecção, a nenhum dos tempos pesquisados (Fig. 31, B). Contudo, ao contrário do tratamento das 4-7h (com quantificação de FIN às 7h), no tratamento das 7-10h (quantificação de FIN às 10h) observou-se uma tendência para níveis inferiores de fragmentação de DNA nas células infectadas com ambos os isolados, que deixa de ser visível mais uma vez na quantificação às 18h. Embora o efeito não seja muito evidente, a expressão proteica entre o início da infecção e as 7h PI parece ter algum efeito protector em ambas as infecções, uma vez que quando esta expressão é interrompida pela adição de CHX mais cedo, às 4h de infecção, os níveis de FIN de DNA são tendencialmente mais elevados.

Mais uma vez, não se observou uma correlação directa entre actividade de caspase-3 e fragmentação do DNA celular, nas células infectadas tratadas. Apesar de ao longo das infecções a actividade de caspases nunca ser superior à encontrada em células controlo tratadas, o mesmo não se verificou ao nível da fragmentação do DNA.

Apesar de não se observar nas nossas condições de estudo um claro efeito protector por VPSA, é interessante verificar que também não existe uma exacerbação da apoptose na presença de um factor de stress adicional como a CHX, uma vez que se verificou que a própria infecção induz apoptose nas células hospedeiras.

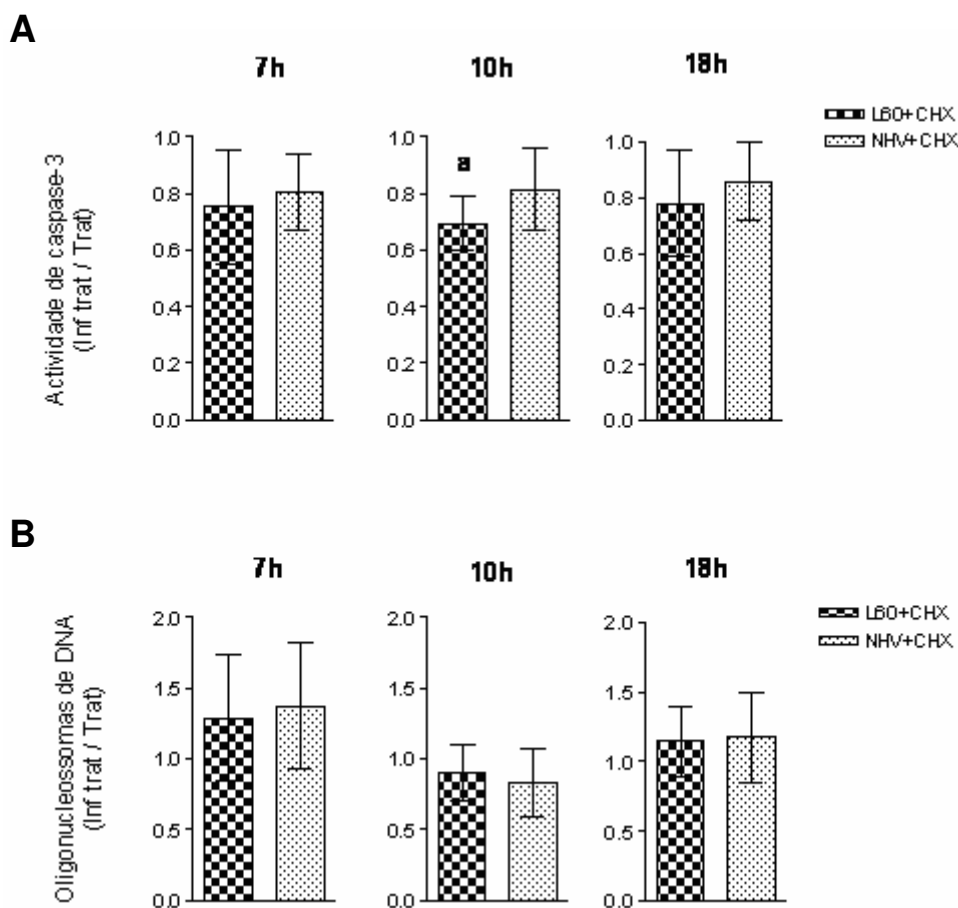


Figura 31. Quantificação de apoptose após tratamento com CHX em culturas infectadas com L60 e NHV, por comparação com culturas não infectadas tratadas do mesmo modo. A CHX foi adicionada às 4h, 7h e 15h de cultura/infecção. Após um período adicional de 3h de incubação, quantificou-se às 7h, 10h e 18h, a actividade de caspase-3 (**A**) e os oligonucleossomas citoplasmáticos de DNA por ELISA (**B**).

Os resultados representam a média \pm desvio padrão de 3 ensaios independentes em A e 5 a 6 ensaios em B. A cada ensaio, os resultados corresponderam à razão entre valores obtidos em culturas infectadas tratadas (Inf trat), e apenas tratadas (Trat). Culturas tratadas, infectadas ou não, foram realizadas em paralelo utilizando células com origem no mesmo suíno a cada ensaio.

^a Significativamente diferente de não infectado tratado com CHX, $p < 0,05$.

Estudou-se ainda a viabilidade celular das culturas infectadas após tratamento com CHX. Não se tendo observado um efeito expressivo de protecção de apoptose a nenhum dos tempos pesquisados, estudou-se a viabilidade das células apenas aos tempos de 8h (com adição de CHX às 5h) e 18h (com adição de CHX às 15h). Esta resultou semelhante nas células não infectadas e infectadas às 8h (Fig. 32, 8h). A tempo tardio pelo contrário, observou-se uma diminuição da viabilidade nas células infectadas (Fig. 32, 18h), que se poderá relacionar com o facto de nesta fase as infecções por si próprias induzirem níveis mais expressivos de apoptose do que

às 8h PI, como descrito em 4.2. Não se observou ainda a propósito de viabilidade celular na presença de CHX como indutor de apoptose, qualquer diferença significativa entre infecções com os isolados de diferente virulência (Fig. 32, 8h e 18h).

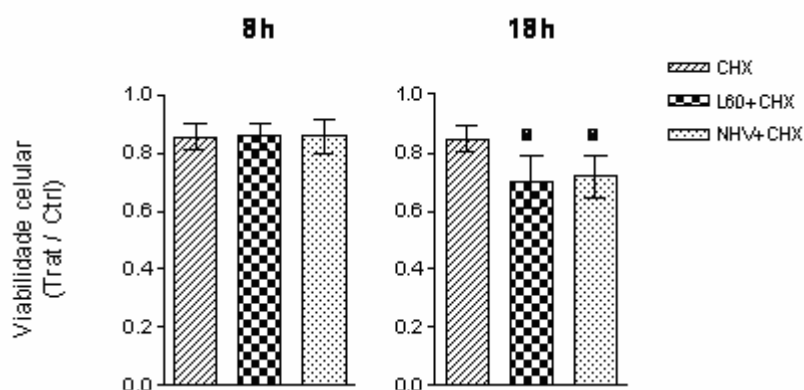


Figura 32. Viabilidade celular em culturas não infectadas e infectadas com L60 e NHV após tratamento com CHX.

A CHX foi adicionada às 5h e 15h de cultura/infecção. Após um período adicional de 3h de incubação, determinou-se às 8h e 18h a viabilidade celular nas diferentes condições. Culturas não tratadas e não infectadas foram realizadas em paralelo como controlo. Os resultados representam a média \pm desvio padrão de 4 e 5 ensaios independentes às 8h e 18h respectivamente, e resultam da razão entre valores obtidos em culturas tratadas, infectadas ou não (Trat), e culturas controlo não tratadas não infectadas (Ctrl). Infecções e/ou tratamento e controlo foram realizados em paralelo, utilizando células com origem no mesmo suíno a cada ensaio.

^a Significativamente diferente de CHX, $p < 0,01$.

4.3.2.2. Indução de apoptose com STS

Como se determinou em 4.3.1.2., a presença de STS numa concentração de 1 μ M em culturas de macrófagos de suíno induz apoptose visível após 3h de tratamento. Para verificar se o VPSA tem capacidade de inibir apoptose induzida por STS nas suas células hospedeiras, esta foi adicionada a culturas não infectadas e infectadas às 5h e 15h de cultura ou infecção. Após uma incubação adicional de 3h, num total de 8h e 18h de cultura, quantificaram-se a actividade de caspase-3 e os oligonucleossomas de DNA nos citoplasmas celulares nas diferentes condições. Os mesmos indicadores de apoptose foram quantificados em culturas não tratadas e não infectadas, realizadas em paralelo como controlo.

Não se observaram diferenças significativas entre células tratadas não infectadas e infectadas, a propósito de ambos os indicadores de apoptose, a qualquer dos tempos pós-infecção pesquisados (Fig. 33). Apesar de não se observar diminuição dos níveis de apoptose induzida por STS na presença de infecção, também não ocorreu uma exacerbação desta, à semelhança do observado com CHX.

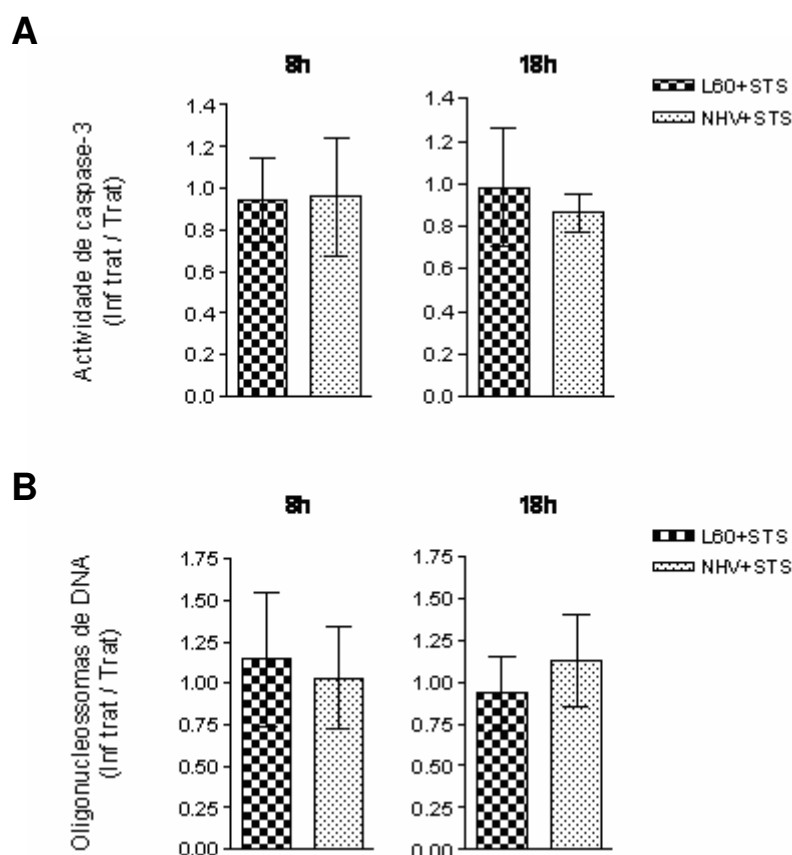


Figura 33. Quantificação de apoptose após tratamento com STS em culturas infectadas com L60 e NHV, por comparação com culturas não infectadas tratadas do mesmo modo. A STS foi adicionada às 5h e 15h de cultura/infecção. Após 3h de tratamento, às 8h e 18h quantificou-se a actividade de caspase-3 (**A**) e os oligonucleossomas de DNA nos citoplasmas celulares por ELISA (**B**). Os resultados correspondem às médias \pm desvio padrão de 4 a 5 ensaios independentes às 8h e 18h. A cada ensaio, os resultados corresponderam à razão entre valores obtidos em culturas infectadas tratadas (Inf trat), e apenas tratadas (Trat). Culturas tratadas, infectadas ou não, foram realizadas em paralelo utilizando células com origem no mesmo suíno a cada ensaio.

O estudo da viabilidade celular após tratamentos com STS revelou um aumento ligeiro mas estatisticamente significativo, na viabilidade das células infectadas por L60 às 8h PI, em comparação com células não infectadas (Fig. 34, 8h). Em infecção por NHV também não se observou menor viabilidade após tratamento com STS em

comparação com células não infectadas e tratadas. Ainda, ao contrário do que se observou com CHX, o tratamento com STS a tempo tardio de infecção não induziu um decréscimo significativo na viabilidade das células infectadas, em comparação com células não infectadas (Fig. 34, 18h).

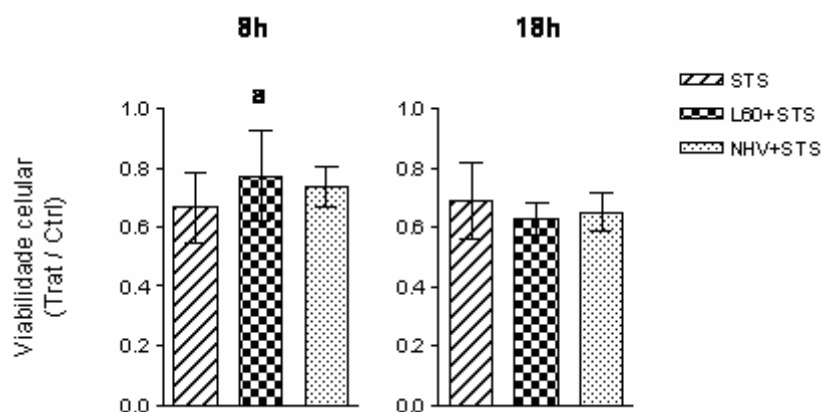


Figura 34. Viabilidade celular em culturas não infectadas e infectadas com L60 e NHV após tratamento com STS.

A STS foi adicionada às 5h e 15h de cultura/infecção, prosseguindo-se a incubação por um período adicional de 3h. Após um período total de 8h e 18h de cultura, a viabilidade celular foi determinada nas diferentes condições. Culturas não tratadas e não infectadas foram realizadas em paralelo como controlo. Os resultados representam a média \pm desvio padrão de 4 ensaios independentes às 8h e 18h, e resultam da razão entre valores obtidos em culturas tratadas, infectadas ou não (Trat), e culturas controlo não tratadas não infectadas (Ctrl). Infecções e/ou tratamento e controlo foram realizados em paralelo, utilizando células com origem no mesmo suíno a cada ensaio.

^a Significativamente diferente de STS, $p < 0,05$.

4.3.2.3. Indução de apoptose por privação de soro

Para verificar se a infecção por VPSA tem capacidade de inibir a indução de apoptose pelo tratamento de privação de soro (PS), os indicadores de apoptose actividade de caspase-3 e formação de oligonucleossomas de DNA foram mais uma vez quantificados em culturas de macrófagos não infectadas e infectadas, cultivadas na ausência de SFB no meio de cultura durante 8h e 18h de incubação.

Os resultados obtidos não mostraram diferenças significativas entre células infectadas e não infectadas relativamente aos níveis de apoptose desencadeados por este tratamento (Fig. 35, A e B), pelo que também nesta situação, a infecção por

qualquer dos isolados de VP5A em estudo não parece ter capacidade para inibir a apoptose induzida exogenamente nas suas células hospedeiras.

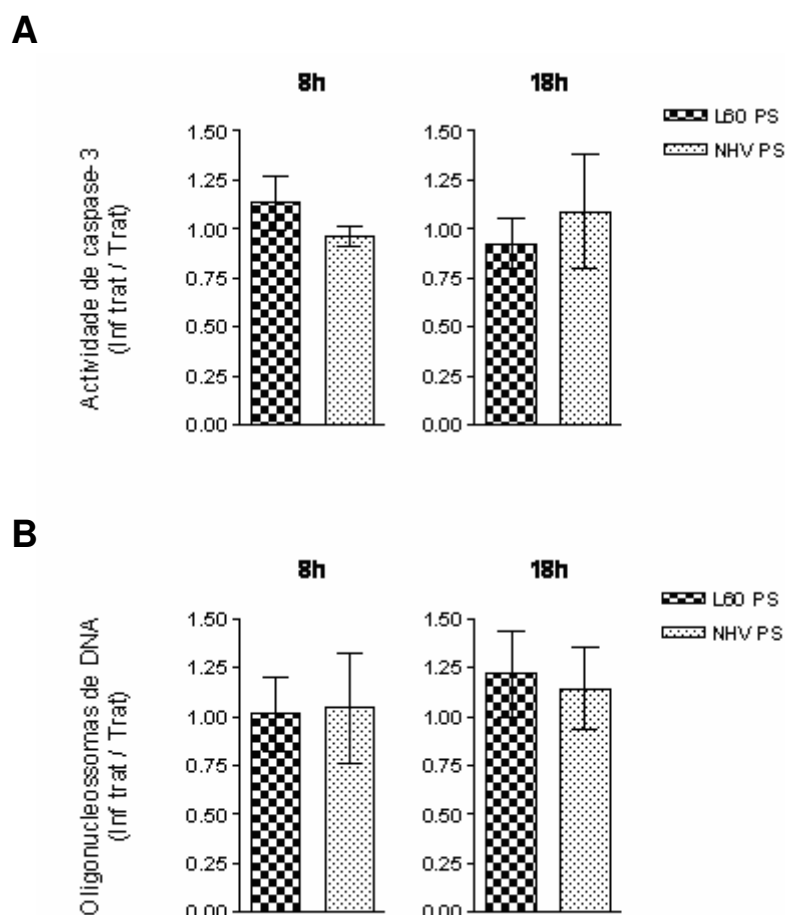


Figura 35. Quantificação de apoptose após tratamento de privação de soro, em culturas infectadas com L60 e NHV, por comparação com culturas não infectadas tratadas do mesmo modo.

Após 8h e 18h de cultura/infecção com privação de soro (PS), quantificou-se a actividade de caspase-3 (**A**) e os oligonucleossomas citoplasmáticos de DNA por ELISA (**B**) nas diferentes condições. Os resultados representam as médias \pm desvio padrão de 2 e 3 ensaios independentes em A às 8h e 18h respectivamente, e 5 e 4 ensaios em B às 8h e 18h respectivamente. A cada ensaio, os resultados corresponderam à razão entre valores obtidos em culturas infectadas tratadas (Inf trat), e apenas tratadas (Trat). Culturas tratadas, infectadas ou não, foram realizadas em paralelo utilizando células com origem no mesmo suíno a cada ensaio.

4.4. Mecanismos virais reguladores da morte celular na célula hospedeira: estudo da expressão dos genes virais potencialmente envolvidos em inibição de apoptose – *5-HL* (homólogo de *bcl-2*) e *4-CL* (homólogo de *iap*)

4.4.1. Sequenciação de *4-CL* e *5-HL* nos isolados virais em estudo

Uma vez que a sequência de *5-HL* é ainda desconhecida em ambos os isolados virais em estudo, e a sequência de *4-CL* é conhecida para L60 (acesso *Genbank* U91736) mas não para NHV, propusemo-nos sequenciar estes genes em ambos L60 e NHV para verificar se existem diferenças a este nível entre os isolados. Para tal, foi extraído DNA de macrófagos infectados com L60 e com NHV, a partir do qual foram amplificadas por PCR sequências genómicas virais contendo os genes alvo. Para *5-HL* foram utilizados oligómeros que amplificaram uma sequência desde 280 pb a montante até 79 pb a jusante dos codões de iniciação e de terminação da tradução respectivamente, com localização sobre as sequências codificantes dos genes *A137R* e *A859L* que flanqueiam *A179L* (Fig. 36), resultando na amplificação de 899 pb no total. A região do genoma contendo a sequência de *4-CL* foi amplificada desde 129 pb a montante até 218 pb a jusante dos codões de iniciação e terminação da tradução respectivamente, através de oligómeros com localização numa região intergénica e sobre o gene adjacente *A542R* (Fig. 36), resultando numa sequência de 1022 pb no total.

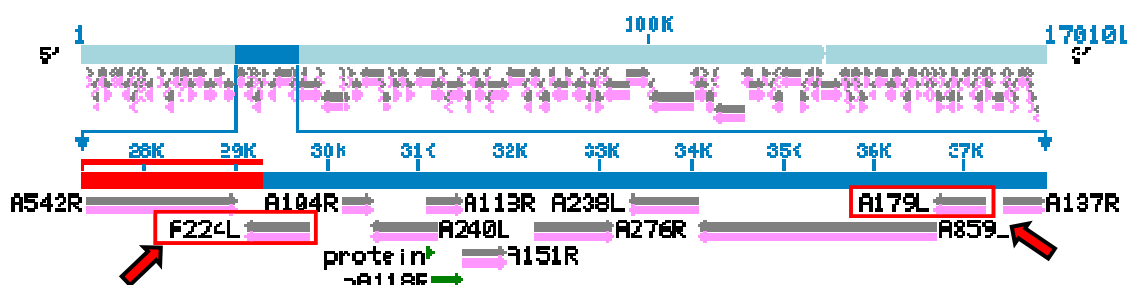


Figura 36. Visualização gráfica da região genómica do isolado Ba71V compreendida entre os nucleótidos 27300 e 37880, onde se localizam os genes *4-CL* (A224L) e *5-HL* (A179L). Adaptado da base de dados NCBI, acesso NC_001659. As setas indicam a orientação da transcrição para cada gene: a cinza representam sequência do gene e a rosa a sua sequência codificante.

Após clonagem dos segmentos amplificados e sua sequenciação, as sequências consenso obtidas foram alinhadas e comparadas com as correspondentes conhecidas à data para alguns isolados de VPSA de diferentes origens: africanos, europeus, e Ba71V adaptado a células de linha contínua Vero.

Verificou-se que as sequências de *5-HL* de L60 e de NHV são semelhantes entre si (Fig. 37), e semelhantes à sequência do isolado adaptado a células de linha contínua Vero, Ba71V, e à de um isolado de campo português não virulento e não hemadsorvente OURT 88/3, obtendo-se consenso em praticamente toda a zona sequenciada. Apenas foi detectada na sequência de NHV a deleção de um resíduo de adenosina 192 pb a montante do codão de iniciação ATG (Fig. 37, posição 88), à semelhança do isolado OURT 88/3, numa zona não codificante rica em adeninas e timinas. Nestas zonas poderão existir motivos de ligação a factores de regulação da expressão, nomeadamente “tataboxs”. Existe de facto um destes motivos potenciais na zona da deleção, constituído por TTATAA (identificado na proteína Wap de rato, que também existe no suíno) (Lubon & Hennighausen, 1987), que assim estará ausente em NHV. Foi no entanto referido que no VPSA, as sequências promotoras constituídas por sequências ricas em As e Ts, parecem localizar-se a curta distância dos locais de início da transcrição, à semelhança dos poxvírus (Almazan *et al.*, 1992). A transcrição tem geralmente início também a curta distância do codão de iniciação da tradução (Almazan *et al.*, 1992, Almazan *et al.*, 1993, Chacon *et al.*, 1995, Galindo *et al.*, 2000b, Martins *et al.*, 1994, Rodriguez *et al.*, 1996, Yanez *et al.*, 1993). Em NHV, a distância de 192 pb que separa a deleção do codão de iniciação da tradução de *5-HL* é longa, pelo que é improvável que esta região corresponda a uma sequência promotora.

De modo interessante, o alinhamento da região contendo *5-HL* nos isolados europeus e num isolado patogénico de África Ocidental, o Benin 97/1, revelou uma única substituição nucleotídica de uma Citosina por uma Timina na sequência codificante do isolado do Benin, 165 pb a jusante de ATG (posição 465 da figura 37), levando à substituição de um resíduo de treonina por um de isoleucina na sequência aminoacídica. Pelo contrário, a comparação com um outro isolado patogénico africano da África Oriental, Malawi Lil-20, revelou muitas diferenças ao longo de toda a sequência analisada, nomeadamente inserção de vários nucleótidos a cerca de 100 pb a montante de ATG, e várias substituições nucleotídicas, inclusivamente ao longo da sequência codificante (Fig. 37). Esta observação parece reflectir uma maior

proximidade dos isolados portugueses com isolados de África ocidental, de acordo com uma possível origem da PSA na Europa a partir desta região de África (Bastos *et al.*, 2003, Blasco *et al.*, 1989a, Nix *et al.*, 2006).

Figura 37. Alinhamento das sequências consenso obtidas por sequenciação de 5-*HL* em L60 e NHV (**cons5HL_L60** e **cons5HL_NHV**), com as sequências nucleotídicas correspondentes conhecidas de isolados de VPSA de diferentes origens.

Ba71V: isolado adaptado a células de linha contínua Vero (acesso *GenBank* NC_001659; genoma: 36591-37489, cadeia complementar reversa); **OURT 88/3**, isolado de campo não patogénico, português (acesso *GenBank* AM712240; genoma: 38736-39633, cadeia complementar reversa); **Benin** 97/1, isolado patogénico do Benin, África Sub-Saariana Ocidental (acesso *GenBank* AM712239; genoma: 47916-48814, cadeia complementar reversa); **Malawi** Lil-20, isolado patogénico do Malawi, África Sub-Saariana Oriental (acesso *GenBank* L09548; sequência codificante parcial: 1-793 bases, cadeia complementar reversa). As posições 1-20 e 900-919 correspondem aos locais de hibridação dos oligómeros utilizados para amplificação da região por PCR sobre DNA de L60 e NHV. Em 301 e 838 localizam-se os codões de iniciação e terminação da transcrição respectivamente.

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Ba71V	TTTCCTCTGGTCGAGTTTGGTAAGAACTGCTCCATTGTACAGTTGTATACATATAAATCTTAATCTTTAATGGCTATTATTAATGACTTCTTTGC										
cons5HL_L60	TTTCCTCTGGTCGAGTTTGGTAAGAACTGCTCCATTGTACAGTTGTATACATATAAATCTTAATCTTTAATGGCTATTATTAATGACTTCTTTGC										
cons5HL_NHV	TTTCCTCTGGTCGAGTTTGGTAAGAACTGCTCCATTGTACAGTTGTATACATATAAATCTTAATCTTTAATGGCTATTATTAATGACTTCTTTGC										
OURT_88/3	TTTCCTCTGGTCGAGTTTGGTAAGAACTGCTCCATTGTACAGTTGTATACATATAAATCTTAATCTTTAATGGCTATTATTAATGACTTCTTTGC										
Benin	TTTCCTCTGGTCGAGTTTGGTAAGAACTGCTCCATTGTACAGTTGTATACATATAAATCTTAATCTTTAATGGCTATTATTAATGACTTCTTTGC										
Malawi_5-HL	TTTCCTCTGGTCGAGTTTGGTAAGAACTGCTCCATTGTACAGTTGTATACATATAAATCTTAATCTTTAATGGCTATTATTAATGACTTCTTTGC										
Consensus	tttcctcctggtcgagtttggtaagaactgctccattgtacagttgtatacatataaaattctaaatctttaaatggcttatttttaa.tgacttctttgc										
	101	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
Ba71V	GGCTGCTCGTTTCCACCAATGTTGGGATAAAATATTTCTTAACATATAGGTTGCTATACGTGGCCTAACATTGTTGTATACAAACAGTCG										
cons5HL_L60	GGCTGCTCGTTTCCACCAATGTTGGGATAAAATATTTCTTAACATATAGGTTGCTATACGTGGCCTAACATTGTTGTATACAAACAGTCG										
cons5HL_NHV	GGCTGCTCGTTTCCACCAATGTTGGGATAAAATATTTCTTAACATATAGGTTGCTATACGTGGCCTAACATTGTTGTATACAAACAGTCG										
OURT_88/3	GGCTGCTCGTTTCCACCAATGTTGGGATAAAATATTTCTTAACATATAGGTTGCTATACGTGGCCTAACATTGTTGTATACAAACAGTCG										
Benin	GGCTGCTCGTTTCCACCAATGTTGGGATAAAATATTTCTTAACATATAGGTTGCTATACGTGGCCTAACATTGTTGTATACAAACAGTCG										
Malawi_5-HL	GGCTGCTCGTTTCCACCAATGTTGGGATAAAATATTTCTTAACATATAGGTTGCTATACGTGGCCTAACATTGTTGTATACAAACAGTCG										
Consensus	ggctgctcgtttccaaccaatgttgggataaaaatatttcttaacatataaggttgctatacgtggcctaacatttgtgtatatacaacagtcg.....										
	201	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300
Ba71V	TGTACCAATTGTAT---CACAAATTGTATCACAAATTGTATCGCAATTGTGATAACATTGAACCTAAATAAAAAAATATAGGGTGCCGCT										
cons5HL_L60	TGTACCAATTGTAT---CACAAATTGTATCACAAATTGTATCGCAATTGTGATAACATTGAACCTAAATAAAAAAATATAGGGTGCCGCT										
cons5HL_NHV	TGTACCAATTGTAT---CACAAATTGTATCACAAATTGTATCGCAATTGTGATAACATTGAACCTAAATAAAAAAATATAGGGTGCCGCT										
OURT_88/3	TGTACCAATTGTAT---CACAAATTGTATCACAAATTGTATCGCAATTGTGATAACATTGAACCTAAATAAAAAAATATAGGGTGCCGCT										
Benin	TGTACCAATTGTAT---CACAAATTGTATCACAAATTGTATCGCAATTGTGATAACATTGAACCTAAATAAAAAAATATAGGGTGCCGCT										
Malawi_5-HL	TTGTATATATTAACCAATTGTATATACACAAATTGTGTCACAAATTGTGGGCAATCGTGATAACATTGAACCTAAATAAAAAAATATAGGGTGCCGCT										
ConsensusTgtCcaATTGTAT.....CACAAATTGTatCcaATTGTatCcgCAATtGTGATAACATTGAACCTAAATAAAAAAATATAGGGTGCCGCT										
	301	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400
Ba71V	ATGAGGGAGAGAGT---TAATATATCATATATCATTAAATGAATACACTAGTGGGTATATTAATATTACATTAATGATATTTTCAGAGCATGAGCTTAGGCC										
cons5HL_L60	ATGAGGGAGAGAGT---TAATATATCATATATCATTAAATGAATACACTAGTGGGTATATTAATATTACATTAATGATATTTTCAGAGCATGAGCTTAGGCC										
cons5HL_NHV	ATGAGGGAGAGAGT---TAATATATCATATATCATTAAATGAATACACTAGTGGGTATATTAATATTACATTAATGATATTTTCAGAGCATGAGCTTAGGCC										
OURT_88/3	ATGAGGGAGAGAGT---TAATATATCATATATCATTAAATGAATACACTAGTGGGTATATTAATATTACATTAATGATATTTTCAGAGCATGAGCTTAGGCC										
Benin	ATGAGGGAGAGAGT---TAATATATCATATATCATTAAATGAATACACTAGTGGGTATATTAATATTACATTAATGATATTTTCAGAGCATGAGCTTAGGCC										
Malawi_5-HL	ATGAGGGAGAGAGT---TAATATATCATATATCATTAAATGAATACACTAGTGGGTATATTAATATTACATTAATGATATTTTCAGAGCATGAGCTTAGGCC										
Consensus	ATGAGGGAGAGAGT---TAATATATCATATATCATTAAATGAATACACTAGTGGGTATATTAATATTACATTAATGATATTTTCAGAGCATGAGCTTAGGCC										
	401	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500
Ba71V	CATATCACACCAATAAAAAATTTTAACCTATTATGATGAGTGTTTGAACAAACAGGTTACATTACCTTTTCTCTACGAGTGTCACAGAAATTA										
cons5HL_L60	CATATCACACCAATAAAAAATTTTAACCTATTATGATGAGTGTTTGAACAAACAGGTTACATTACCTTTTCTCTACGAGTGTCACAGAAATTA										
cons5HL_NHV	CATATCACACCAATAAAAAATTTTAACCTATTATGATGAGTGTTTGAACAAACAGGTTACATTACCTTTTCTCTACGAGTGTCACAGAAATTA										
OURT_88/3	CATATCACACCAATAAAAAATTTTAACCTATTATGATGAGTGTTTGAACAAACAGGTTACATTACCTTTTCTCTACGAGTGTCACAGAAATTA										
Benin	CATATCACACCAATAAAAAATTTTAACCTATTATGATGAGTGTTTGAACAAACAGGTTACATTACCTTTTCTCTACGAGTGTCACAGAAATTA										
Malawi_5-HL	CATATCACACCAATAAAAAATTTTAACCTATTATGATGAGTGTTTGAACAAACAGGTTACATTACCTTTTCTCTACGAGTGTCACAGAAATTA										
Consensus	CaTAtCaAcCAaATaAAAAAATTTTAACCTATTATGAtGAGTGTTTGAACAAACAGGTTAcATTACCTTTTCTCTACGAGTGtCCaAGAAATTA										
	501	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600
Ba71V	ARCCAGTTTACTGGGTTGTGACTGAGCTGTTTAAAGGATCTTATCACTGGGGTAGAATTGTGGATTATCGCTTTTCTGCCAGATGGCAAGAT										
cons5HL_L60	ARCCAGTTTACTGGGTTGTGACTGAGCTGTTTAAAGGATCTTATCACTGGGGTAGAATTGTGGATTATCGCTTTTCTGCCAGATGGCAAGAT										
cons5HL_NHV	ARCCAGTTTACTGGGTTGTGACTGAGCTGTTTAAAGGATCTTATCACTGGGGTAGAATTGTGGATTATCGCTTTTCTGCCAGATGGCAAGAT										
OURT_88/3	ARCCAGTTTACTGGGTTGTGACTGAGCTGTTTAAAGGATCTTATCACTGGGGTAGAATTGTGGATTATCGCTTTTCTGCCAGATGGCAAGAT										
Benin	ARCCAGTTTACTGGGTTGTGACTGAGCTGTTTAAAGGATCTTATCACTGGGGTAGAATTGTGGATTATCGCTTTTCTGCCAGATGGCAAGAT										
Malawi_5-HL	ARCCAGTTTACTGGGTTGTGACTGAGCTGTTTAAAGGATCTTATCACTGGGGTAGAATTGTGGATTATCGCTTTTCTGCCAGATGGCAAGAT										
Consensus	ARCCAGTTTACTGGGTTGTGACTGAGCTGTTTAAAGGATCTTATCACTGGGGTAGAATTGTGGATTATCGCTTTTCTGCCAGATGGCAAGAT										
	601	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700
Ba71V	TGCAAGAGCGCCATACCATCTGGAGTCCACGGTGATCACTACGGCATAACCTTCATGAACACACACCTACTACCTGGATGATTTCCACGGCGGTC										
cons5HL_L60	TGCAAGAGCGCCATACCATCTGGAGTCCACGGTGATCACTACGGCATAACCTTCATGAACACACACCTACTACCTGGATGATTTCCACGGCGGTC										
cons5HL_NHV	TGCAAGAGCGCCATACCATCTGGAGTCCACGGTGATCACTACGGCATAACCTTCATGAACACACACCTACTACCTGGATGATTTCCACGGCGGTC										
OURT_88/3	TGCAAGAGCGCCATACCATCTGGAGTCCACGGTGATCACTACGGCATAACCTTCATGAACACACACCTACTACCTGGATGATTTCCACGGCGGTC										
Benin	TGCAAGAGCGCCATACCATCTGGAGTCCACGGTGATCACTACGGCATAACCTTCATGAACACACACCTACTACCTGGATGATTTCCACGGCGGTC										
Malawi_5-HL	TGCAAGAGTGCATACCATCTGGAGTCCACGGTGATCACTACGGCATAACCTTCATGAACACACACCTACTACCTGGATGATTTCCACGGCGGTC										
Consensus	TGCAAGAGCGCCATACCATCTGGAGTCCACGGTGATCACTACGGCATAACCTTCATGAACACACACCTACTACCTGGATGATTTCCACGGCGGTC										
	701	710	720	730	740	750	760	770	780	790	800
Ba71V	AAGAGGAGTTTTGGCTTTCTCTACACAGTGACATGATTCCGCGATTTTAAATATTAATATTTCTTATCTAAATTTGTATACATGTTTTTCAG										
cons5HL_L60	AAGAGGAGTTTTGGCTTTCTCTCTACACAGTGACATGATTCCGCGATTTTAAATATTAATATTTCTTATCTAAATTTGTATACATGTTTTTCAG										
cons5HL_NHV	AAGAGGAGTTTTGGCTTTCTCTCTACACAGTGACATGATTCCGCGATTTTAAATATTAATATTTCTTATCTAAATTTGTATACATGTTTTTCAG										
OURT_88/3	AAGAGGAGTTTTGGCTTTCTCTCTACACAGTGACATGATTCCGCGATTTTAAATATTAATATTTCTTATCTAAATTTGTATACATGTTTTTCAG										
Benin	AAGAGGAGTTTTGGCTTTCTCTCTACACAGTGACATGATTCCGCGATTTTAAATATTAATATTTCTTATCTAAATTTGTATACATGTTTTTCAG										
Malawi_5-HL	AAGAGGAGTTTTGGCTTTCTCTCTACACAGTGACATGATTCCGCGATTTTAAATATTAATATTTCTTATCTAAATTTGTATACATGTTTTTCAG										
Consensus	AAGAGGAGTTTTGGCTTTCTCTCTACACAGTGACATgATTCCGCGATTTTAAATATTAATATTTCTTATCTAAATTTGTATACATGTTTTTCAG										
	801	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900
Ba71V	ATCCTGTGTACAGTTATTAGAACTGCAATTTGATATGATGTGCGCAGGATTTTACGTGGCGGTTATCCCTGGCTGGAGGCCAATCCTTACATAA										
cons5HL_L60	ATCCTGTGTACAGTTATTAGAACTGCAATTTGATATGATGTGCGCAGGATTTTACGTGGCGGTTATCCCTGGCTGGAGGCCAATCCTTACATAA										
cons5HL_NHV	ATCCTGTGTACAGTTATTAGAACTGCAATTTGATATGATGTGCGCAGGATTTTACGTGGCGGTTATCCCTGGCTGGAGGCCAATCCTTACATAA										
OURT_88/3	ATCCTGTGTACAGTTATTAGAACTGCAATTTGATATGATGTGCGCAGGATTTTACGTGGCGGTTATCCCTGGCTGGAGGCCAATCCTTACATAA										
Benin	ATCCTGTGTACAGTTATTAGAACTGCAATTTGATATGATGTGCGCAGGATTTTACGTGGCGGTTATCCCTGGCTGGAGGCCAATCCTTACATAA										
Malawi_5-HL	ATCCTGTGTACAGTTATTAGAACTGCAATTTGATATGATGTGCGCAGGATTTTACGTGGCGGTTATCCCTGGCTGGAGGCCAATCCTTACATAA										
Consensus	ATCCTGTGTACAGTTATTAGAACTGCAATTTGATATGATGTGCGCAGGATTTTACGTGGCGGTTATCCCTGGCTGGAGGCCAATCCTTACATAA										
	901	910	919								
Ba71V	AGTTGGGCACACAGGAAC										
cons5HL_L60	AGTTGGGCACACAGGAAC										
cons5HL_NHV	AGTTGGGCACACAGGAAC										
OURT_88/3	AGTTGGGCACACAGGAAC										
Benin	AGTTGGGCACACAGGAAC										
Malawi_5-HL	AGTTGGGCACACAGGAAC										
Consensus	AGTTGGGCACACAGGAAC										

Verificou-se que também o *4-CL* é semelhante ao nível da sequência codificante, em L60 e NHV, em Ba71V, e nos isolados de campo português OURT 88/3, e espanhóis E70 e E75 (Fig. 38). Na região de 80-90 pb a montante do codão de iniciação da tradução (posição 40-50 da figura 38), detectaram-se algumas substituições nucleotídicas comparando L60 e NHV, iguais nos isolados NHV e OURT 88/3. No entanto, a distância ao codão de iniciação e o facto de esta zona que não apresentar semelhanças óbvias com potenciais sequências reguladoras da transcrição, parece indicar apenas variação numa região intergénica que não se reflectirá na proteína expressa.

No alinhamento das sequências dos isolados europeus com a sequência do isolado do Benin, observou-se, mais uma vez, uma semelhança de praticamente 100% ao longo de toda a sequência nucleotídica analisada, ocorrendo algumas substituições nucleotídicas apenas em zonas não codificantes. Pelo contrário, o isolado do Malawi mostrou de novo muitas diferenças, nomeadamente, referindo as mais evidentes: várias substituições nucleotídicas ao longo da sequência codificante do gene e também fora desta, deleção de vários nucleótidos imediatamente a montante do codão de iniciação da tradução, numa zona rica em As e Ts, e inserção de vários nucleótidos a cerca de 130 bases a jusante do codão de terminação da tradução (Fig. 38).

Figura 38. Alinhamento das sequências consenso obtidas por sequenciação de *4-CL* em L60 e NHV (**cons4CL_L60** e **cons4CL_NHV**), com sequências correspondentes conhecidas de isolados de VPSA de diferentes origens.

Lis60-4CLp27: sequência codificante de *4-CL* previamente publicada para L60 (acesso *GenBank* U91736); **E75-4CLp27:** sequência codificante de *4-CL* no isolado espanhol E75 (acesso *GenBank* U91734); **Ba71V:** isolado adaptado a células de linha contínua Vero (acesso *GenBank* NC_001659; genoma: 28902-29923, cadeia complementar reversa); **OURT 88/3:** isolado de campo português avirulento (acesso *GenBank* AM712240; genoma: 31058-32078 pb, cadeia complementar reversa); **E70:** isolado de campo espanhol (acesso *GenBank* AF327841; genoma: 17153-18175 pb, cadeia complementar reversa); **Benin 97/1:** isolado patogénico do Benin, África Sub-Saariana Ocidental (acesso *GenBank* AM712239; genoma: 41258-40237, cadeia complementar reversa); **Malawi Lil20/1:** isolado patogénico do Malawi, África Sub-Saariana Oriental (acesso *GenBank* AF327842; genoma: 11137-12160, cadeia complementar reversa). As posições 1-24 e 1018-1038 correspondem aos locais de hibridação dos oligómeros utilizados para amplificação da região por PCR sobre DNA de L60 e NHV. Em 131 e 803 localizam-se os codões de iniciação e terminação da transcrição respectivamente.

[illegible]

Figura 38 (continuação):

```

701   710   720   730   740   750   760   770   780   790   800
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
Ba71V   ACATGTGGTATTGAACCAATTAAAGATGAAATTTCTGCATGCATGCAAAACACTTAATTATAAACACTATAAAACACTGAATTTTAGTGTCAAAC
Lis60-4CLp27 ACATGTGGTATTGAACCAATTAAAGATGAAATTTCTGCATGCATGCAAAACACTTAATTATAAACACTATAAAACACTGAATTTTAGTGTCAAAC
cons4CL_L60 ACATGTGGTATTGAACCAATTAAAGATGAAATTTCTGCATGCATGCAAAACACTTAATTATAAACACTATAAAACACTGAATTTTAGTGTCAAAC
cons4CL_NHV ACATGTGGTATTGAACCAATTAAAGATGAAATTTCTGCATGCATGCAAAACACTTAATTATAAACACTATAAAACACTGAATTTTAGTGTCAAAC
OURT_88/3 ACATGTGGTATTGAACCAATTAAAGATGAAATTTCTGCATGCATGCAAAACACTTAATTATAAACACTATAAAACACTGAATTTTAGTGTCAAAC
E75-4CLp27 ACATGTGGTATTGAACCAATTAAAGATGAAATTTCTGCATGCATGCAAAACACTTAATTATAAACACTATAAAACACTGAATTTTAGTGTCAAAC
Benin    ACATGTGGTATTGAACCAATTAAAGATGAAATTTCTGCATGCATGCAAAACACTTAATTATAAACACTATAAAACACTGAATTTTAGTGTCAAAC
E70      ACATGTGGTATTGAACCAATTAAAGATGAAATTTCTGCATGCATGCAAAACACTTAATTATAAACACTATAAAACACTGAATTTTAGTGTCAAAC
Malawi_4-CL ACATGTGGTATTGAACCAATTAAAGATGAAATTTCTGCATGCATGCAAAACACTTAATTATAAACACTATAAAACACTGAATTTTAGTGTCAAAC
Consensus ACATGTGGTATTGAACCAATTAAAGATGAAATTTCTGCATGCATGCAAAACACTTAATTATAAACACTATAAAACACTGAATTTTAGTGTCAAAC

801   810   820   830   840   850   860   870   880   890   900
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
Ba71V   TTGAGACAAAAAAA-GATGAGTTTATGGGGATAAACAAATA-CTTTTTTTCGATGGTTTCATGACTAATGATAAACCAATGTAGTTTAACCGAA
Lis60-4CLp27 TTGAGACAAAAAAA-GATGAGTTTATGGGGATAAACAAATA-CTTTTTTTCGATGGTTTCATGACTAATGATAAACCAATGTAGTTTAACCGAA
cons4CL_L60 TTGAGACAAAAAAA-GATGAGTTTATGGGGATAAACAAATA-CTTTTTTTCGATGGTTTCATGACTAATGATAAACCAATGTAGTTTAACCGAA
cons4CL_NHV TTGAGACAAAAAAA-GATGAGTTTATGGGGATAAACAAATA-CTTTTTTTCGATGGTTTCATGACTAATGATAAACCAATGTAGTTTAACCGAA
OURT_88/3 TTGAGACAAAAAAA-GATGAGTTTATGGGGATAAACAAATA-CTTTTTTTCGATGGTTTCATGACTAATGATAAACCAATGTAGTTTAACCGAA
E75-4CLp27 TTGAGACAAAAAAA-GATGAGTTTATGGGGATAAACAAATA-CTTTTTTTCGATGGTTTCATGACTAATGATAAACCAATGTAGTTTAACCGAA
Benin    TTGAGACAAAAAAA-GATGAGTTTATGGGGATAAACAAATA-CTTTTTTTCGATGGTTTCATGACTAATGATAAACCAATGTAGTTTAACCGAA
E70      TTGAGACAAAAAAA-GATGAGTTTATGGGGATAAACAAATA-CTTTTTTTCGATGGTTTCATGACTAATGATAAACCAATGTAGTTTAACCGAA
Malawi_4-CL TTGAGACAAAAAAA-GATGAGTTTATGGGGATAAACAAATA-CTTTTTTTCGATGGTTTCATGACTAATGATAAACCAATGTAGTTTAACCGAA
Consensus TTGAGACAAAAAAA-GATGAGTTTATGGGGATAAACAAATA-CTTTTTTTCGATGGTTTCATGACTAATGATAAACCAATGTAGTTTAACCGAA

901   910   920   930   940   950   960   970   980   990   1000
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
Ba71V   TTTAGTTTAACCGGATTTAGTTTAACCA-----TTTCTCCTGTTGTACCATTTTAATCTACATAAACCTCAGCATCTTTTAAGAAAT
Lis60-4CLp27 TTTAGTTTAACCGGATTTAGTTTAACCA-----TTTCTCCTGTTGTACCATTTTAATCTACATAAACCTCAGCATCTTTTAAGAAAT
cons4CL_L60 TTTAGTTTAACCGGATTTAGTTTAACCA-----TTTCTCCTGTTGTACCATTTTAATCTACATAAACCTCAGCATCTTTTAAGAAAT
cons4CL_NHV TTTAGTTTAACCGGATTTAGTTTAACCA-----TTTCTCCTGTTGTACCATTTTAATCTACATAAACCTCAGCATCTTTTAAGAAAT
OURT_88/3 TTTAGTTTAACCGGATTTAGTTTAACCA-----TTTCTCCTGTTGTACCATTTTAATCTACATAAACCTCAGCATCTTTTAAGAAAT
E75-4CLp27 TTTAGTTTAACCGGATTTAGTTTAACCA-----TTTCTCCTGTTGTACCATTTTAATCTACATAAACCTCAGCATCTTTTAAGAAAT
Benin    TTTAGTTTAACCGGATTTAGTTTAACCA-----TTTCTCCTGTTGTACCATTTTAATCTACATAAACCTCAGCATCTTTTAAGAAAT
E70      TTTAGTTTAACCGGATTTAGTTTAACCA-----TTTCTCCTGTTGTACCATTTTAATCTACATAAACCTCAGCATCTTTTAAGAAAT
Malawi_4-CL TTTAGTTTAACCGGATTTAGTTTAACCA-----TTTCTCCTGTTGTACCATTTTAATCTACATAAACCTCAGCATCTTTTAAGAAAT
Consensus TTTAGTTTAACCGGATTTAGTTTAACCA-----TTTCTCCTGTTGTACCATTTTAATCTACATAAACCTCAGCATCTTTTAAGAAAT

1001  1010  1020  1030  1038
|-----|-----|-----|-----|
Ba71V   AGGCTTCACGAATTTCTTCCGCTGTTATATTTCCCTG
Lis60-4CLp27 AGGCTTCACGAATTTCTTCCGCTGTTATATTTCCCTG
cons4CL_L60 AGGCTTCACGAATTTCTTCCGCTGTTATATTTCCCTG
cons4CL_NHV AGGCTTCACGAATTTCTTCCGCTGTTATATTTCCCTG
OURT_88/3 AGGCTTCACGAATTTCTTCCGCTGTTATATTTCCCTG
E75-4CLp27 AGGCTTCACGAATTTCTTCCGCTGTTATATTTCCCTG
Benin    AGGCTTCACGAATTTCTTCCGCTGTTATATTTCCCTG
E70      AGGCTTCACGAATTTCTTCCGCTGTTATATTTCCCTG
Malawi_4-CL AGGCTTCGCTAATTTCTTCCGCTGTTATATTTCC
Consensus aggcttcacgaatttcttccgctggttatattccctg

```


4.4.2. Quantificação da expressão em mRNA de *5-HL* e *4-CL* ao longo das infecções

Com o objectivo de avaliar a expressão dos genes de VP5A apontados como inibidores da apoptose, foram desenvolvidos ensaios de PCR em tempo real ou PCR quantitativo (qPCR), para comparar os níveis de mRNA de cada gene nas células hospedeiras a vários tempos ao longo de 16h de infecção.

A técnica de qPCR é relativamente recente e traduz-se por uma grande sensibilidade na detecção de genes pouco expressos, verificando-se também uma precisão na quantificação muito superior à técnica convencional de RT-PCR, geralmente considerada semi-quantitativa. Esta baseia-se na quantidade de amplificados acumulados após um número fixo de ciclos, muitas vezes difícil de determinar de forma a não esgotar os componentes da reacção, ou a evitar a acumulação de factores inibitórios como pirofosfatos e perda de actividade polimerásica (Gause & Adamovicz, 1994). Em qPCR a quantificação baseia-se no ciclo ao qual é detectada amplificação acima do nível basal, baseando-se numa emissão de fluorescência por moléculas intercaladoras de DNA ou sondas, proporcional ao número de sequências alvo amplificadas. Quanto maior o nº de cópias da sequência alvo numa amostra de cDNA mais precocemente é detectado um aumento significativo de fluorescência.

Para utilizar a técnica de qPCR no nosso sistema, foram desenhados oligómeros específicos para amplificação de sequências correspondentes a transcritos dos genes virais *5-HL* e *4-CL* em cDNA, e também de genes constitutivos de suíno. A expressão destes últimos, ao ser quantificada nas mesmas amostras de cDNA, permite obter um controlo interno da qualidade e quantidade do mRNA original, como se refere adiante. As sequências correspondentes ao mRNA dos genes alvo, foram quantificadas recorrendo-se à tecnologia de “Sybr Green” e à construção de rectas padrão com DNAs de concentração conhecida, para uma quantificação absoluta, como se expõe seguidamente.

4.4.2.1. Desenho de oligómeros e definição das condições óptimas de PCR quantitativo

Foram desenhados oligómeros específicos para as sequências codificantes dos genes virais *5-HL* (oligómeros 5HL) e *4-CL* (oligómeros 4CL) e também para os genes constitutivos de suíno *HPRT1* (*hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1*) (oligómeros HPR), *GAPDH* (*glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) (oligómeros GAP), e *ciclofilina A* (oligómeros CIC), tal como descrito em materiais e métodos, de forma a obter amplificados em cDNA com tamanhos aproximados que permitissem eficiências de amplificação semelhantes em qPCR.

Os oligómeros para genes constitutivos foram desenhados para se localizarem em zonas de junção exão-exão e/ou em diferentes exões, uma prática que previne a amplificação a partir de potencial DNA contaminante, ou que resulta num produto de amplificação de maior dimensão.

Foi obtida amplificação apenas a partir de cDNA e não amplificação em DNA com os oligómeros HPR e GAP, confirmada através de PCR sobre alíquotas de DNA e cDNA obtidas a partir de macrófagos de suíno (Fig. 39). Para termo de comparação e para confirmar se a alíquota de DNA utilizada era amplificável, utilizou-se paralelamente o par de oligómeros CIC, tendo como alvo de hibridação exões diferentes separados por um intrão, pelo que em DNA existe amplificação de uma sequência mais longa que inclui o intrão. Curiosamente, este par de oligómeros amplificou também em DNA uma sequência de tamanho aproximado à amplificada em cDNA (Fig. 39). Uma vez que está descrito um pseudogene para a ciclofilina de suíno (Acesso *GenBank* AF543683), admitimos, sem embargo de outras explicações, que esta amplificação possa corresponder a um segundo pseudogene da ciclofilina ainda não identificado. Por este motivo, os oligómeros para a *ciclofilina A* não foram utilizados nos estudos subsequentes de qPCR.

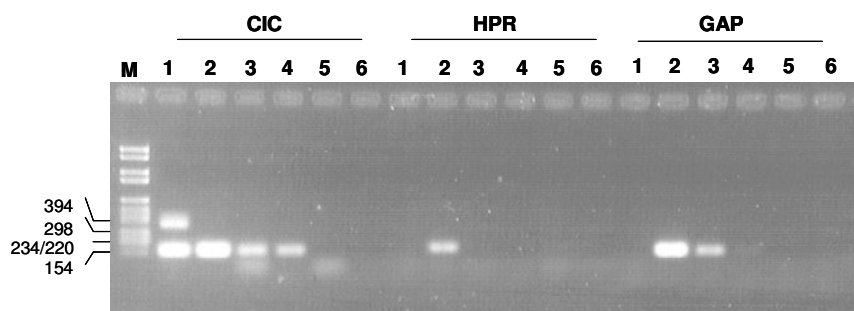


Figura 39. Visualização por electroforese do resultado de PCR sobre DNA e cDNA de macrófagos de suíno, com oligómeros desenhados para quantificação da expressão de genes constitutivos em qPCR.

O par de oligómeros CIC tem como alvo a sequência do gene da ciclofilina A, localizando-se em exões diferentes separados por um intrão. O par HPR tem como alvo a sequência de *HPRT1*, localizando-se ambos oligómeros *forward* e *reverse* em zonas de junção exão-exão. GAP tem como alvo *GAPDH*, localizando-se o oligómero *forward* sobre zona de junção exão-exão e o *reverse* num exão diferente. A amplificação foi sobre alíquotas de: DNA de macrófagos (1); diluições seriadas de cDNA de macrófagos 1:40 (2), 1:400 (3), 1:4000 (4); DNA extraído de vírus L60 purificado (5); água (6). M: marcador de pesos moleculares (VI, Roche).

Os oligómeros 5HL, 4CL, HPR e GAP foram utilizados para obtenção de DNA de concentração conhecida (DNA standard) para a construção de rectas padrão. Para tal, foram amplificados por PCR com cada par de oligómeros, produtos específicos a partir de cDNA de células infectadas (Fig. 40), ao que se seguiu a sua purificação e determinação da concentração em número de moléculas.

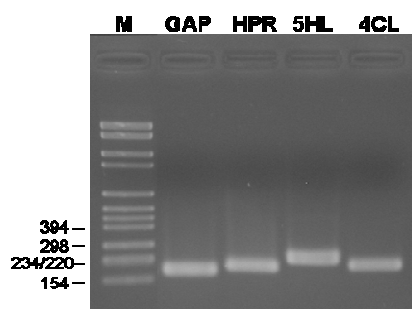


Figura 40. Visualização em electroforese de produtos de amplificação por PCR, a partir de cDNA, com os oligómeros GAP, HPR, 5HL e 4CL, para utilização como DNA standard em qPCR.

M: marcador de pesos moleculares (VI, Roche).

De cada DNA standard assim obtido, foram realizadas diluições seriadas da ordem de 1:5 e estas utilizadas para otimizar as condições de qPCR (concentração de oligómeros *forward* e *reverse* e temperaturas de ligação e polimerização), de

forma a obter produtos específicos e eficiências de amplificação próximas de 100%. As eficiências foram calculadas através dos declives das rectas resultantes dos Ct (“cycle threshold”) para cada diluição standard, construídas pelo software do aparelho utilizado (7300 System – Applied Biosystems) (Fig. 41). As condições em que se obteve uma eficiência de amplificação igual ou superior a 95% para cada par de oligómeros, que foram consideradas óptimas, estão representadas na tabela 4 (todos os oligómeros funcionaram optimamente nas mesmas condições). Obtiveram-se ainda coeficientes de regressão nas rectas padrão (R²) sempre superiores a 0,998 (Fig. 41).

A especificidade de cada amplificação foi verificada através da observação das curvas de dissociação produzidas pela elevação lenta da temperatura no final da corrida de qPCR (Fig. 42). Quando é atingida a temperatura de *melting* (T_m) do DNA de dupla cadeia produzido durante a amplificação, o aparelho de PCR em tempo real grava a diminuição de fluorescência emitida pelo Sybr Green I resultante da desnaturação do DNA, pelo que quando existem produtos de amplificação não específicos numa mesma reacção é observada mais do que uma T_m resultante de amplificados de diferentes tamanhos. Confirmou-se ainda por electroforese a obtenção de produtos únicos de amplificação, com o tamanho esperado, nas condições de amplificação optimizadas (Fig. 43).

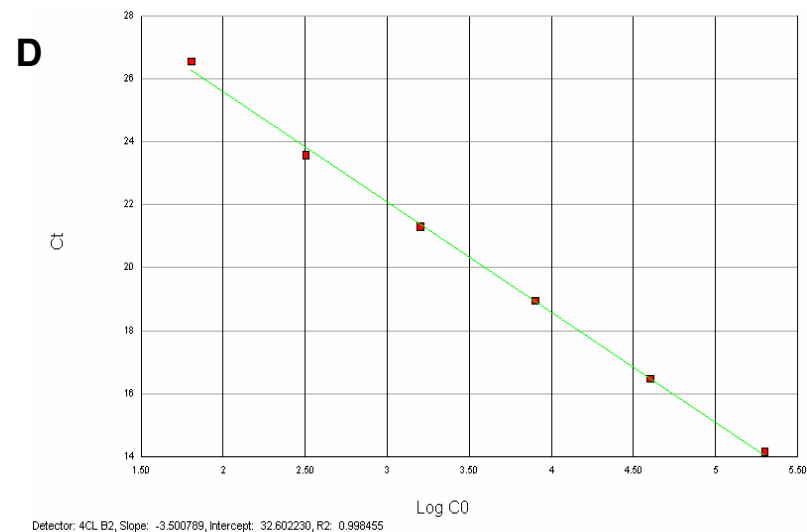
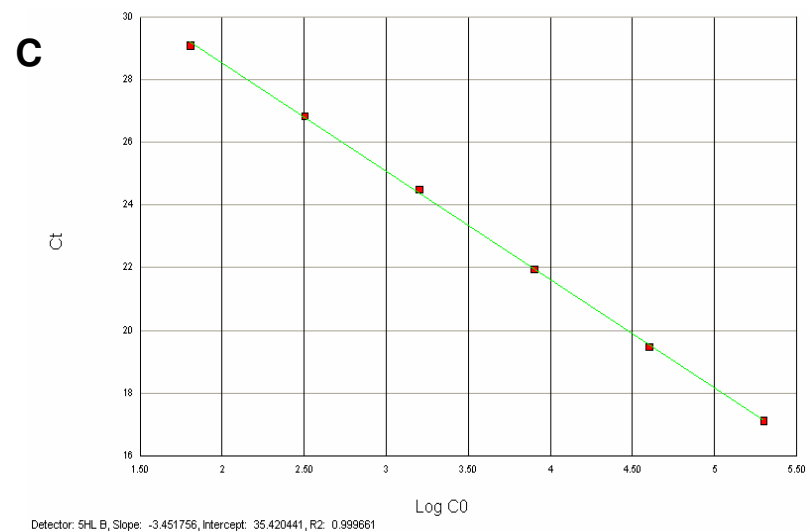
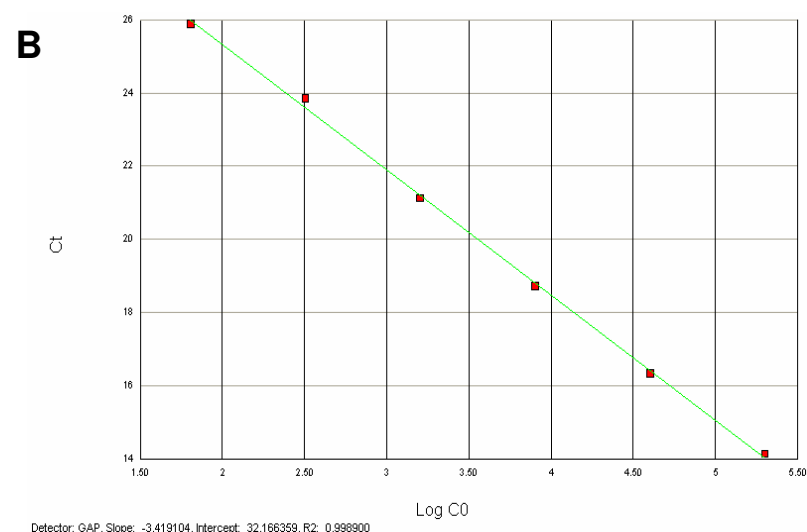
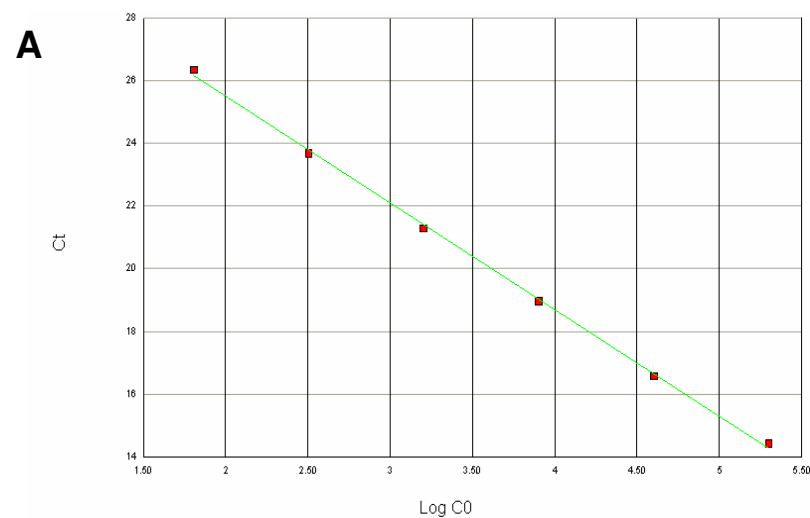


Figura 41. Rectas padrão construídas pelo software do aparelho de qPCR, resultantes da amplificação, nas condições otimizadas, de DNA standard com cada um dos oligómeros: **A** – HPR, **B** – GAP, **C** – 5HL, **D** – 4CL. Em abcissas estão representados os logaritmos das concentrações (em nº de cópias) e em ordenadas o Ct (de “cycle threshold”).

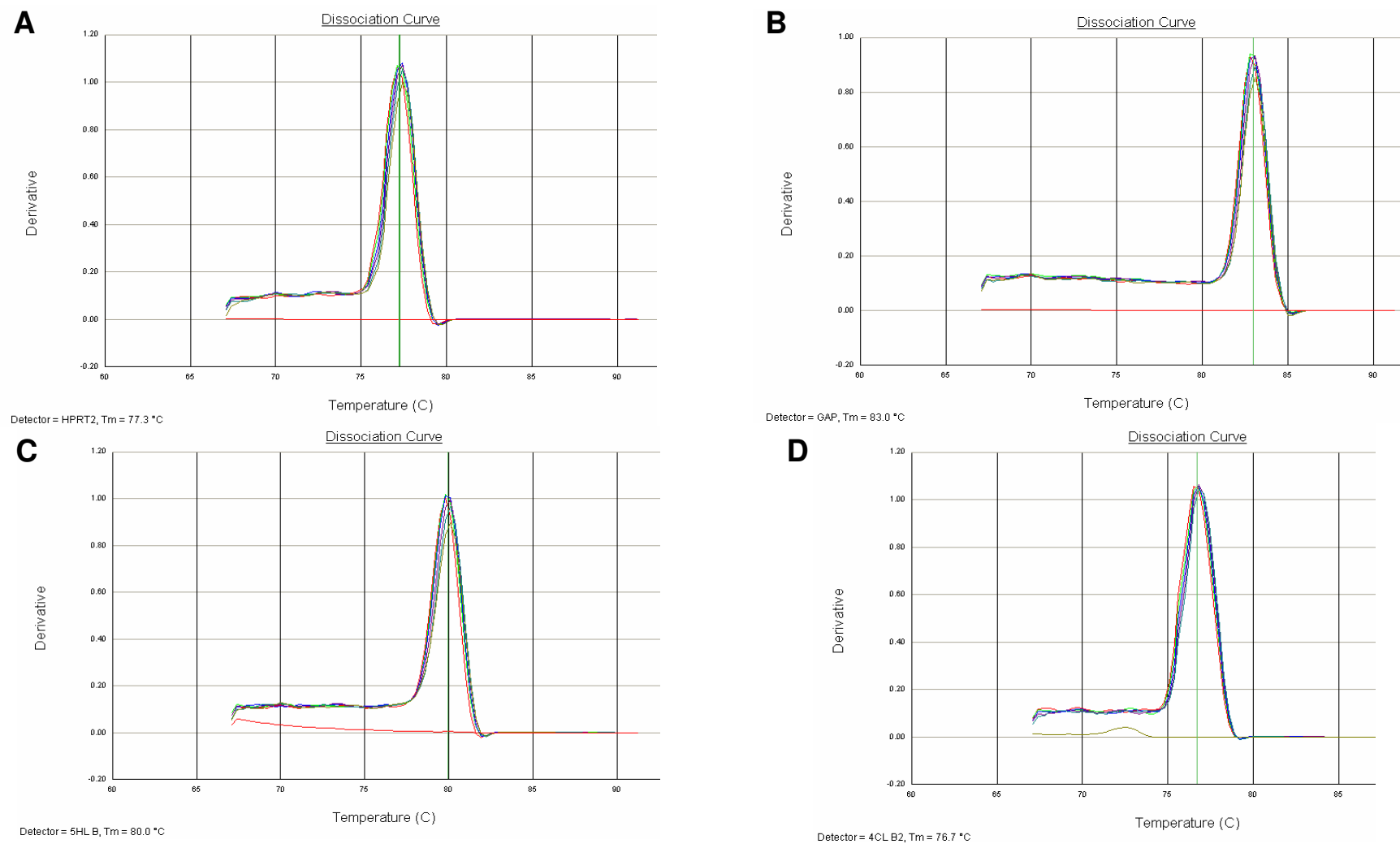


Figura 42. Curvas de dissociação dos produtos amplificados por qPCR a partir de DNA standard, nas condições otimizadas de amplificação com os oligômeros: **A** – HPR; **B** – GAP; **C** – 5HL; **D** – 4CL.

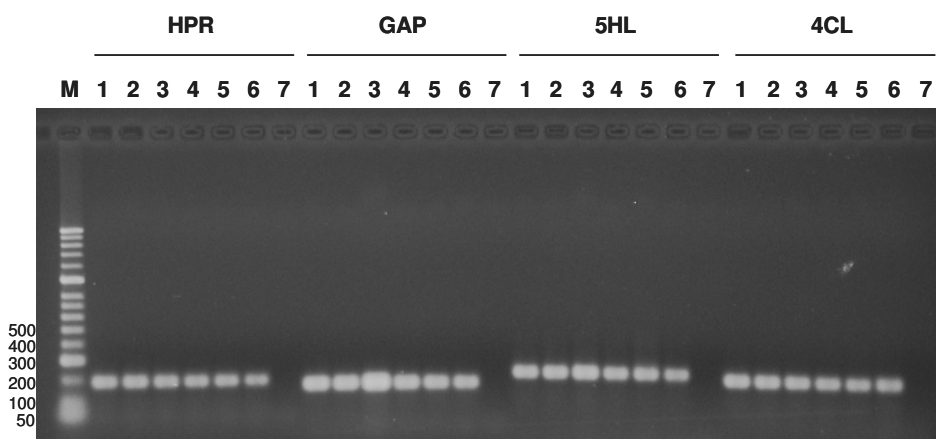


Figura 43. Electroforese de produtos de amplificação por qPCR sobre diluições seriadas de DNA standard, nas condições otimizadas, com os diferentes oligómeros HPR, GAP, 5HL e 4CL.

Em cada diluição existia o seguinte nº de moléculas da sequência alvo: 1 – 200 000; 2 – 40 000; 3 – 8 000; 4 – 1 600; 5 – 320; 6 – 64; 7 – 0. M: marcador de pesos moleculares (“HyperLadder II”, Bioline).

Para que a quantificação em cDNA fosse correctamente inferida das rectas padrão, construídas com DNA standard, verificou-se igualmente a eficiência de amplificação de cada par de oligómeros sobre cDNA. Para tal, foram feitas diluições seriadas da ordem de 1:2 de cDNA contendo as sequências alvo, e estas foram submetidas a qPCR nas condições previamente otimizadas para DNA standard. As diluições de cDNA foram de 1:2 em vez de 1:5 à semelhança do DNA standard para que a detecção de amplificação não tivesse início em ciclos muito tardios para as diluições mais altas. Para que o software construísse rectas padrão, atribuiu-se ainda a cada primeira diluição um número de cópias fictício, uma vez que as sequências alvo na amostra de cDNA utilizada não tinham sido ainda quantificadas. Obtiveram-se deste modo rectas padrão (Fig. 44) cujo declive permitiu calcular a eficiência da amplificação a partir de cDNA. Confirmaram-se eficiências semelhantes às obtidas com DNA standard (Tabela 4), e uma vez mais, elevados coeficientes de regressão nas rectas padrão ($R^2 \geq 0,994$) (Fig. 44). As curvas de dissociação mostraram igualmente amplificações específicas e T_m s semelhantes aos obtidos em DNA standard para cada produto amplificado (Fig. 45), e a visualização dos produtos de amplificação por electroforese confirmou a sua especificidade (Fig. 46).

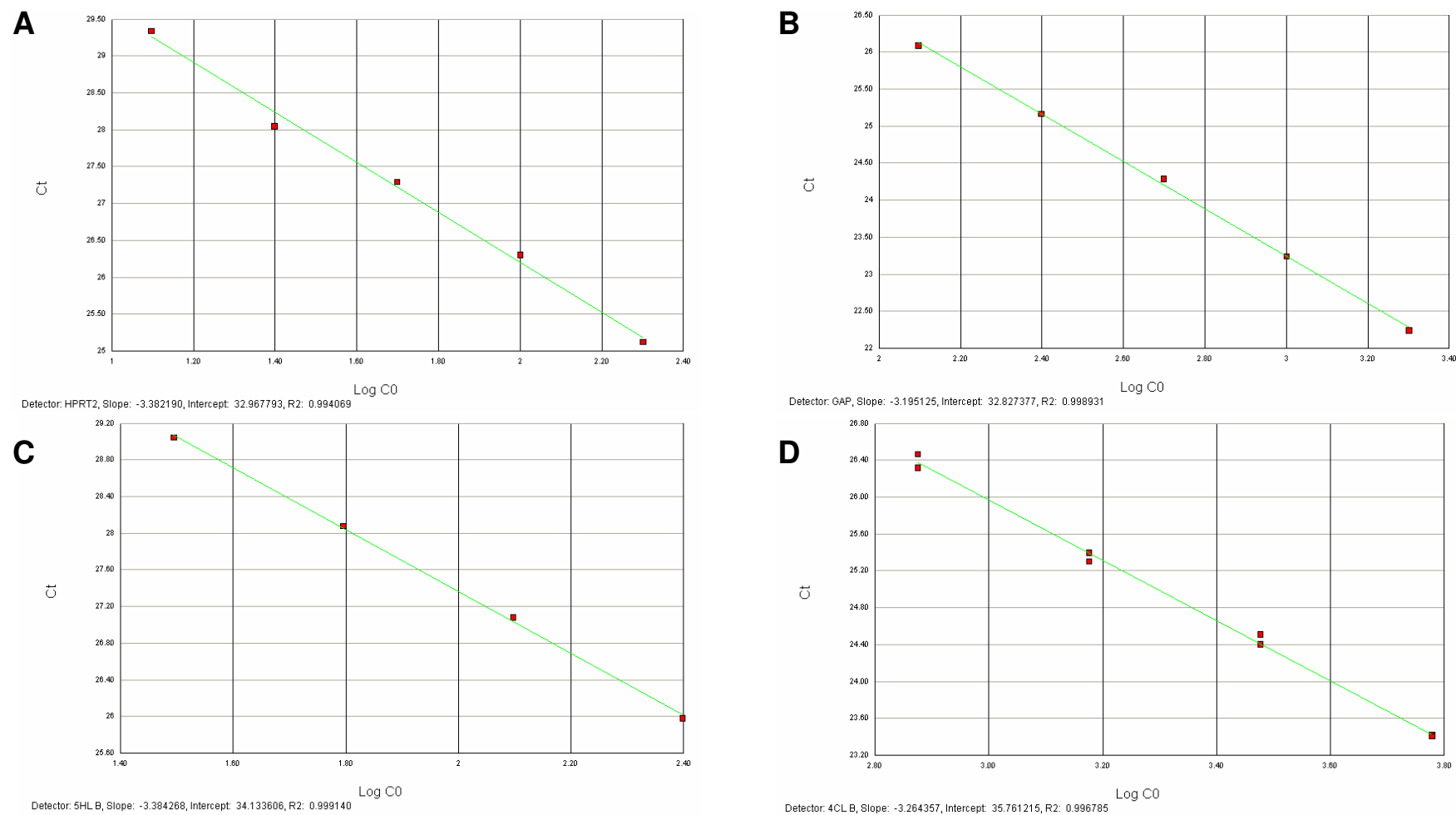


Figura 44. Curvas padrão resultantes da amplificação por qPCR, nas condições otimizadas, de diluições seriadas 1:2 de cDNA, com cada um dos oligômeros: **A** – HPR, **B** – GAP, **C** – 5HL, **D** – 4CL. Em abscissas estão representados os logaritmos das concentrações (n° de cópias fictício) e em ordenadas o Ct (de “cycle threshold”).

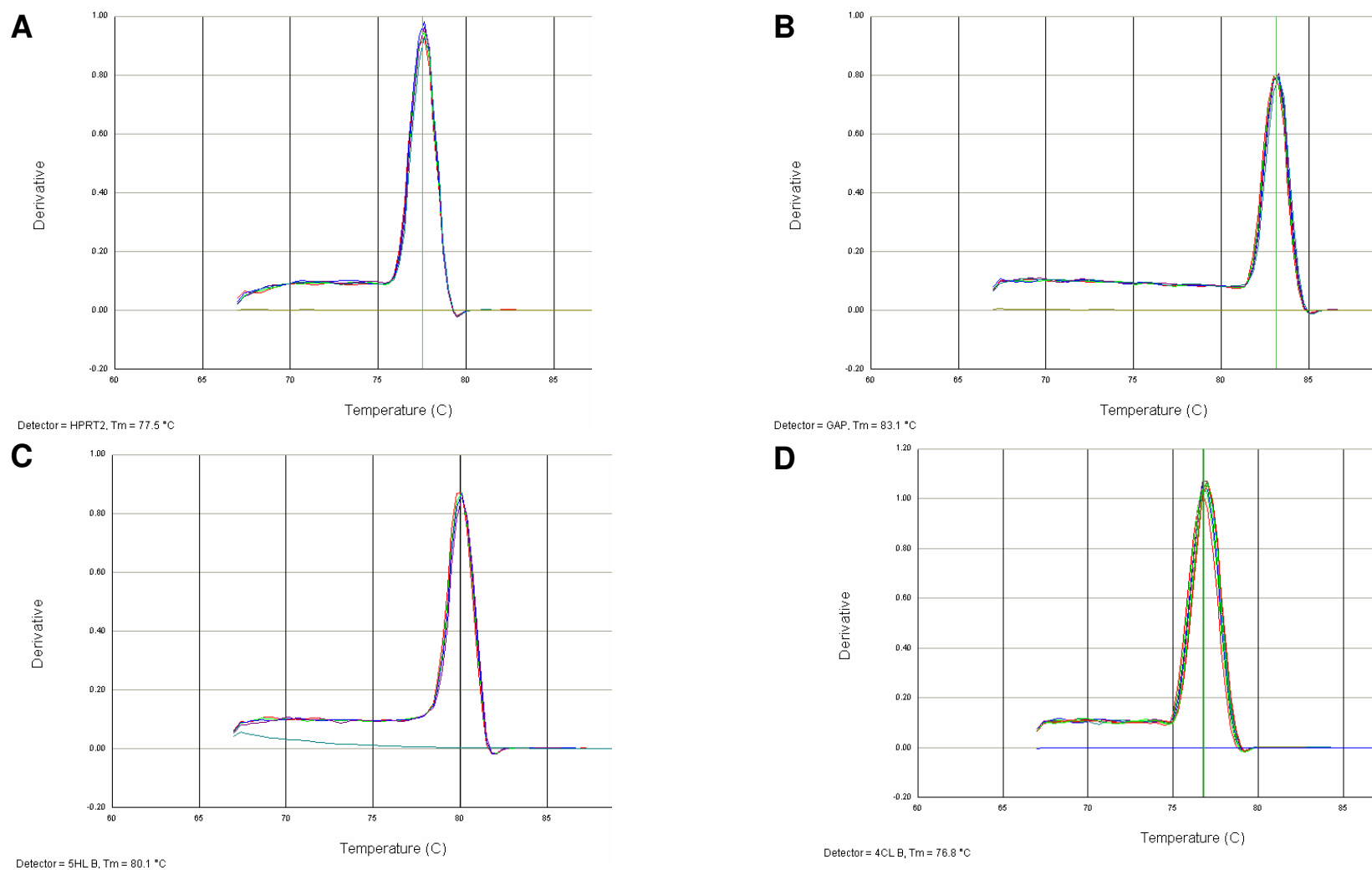


Figura 45. Curvas de dissociação dos produtos amplificados por qPCR a partir de cDNA, nas condições otimizadas de amplificação com DNA standard com os oligômeros: A – HPR; B – GAP; C – 5HL; D – 4CL.

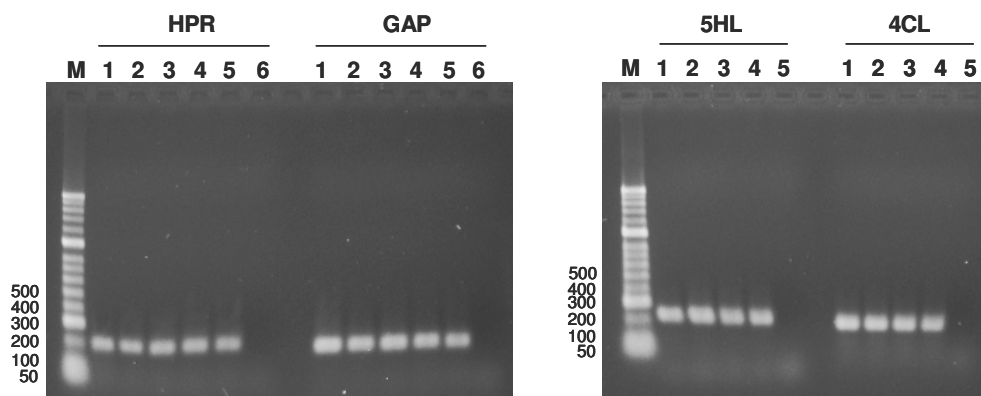


Figura 46. Electroforese de produtos de amplificação por qPCR sobre diluições seriadas de cDNA, nas condições otimizadas para DNA standard, com os diferentes oligómeros HPR, GAP, 5HL e 4CL.

Atribuiu-se a cada diluição o seguinte nº de moléculas (fictício) da sequência alvo: **HPR** – 200 (1), 100 (2), 50 (3), 25 (4), 12,5 (5), 0 (6); **GAP** – 2000 (1), 1000 (2), 500 (3), 250 (4), 125 (5), 0 (6); **5HL** – 250 (1), 125 (2), 62,5 (3), 31,25 (4), 0 (5); **4CL** – 6000 (1), 3000 (2), 1500 (3), 750 (4), 0 (5). M: marcador de pesos moleculares (“HyperLadder II”, Bioline).

Tabela 4. Condições otimizadas de amplificação em qPCR com os diferentes oligómeros e respectivas eficiências sobre DNA standard e cDNA.

Oligómero	Forward / Reverse (nM)	Condições de qPCR	Eficiência de amplificação (%)	
			DNA standard	cDNA
5HL	500/500	1x: 95 °C 2' 45" 40x: 95 °C 15" 57 °C 15" 60 °C 45"	95	98
4CL	500/500		98	102
HPR	500/500		97	98
GAP	500/500		96	105

Uma vez estabelecidas as condições óptimas de amplificação para cada par de oligómeros, tanto a partir de DNA standard como de cDNA, procedeu-se à quantificação do número de cópias de cada sequência alvo, na forma de cDNA, aos diferentes tempos de infecção ou cultura, através da construção de rectas padrão para cada gene paralelamente na mesma reacção de qPCR.

4.4.2.2. Expressão de genes constitutivos de suíno e verificação da sua validade como controlos endógenos no modelo em estudo

A expressão de genes constitutivos é utilizada como controlo endógeno ou factor de normalização da quantificação da expressão génica por qPCR, de forma a corrigir variações entre amostras resultantes de erros ou problemas experimentais como por exemplo: diferente nº de células utilizadas no ensaio, erro de quantificação do RNA a ser utilizado em RT-PCR, diferentes viabilidades celulares na altura da colheita das amostras, ou diferentes eficiências de conversão de RNA em cDNA. No entanto, dependendo das condições experimentais, a expressão dos chamados genes constitutivos pode ser sujeita a regulação, tornando-os inviáveis como factores de normalização em estudos de qPCR (Dheda *et al.*, 2005, Huggett *et al.*, 2005). Por este motivo, vários autores têm vindo a referir a importância da validação de genes constitutivos como referência para cada modelo experimental, desenvolvendo software para comparação da expressão de inúmeros genes paralelamente e selecção dos mais estáveis nas condições experimentais específicas de estudo (Andersen *et al.*, 2004, Huggett *et al.*, 2005, Pfaffl *et al.*, 2004, Vandesompele *et al.*, 2002). Porém, os custos inerentes a tal processo de selecção através da comparação de múltiplos genes são elevados e o processo laborioso, e implicam ainda gasto de quantidades elevadas de amostra, um factor limitante em muitos ensaios. Adicionalmente, mesmo que sejam seleccionados desta forma vários genes, a resolução do ensaio é sempre dependente da variabilidade dos genes de referência no sistema experimental em estudo (Huggett *et al.*, 2005).

Para o nosso modelo de estudo seleccionaram-se para avaliação dois genes considerados constitutivos, *GAPDH* (*glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) e *HPRT* (*hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1*), com base em estudos prévios realizados por outros autores em macrófagos e diferentes tecidos de suíno (Foss *et al.*, 1998). Estes verificaram que *GAPDH* é expresso a níveis que tornam o seu mRNA facilmente detectável, mesmo através de metodologias relativamente pouco sensíveis como Northern blot com RNA total, tornando-o adequado como controlo de genes de expressão abundante. *GAPDH* apresentou ainda menor variabilidade nos diferentes tecidos estudados, ou em macrófagos sujeitos a tratamentos de 2, 6 e 22h com lipopolissacárido, concanavalina A, PMA ou PMA e ionóforo, do que outro gene constitutivo de expressão semelhante, a β -actina. O mRNA de HPRT por outro lado,

foi detectado apenas através de metodologias altamente sensíveis, como Northern blot com RNA poliadenilado ou RT-PCR, apontando-o como ideal para controlo da expressão de genes pouco expressos. Adicionalmente, a sua expressão mostrou ser ainda mais estável em macrófagos sujeitos aos diferentes tratamentos que a de *GAPDH*. Idealmente, o nosso objectivo seria o de utilizar ambos *GAPDH* e *HPRT* para normalização dos resultados de expressão de *5-HL* e *4-CL*, uma vez que a utilização de mais do que um gene de referência é considerada uma abordagem adequada em estudos de qPCR (Vandesompele *et al.*, 2002).

Para avaliar a estabilidade de expressão de *GAPDH* e *HPRT* no nosso modelo experimental, comparámos por qPCR a sua expressão em células infectadas com L60, NHV e não infectadas (controlo), aos diferentes tempos de cultura ou infecção de 1,5h, 4h, 8h, 12h e 16h (Fig. 47).

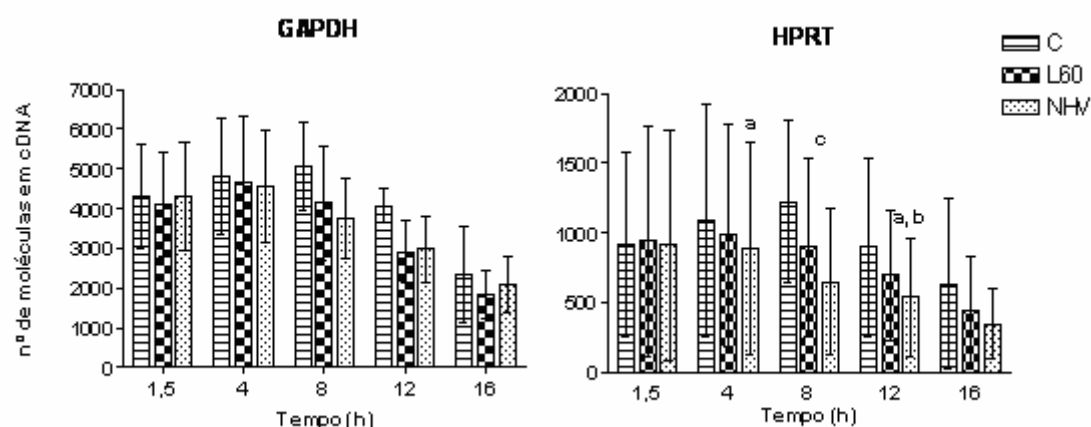


Figura 47. Quantificação por qPCR da expressão dos genes constitutivos *GAPDH* e *HPRT*, em amostras de cDNA de células controlo não infectadas (C) e infectadas com L60 ou NHV, a diferentes tempos pós-infecção ou cultura.

Os dados representam as médias \pm desvio padrão de 5 ensaios independentes. A cada ensaio, culturas controlo e infectadas foram realizadas em paralelo com células com origem no mesmo suíno (amostras emparelhadas), à excepção de controlo às 8h, em que o nº de ensaios foi de 3. A análise estatística realizada para cada tempo foi a de Anova para medições repetidas com pós-teste Tuckey, excepto para as 8h, em que utilizou Anova normal com pós-teste Tuckey para comparar C, L60 e NHV, e teste t emparelhado para comparar L60 e NHV.

^a significativamente diferente de C ao mesmo tempo; ^b significativamente diferente de L60 ao mesmo tempo; ^c diferença significativa entre L60 e NHV ($p=0,0072$).

Quando se compararam as expressões a cada tempo, verificaram-se para *HPRT* diferenças estatisticamente significativas, às 4 e 12h, entre células controlo e infectadas por NHV, e também entre infectadas com L60 e NHV, às 8h e 12h. Não se obtiveram diferenças estatisticamente significativas, a nenhum tempo pesquisado, entre a expressão de *HPRT* em células controlo e em células infectadas por L60, ao contrário do que aconteceu com NHV. A infecção por NHV parece assim diminuir a expressão de *HPRT* a tempos intermédios do seu ciclo infeccioso, entre as 4 e as 12h de infecção. Pelo contrário, na expressão de *GAPDH* não se obtiveram diferenças estatisticamente significativas, nem entre células controlo e infectadas, nem entre infectadas, pelo que a expressão de *GAPDH* parece ser mais estável que a de *HPRT* no nosso modelo experimental de infecção. De notar, uma vez que os nossos estudos se baseiam numa comparação da expressão de genes virais entre células infectadas com dois isolados de diferente virulência, é fulcral que não existam diferenças significativas de expressão, entre ambas infecções, relativamente ao gene a ser utilizado como referência endógena para normalização. Este foi o caso para *GAPDH* mas não para *HPRT*, pelo que se considerou apenas o primeiro para os nossos estudos de expressão.

Observou-se para ambos os genes uma diminuição da expressão aos tempos mais tardios de cultura e infecção, principalmente às 16h. Este facto poderá estar relacionado com o envelhecimento das células em cultura, e portanto, com diminuição da sua viabilidade, reflectindo-se na expressão de genes constitutivos. Apesar disso, uma vez que não se verificaram diferenças significativas na expressão de *GAPDH* entre ambas infecções, a nenhum tempo pós-infecção pesquisado, considerámos este gene válido para os nossos objectivos de estudo.

4.4.2.3. Comparação dos níveis de expressão de 5-HL e 4-CL ao longo da infecção com L60 e NHV

Os resultados obtidos por quantificação absoluta em número de moléculas correspondentes ao mRNA dos genes virais 5-HL e 4-CL, presentes nas amostras de cDNA aos vários tempos pós-infecção, foram normalizados com o número de moléculas presentes nas mesmas amostras do gene escolhido como referência, *GAPDH* (Fig. 48).

A transcrição de ambos 5-HL e 4-CL surgiu muito precocemente após a entrada do vírus nas células, à 1,5h PI, aumentando claramente ao longo da infecção até às 16h PI. O 4-CL foi descrito previamente por outros autores como sendo de expressão tardia durante o ciclo infeccioso em células de linha contínua Vero com VPSA adaptado (Chacon *et al.*, 1995). No entanto, em macrófagos detectámos transcrição deste gene muito precocemente após infecção. À 1,5h PI observou-se ainda uma expressão mais elevada de ambos os genes virais em infecção com L60 (3 a 6 vezes para 5-HL e 2 a 6 vezes para 4-CL).

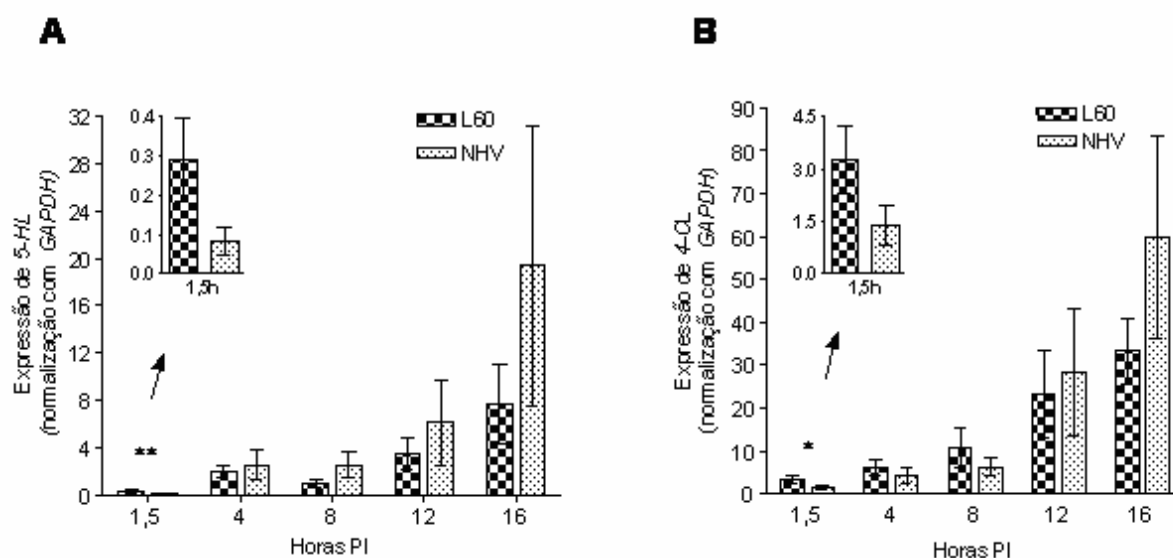


Figura 48. Expressão em mRNA dos genes virais 5-HL (A) e 4-CL (B) a diferentes horas pós-infecção (PI) com L60 e NHV.

O nº de moléculas dos transcritos virais, presentes em cada amostra de cDNA, foi dividido pelo nº de moléculas presentes na mesma amostra para o gene constitutivo de referência, *GAPDH*, para normalização. Os dados representam a média \pm erro padrão de 5 ensaios independentes, com infecções realizadas em paralelo com células com origem no mesmo suíno a cada ensaio. ** $p=0,0014$, * $p=0,015$.

4.4.3. Análise da transcrição de *4-CL* ao longo do ciclo infeccioso por Northern blot

Uma vez que se detectou por qPCR uma transcrição não esperada muito precoce do gene viral *4-CL* em macrófagos infectados, pretendeu-se confirmar este resultado também ao nível da visualização do seu mRNA em Northern blot. Para tal, foi utilizado RNA total extraído de culturas de macrófagos infectados em paralelo com L60 e NHV, aos diferentes tempos de infecção muito precoce (1,5h) precoce (8h) e tardia (16h). Como controlo de hibridação não específica foi também extraído RNA de culturas não infectadas. O mRNA de *4-CL* foi detectado através de uma sonda de RNA complementar, marcada com biotina, obtida por transcrição *in vitro* a partir de um plasmídeo com a sequência de *4-CL* clonada entre promotores de RNA polimerases, como descrito em materiais e métodos. A sonda resultante, de cerca de 855 bases, inclui cerca de 100 pb finais da sequência do gene *A542R* adjacente a *4-CL* (com orientação de transcrição oposta), prolongando-se ao longo da sequência de *4-CL*, desde o seu final até cerca de 100 pb a jusante do ATG.

Confirmou-se a existência de transcritos de *4-CL* muito precocemente em infecção de macrófagos com ambos os isolados L60 e NHV, à 1,5h PI, cuja abundância aumenta claramente ao longo do tempo de infecção (Fig. 49).

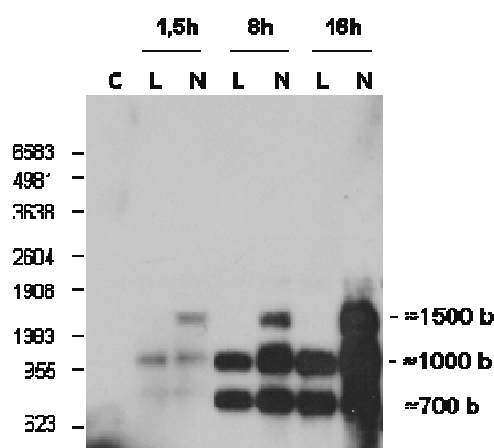


Figura 49. Autorradiografia de Northern blot para detecção de transcritos de *4-CL* a diferentes tempos pós-infecção com L60 e NHV, através de uma sonda de RNA complementar marcada com biotina.

Utilizou-se RNA total de macrófagos infectados com L60 (L) e NHV (N) durante 1,5h, 8h e 16h, e RNA total de macrófagos de controlo não infectados (C) com 16h de cultura. Do lado esquerdo da figura estão representadas as posições e nº de bases das bandas do marcador de pesos moleculares de RNA utilizado (Promega).

Foram observados 3 transcritos de dimensões diferentes, com cerca de 700, 1000 e 1500 bases. O transcrito de 1500 bases foi no entanto observado apenas em infecção com NHV, estando presente a todos os tempos ao longo da infecção. O transcrito de 700 bases observou-se claramente apenas às 8h e 16h PI em ambas infecções (Fig. 49).

Com o objectivo de confirmar a especificidade de hibridação da sonda de RNA utilizada, em virtude de a sua sequência ser bastante longa e incluir regiões que não fazem parte do mRNA de *4-CL*, nomeadamente uma pequena sequência de 75 nucleótidos proveniente do plasmídeo de clonagem, recorreu-se a uma segunda sonda marcada com biotina, desta vez de DNA, obtida através de amplificação por PCR de uma região de 270 pb da sequência codificante de *4-CL*. Escolheu-se para este estudo o tempo de 16h PI, em que todos os tipos de transcritos estavam melhor representados. Apesar da menor sensibilidade deste tipo de sonda comparativamente a sondas de RNA, detectaram-se os mesmos tipos de transcritos em macrófagos infectados com L60 e NHV (Fig. 50), confirmando-se assim a especificidade dos resultados obtidos anteriormente.

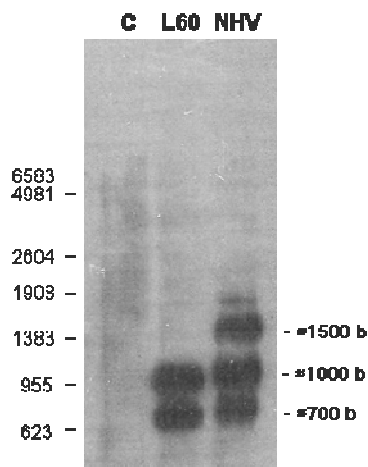


Figura 50. Autorradiografia de Northern blot para detecção de transcritos de *4-CL* às 16h de infecção com L60 e NHV, através de uma sonda de DNA específica para a sequência codificante marcada com biotina.

Para Northern blot utilizou-se RNA total de macrófagos não infectados (C) e infectados em paralelo durante 16h com L60 (L) e NHV (N).

Estudos prévios de outros autores acerca da transcrição do gene *4-CL* em modelo de infecção de células de linha contínua Vero (Chacon *et al.*, 1995), mostraram por Northern blot a existência de dois transcritos a tempo tardio de

infecção de 1300 e 750 bases, cujo início de transcrição, localizado por “primer extension”, se situa 21 a 24 nucleótidos a montante do codão de iniciação da ORF. Os mesmos autores atribuíram a terminação da transcrição à presença de dois motivos de 7 a 8 resíduos consecutivos de timidilato localizados 38 e 407 pb a jusante do codão de terminação da ORF (Fig. 51), motivos que constituem em VPSA um sinal para terminação de mRNAs tanto precoces como tardios (Almazan *et al.*, 1992, Almazan *et al.*, 1993).

No nosso estudo através de Northern blot apenas nos foi possível determinar um tamanho aproximado dos transcritos, calculado a partir das distâncias de migração dos fragmentos de RNA do marcador de pesos moleculares, como descrito em materiais e métodos. Os transcritos de 700 e 1000 bases estão suficientemente próximos do descrito para a transcrição deste gene em modelo Vero (Fig. 51), com início 24 a 21 pb a montante do codão de iniciação da tradução e término na primeira ou segunda das sequências de 7 a 8Ts a jusante do codão de terminação. O transcrito adicional detectado apenas em NHV, de cerca de 1500 bases, é consistente com a transcrição a terminar numa terceira sequência de 7Ts a uma distância de 845 pb do codão de terminação, perfazendo um total de aproximadamente 1500 bases (Fig. 51). O motivo da existência deste terceiro transcrito em infecção com NHV e o seu significado para a expressão do gene *4-CL* neste isolado viral é desconhecido.

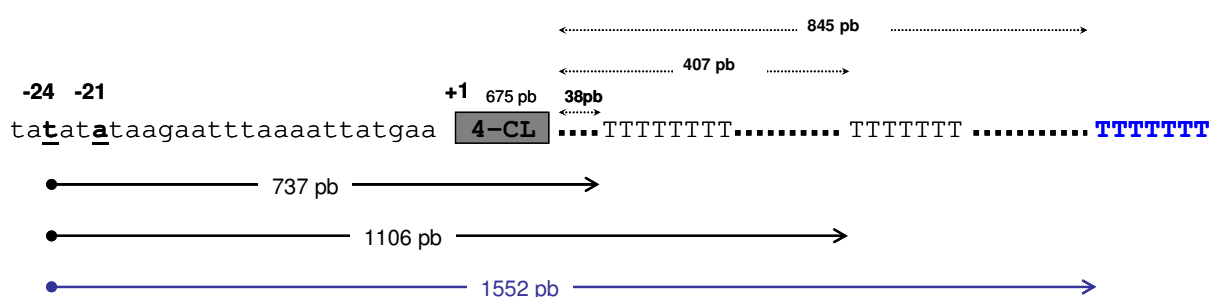


Figura 51. Representação esquemática dos locais descritos para iniciação e terminação da transcrição de *4-CL/A224L*.

As distâncias até aos locais de terminação, representadas por setas a preto, foram descritas por Chacon *et al.* (1995). A azul está representada a possível terminação do transcrito de 1500 bases detectado em infecção com NHV. A tracejado estão representadas as distâncias do codão de terminação de *4-CL* até cada um dos três motivos de politimidilato a jusante da ORF (retângulo cinzento).

4.4.4. Estudo da expressão da proteína viral 4-CL ao longo das infecções

A expressão de 4-CL foi estudada em extractos proteicos de culturas de macrófagos, às 1,5h, 4h, 8h e 16h de infecção em paralelo com L60 e NHV, através da técnica de Western blot. A presença da proteína 4-CL de 27 kDa nas células infectadas foi detectada claramente apenas aos tempos de 8h e 16h PI com ambos os isolados virais (Fig. 52). Apesar de se ter detectado mRNA específico deste gene a tempos mais precoces de infecção como referido anteriormente, os nossos resultados sugerem que o início da produção da proteína ocorrerá entre as 4h e 8h PI.

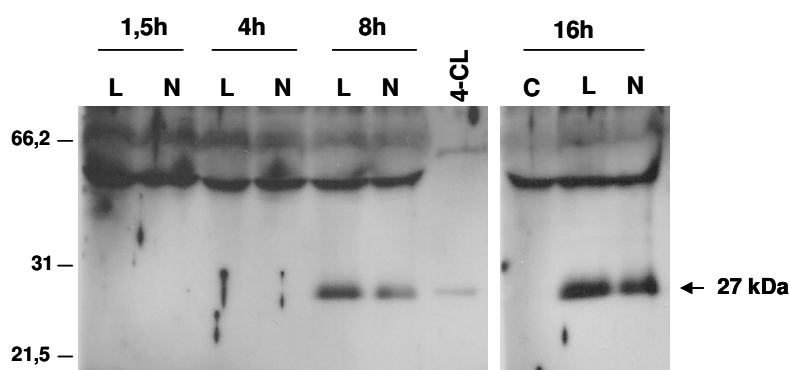


Figura 52. Autorradiografia de Western blot para análise da expressão da proteína viral 4-CL em macrófagos infectados com L60 (L) ou NHV (N) a diferentes tempos de infecção. Extractos proteicos de culturas controlo não infectadas (C) com 16h, bem como a proteína 4-CL/A224L (de 27 kDa), foram também utilizados para confirmação da especificidade das bandas detectadas. Do lado esquerdo da figura estão representadas as localizações e pesos moleculares de algumas das bandas do marcador de pesos moleculares de proteína utilizado (SDS-PAGE Molecular Weight Standards, Broad Range - BIO RAD).

A quantificação das bandas obtidas em Western blot revelou em todos os ensaios realizados uma maior expressão da proteína em infecção com L60, comparativamente com NHV, sendo em média 2 vezes superior às 8h PI e 1,6 vezes superior às 16h PI (Tabela 5). Observou-se também um aumento dos níveis de 4-CL das 8h para as 16h: 1,2 a 1,3 vezes em infecção com L60 e 2,3 a 2,9 vezes em infecção com NHV (em 3 ensaios independentes, realizados com células com origem no mesmo suíno ao longo de 16h de infecção).

Para efeitos de comparação da expressão em mRNA com a produção efectiva da proteína viral, alguns dos extractos proteicos celulares utilizados nestes ensaios

tiveram origem em culturas em que se quantificaram igualmente os níveis de mRNA de *4-CL*. Em dois destes ensaios, obtiveram-se níveis inferiores de mRNA do gene *4-CL* em células infectadas com L60 comparativamente com NHV, tanto às 8h PI como às 16h PI (Tabela 6). A esta menor expressão ao nível de mRNA não correspondeu no entanto uma menor expressão de proteína, tendo-se verificado pelo contrário a existência de mais proteína em infecção com L60. Estes resultados parecem indicar que pelo menos no caso deste gene viral, a expressão de mRNA não se reflecte na produção de proteína viral, ocorrendo alguma forma de regulação da sua expressão ao nível pós-transcricional.

Tabela 5. Comparação da quantidade de proteína viral 4-CL produzida em macrófagos infectados em paralelo com L60 e NHV após 8h e 16h de infecção.

Tempo	Razão de proteína 4-CL: L60 / NHV
8h	$2 \pm 0,5$
16h	$1,6 \pm 0,2$

Bandas específicas de 4-CL, detectadas por Western blot, foram quantificadas por densitometria. Os dados representam a média \pm erro-padrão de 4 e 5 ensaios independentes às 8h e 16h PI respectivamente.

Tabela 6. Comparação dos níveis de expressão do gene *4-CL*, ao nível de mRNA e de proteína, em células infectadas em paralelo com L60 e NHV, após 8h e 16h de infecção.

Identificação do ensaio	Razão de expressão de <i>4-CL</i> : L60 / NHV			
	mRNA		proteína	
	8h	16h	8h	16h
1	1,96	0,98	3,4	1,4
2*	0,67	0,36	1,9	1,2
3*	0,64	0,28	1,6	1,5

Em cada um dos 3 ensaios independentes, as quantificações foram realizadas a partir de RNA e proteína obtidos em simultâneo das mesmas células.

* Ensaios em que se verificou uma correlação negativa entre a quantidade de mRNA e a quantidade de proteína presente nas células.

5. DISCUSSÃO

O mecanismo de apoptose é utilizado pelos organismos multicelulares para eliminarem células que por diferentes razões se tornaram desnecessárias ou potencialmente perigosas devido, entre outras, a mutações ou infecções por vírus. Muitos vírus, especialmente os grandes vírus de DNA com ciclos de replicação longos e complexos, desenvolveram ao longo da evolução estratégias para inibir o desencadear de apoptose nas células hospedeiras, de forma a que estas se mantenham viáveis até que consigam replicar-se. Poxvírus, adenovírus e herpesvírus por exemplo codificam vários genes anti-apoptóticos que inibem este mecanismo na célula (Koyama *et al.*, 2000). Tal como os exemplos anteriores, também o VPSA possui no seu genoma genes putativamente inibidores de apoptose, *5-HL* e *4-CL*, homólogos de *bcl-2* e de *iap* respectivamente (Chacon *et al.*, 1995, Neilan *et al.*, 1993, Yanez *et al.*, 1995), cuja acção anti-apoptótica foi comprovada através de ensaios de expressão destes genes em células de linha induzidas a morrer por apoptose (Afonso *et al.*, 1996, Brun *et al.*, 1996, Nogal *et al.*, 2001, Revilla *et al.*, 1997). Em modelo de infecção por VPSA em células Vero, apesar de se ter verificado que o sinal indutor de apoptose surge logo após entrada de vírus na célula, durante a descapsidação viral no citoplasma (Carrascosa *et al.*, 2002), indicadores de apoptose como actividade de caspases, presença de citocromo c no citoplasma e fragmentação internucleossómica de DNA, são claramente detectados apenas a tempos em que a replicação viral está em vias de ser concluída, entre as 12-16h de infecção (Carrascosa *et al.*, 2002, Hernaez *et al.*, 2004, Hurtado *et al.*, 2004, Nogal *et al.*, 2001).

O estudo de mecanismos de morte celular em macrófagos de suíno infectados por VPSA de diferente virulência revela-se de extrema importância por diferentes razões. Na sua maioria e até a data, estes estudos têm sido conduzidos em modelo de infecção *in vitro* de células de linha contínua Vero com VPSA adaptado. Este sistema, embora permita a caracterização de mecanismos relevantes sobre a interacção do agente com uma célula hospedeira, não equivale ao sistema de infecção de macrófagos de suíno, as células alvo preferenciais da infecção natural pelo VPSA, e que foram utilizadas nos nossos estudos. A infecção em macrófagos reveste-se da maior importância porque são células do sistema imunitário com um

papel relevante na resposta inata e no delineamento da resposta imunológica do hospedeiro, através da apresentação de antígenos e secreção de imunomoduladores como citocinas e quimiocinas entre outros. No entanto, são ainda desconhecidos muitos aspectos do efeito da infecção por isolados de VPSA de diferente virulência nos mecanismos de morte celular em macrófagos, o que pode ter implicações relevantes no desencadeamento de respostas imunitárias na infecção natural.

Ao contrário da infecção com isolados altamente virulentos em que os suínos exibem quadros clínicos fatais, na infecção com isolados de VPSA de baixa virulência os animais sobrevivem geralmente com formas de doença crónica ou inaparente, e sobrevivem a re-infecção posterior com isolados virulentos homólogos (Leitao *et al.*, 2001, Mebus & Dardiri, 1980), conseguindo portanto estabelecer uma resposta imunitária eficaz contra o agente. Desconhecem-se no entanto quais os factores virais ou do hospedeiro responsáveis pelos diferentes resultados de infecção com isolados de diferente virulência.

Em organismos superiores o resultado de uma infecção viral é determinado maioritariamente pela resposta do sistema imunitário e pelos recursos virais para interferir com esta. Adicionalmente à apoptose que é despoletada em células alvo do hospedeiro como resultado directo da infecção, também células do sistema imunitário como LCTs e células NK, ao reconhecerem células infectadas, induzem a sua morte por apoptose (Aubert & Jerome, 2003). Esta pode ser induzida através da libertação de perforina e granzimas ou alternativamente pela interacção de ligandos apoptogénicos à superfície de LCTs, (ex. FasL), com receptores de morte à superfície das células alvo (Adrain *et al.*, 2005, Trapani & Smyth, 2002). Vários estudos dão fortes indicações de que LCT e células NK têm um papel importante no combate à infecção por VPSA, uma vez que a sua acção é desencadeada em animais infectados com isolados de baixa virulência que sobrevivem a re-infecção com isolados altamente virulentos homólogos (Leitao *et al.*, 2001, Martins *et al.*, 1988, Martins *et al.*, 1993, Oura *et al.*, 2005). Também ao nível da acção destas células do sistema imunitário, a capacidade de inibição de apoptose na célula hospedeira poderá constituir uma importante ferramenta de evasão viral.

Para melhor caracterizar a modulação de apoptose por VPSA e a sua importância para a patogenia da PSA e/ou para a evasão viral, propusemo-nos estudar diferentes aspectos daquele mecanismo em macrófagos de suíno, durante

infecção *in vitro* em paralelo com dois isolados de diferente virulência: o isolado altamente virulento, L60, e o isolado de baixa virulência não hemadsorvente, NHV. Os nossos estudos incidiram num período de tempo de infecção que permite ao vírus completar o seu ciclo de vida nas células hospedeiras, no decurso de 18h aproximadamente, tendo-se pesquisado a ocorrência de apoptose em duas fases diferentes da infecção: fase precoce, enquanto decorre a replicação do DNA viral (8h PI), e fase tardia, em que a replicação e morfogénese viral estarão concluídas (18h PI).

A inoculação de culturas primárias de macrófagos de suíno em paralelo com L60 e NHV não revelou diferenças significativas no nº de células infectadas, nem às 8h nem às 18h PI com cada um dos isolados. Igualmente, os títulos de progenia viral obtidos ao fim de 18h horas de infecção foram semelhantes. Estas observações permitem considerar que os resultados de estudos utilizando este modelo de infecção não serão influenciados por diferentes capacidades infecciosas ou replicativas dos dois isolados nas células hospedeiras até às 18h de infecção *in vitro*.

Os estudos realizados para determinar a eficácia da infecção por ambos os vírus através de provas de imunofluorescência, sugerem um aumento para sensivelmente o dobro no número de células infectadas ao longo do tempo de infecção (cerca de 31% para 68% em média), apesar de as infecções terem sido sincronizadas no seu início. Este aumento das 8h para as 18h PI poderá resultar da infecção se desenvolver a ritmos diferentes em distintos macrófagos numa mesma cultura. De facto, foi sugerido por outros autores que a susceptibilidade à infecção por VPSA nos macrófagos presentes numa mesma cultura varia consoante os seus diferentes fenótipos e actividades, e estes diferem ainda entre culturas obtidas de diferentes animais (McCullough *et al.*, 1993). Segundo estes autores, células CD44⁺, da linhagem mieloide (DH59 positivas), não inflamatórias e apresentando baixa actividade fagocítica, são mais susceptíveis a infecção. As culturas primárias de macrófagos utilizadas nos nossos estudos foram obtidas a partir de sangue periférico de animais “outbreak”, sendo também provavelmente constituídas por populações heterogéneas de macrófagos. Por outro lado, está descrito que a gemulação de novos viriões de células infectadas por VPSA pode ser observada a partir das 10h PI, embora este acontecimento possa variar no tempo consoante o isolado viral (Brookes *et al.*, 1996, Pan *et al.*, 1980). É portanto plausível que o

aumento de células infectadas observado nas nossas condições de estudo das 8h para as 18h, resulte de novas infecções a partir da progenia viral entretanto formada, e/ou do desenvolvimento da infecção num maior número de células.

Ao tempo precoce de 8h, com cerca de 31% de macrófagos infectados, não se observou qualquer diminuição da viabilidade celular, por comparação com culturas controlo não infectadas realizadas em paralelo. Ao tempo tardio de 18h de infecção a viabilidade celular sofreu um decréscimo, que foi no entanto pouco pronunciado (10-15%) e semelhante em ambas as infecções, apesar da percentagem de células infectadas em cultura a este tempo tardio ser substancialmente superior, em média 68%. Ao tempo muito tardio de 40h o decréscimo da viabilidade foi acentuado, principalmente na infecção por L60, que provocou uma diminuição de cerca de 60%, enquanto NHV induziu uma diminuição de cerca de 40%. O diferente grau de virulência dos isolados não se parece assim reflectir numa morte diferencial das células hospedeiras *in vitro* a não ser em tempos muito tardios da infecção.

Procurou-se averiguar de seguida se a morte celular induzida a tempos tardios seria devida ao desencadeamento de apoptose. Às 18h ou 24h PI observou-se FIN do DNA das culturas infectadas tanto com L60 como com NHV, revelada por um padrão de migração em electroforese do DNA “em escada”. Este resultado foi confirmado pela visualização da morfologia nuclear das células em cultura. Às 18h PI, uma clara percentagem de células apresentaram núcleos picnóticos e/ou fragmentados (em média 38% e 42% em infecção com L60 e NHV respectivamente) em comparação com células de culturas não infectadas (contendo cerca de 18% de núcleos picnóticos), sem que se detectasse através desta metodologia uma diferença significativa entre infecção com L60 ou NHV. Estas observações confirmaram que ambos os isolados induzem morte por apoptose em culturas de macrófagos a tempo tardio de infecção. Apesar da morte celular ser detectável apenas a tempos tardios, às 8h PI observou-se um aumento do nº de núcleos picnóticos em ambas as infecções (em média 25% e 27% de núcleos picnóticos em infecção com L60 e NHV respectivamente, 17% em culturas controlo).

Metodologias quantitativas de parâmetros bioquímicos de apoptose - actividade de caspase-3 e acumulação de oligonucleossomas de DNA resultantes de FIN nos citoplasmas celulares - permitiram determinar com maior rigor diferenças nos níveis de apoptose induzidos por L60 ou NHV em macrófagos. Verificámos que ao longo da infecção por L60, embora se detectasse um aumento ligeiro da actividade de

caspase-3 logo às 8h PI (em média 1,4 vezes o valor no controlo não infectado), esta actividade não aumentou significativamente às 18h PI (passando a 1,6 vezes o controlo), um resultado ainda mais expressivo se considerarmos que neste período de tempo o nº de células infectadas nas culturas duplicou. Pelo contrário, em infecção com NHV ocorreu um aumento significativo da actividade desta caspase ao longo da infecção (passando das 8h para as 18h, em média, de 1,5 para 3 vezes o valor do controlo). Concordantemente, apenas em extractos celulares de culturas infectadas por NHV durante 18h se detectou uma quantidade significativa do fragmento activo de caspase-3 por Western blot. Este resultado sugere que no decurso da infecção por L60, a inibição da actividade desta caspase efectora do processo apoptótico ocorre ao nível do processamento proteolítico da procaspase-3. Relativamente à FIN de DNA, às 8h PI observaram-se níveis superiores nas culturas infectadas por NHV comparativamente à infecção por L60 (relativamente aos níveis de culturas controlo, 1,8 vezes em NHV e 1,4 vezes em L60, em média). Às 18h PI no entanto, os níveis de FIN induzidos por ambos os isolados foram aproximados (em média 2,1 vezes em infecção por L60 e 2,3 vezes em infecção por NHV), apesar da inibição da actividade de caspase-3 ao longo da infecção por L60.

A FIN de DNA, um acontecimento tardio na via de execução apoptótica, é geralmente desencadeada na sequência da activação de caspase-3. No entanto, o bloqueio da actividade de caspases através de inibidores específicos revelou a existência de programas alternativos para a indução de morte celular (Vandenabeele *et al.*, 2006). Têm surgido na literatura evidências de execução de apoptose independente da actividade de caspases em vários sistemas celulares e sob diferentes estímulos (Belmokhtar *et al.*, 2003, Lockshin & Zakeri, 2004, O'Connell *et al.*, 2006). Moléculas apoptogénicas libertadas da mitocôndria durante a indução de apoptose, como AIF ou EndoG, têm a capacidade de directamente induzir os aspectos apoptóticos de condensação da cromatina e degradação do DNA, ou clivagem internucleossómica deste, respectivamente (Li *et al.*, 2001, Modjtahedi *et al.*, 2006, Saelens *et al.*, 2004). Nos nossos estudos, a adição do inibidor geral e irreversível de caspases, zVAD-fmk, a culturas de macrófagos ao longo de infecção com L60 ou NHV, resultou numa inibição significativa da actividade de caspase-3 às 18h PI, mas não da FIN de DNA ao mesmo tempo pós-infecção. Igualmente, não se observou um aumento da viabilidade celular às 18h ou 40h PI com este tratamento. Estes resultados parecem indicar que a apoptose continua a ser executada a

tempos tardios de infecção por L60 ou NHV mesmo com a actividade de caspases inibida ao longo da infecção, sendo aparentemente, pelo menos parcialmente, independente destas proteases.

Eventualmente, todas as células que sofrem infecção por vírus acabam por morrer, mas a morte por apoptose e subsequente fagocitose por outras células previne o processo inflamatório que se produz se a infecção provocar a lise da célula hospedeira, com a consequente “chamada de atenção” de células do sistema imunitário para a presença de vírus. Deste modo, o desencadeamento de apoptose poderá não ser um entrave à propagação viral, pelo contrário, desde que o vírus tenha tempo de replicar e produzir nova progenia antes da morte da célula, ou do comprometimento das vias sintéticas celulares essenciais à sua multiplicação. Existem relatos de vírus animais como HSV-1 (“herpes simplex virus type 1”), poliovírus e VSV (“vesicular stomatitis virus”), que conseguem replicar com alguma eficiência apesar de as suas células hospedeiras entrarem claramente em apoptose (Koyama *et al.*, 2000). Igualmente no caso do VPSA, Vallee *et al.* (2001) relataram que durante infecção de células endoteliais de suíno com um isolado altamente virulento, Malawi Lil-20, este conseguiu replicar-se eficazmente apesar de as células infectadas entrarem precocemente em apoptose, às 4h PI. Apesar de tudo, a presença de múltiplos genes anti-apoptóticos na generalidade dos vírus animais complexos confirma a sua necessidade de controlar a apoptose da célula hospedeira, pelo que esta terá um efeito deletério em alguma fase do ciclo de vida viral (Koyama *et al.*, 2000).

No nosso modelo de estudo, o isolado L60 inibiu a activação de caspase-3 ao longo de 18h de infecção em culturas de macrófagos, e induziu níveis mais baixos de FIN no DNA a tempo precoce de infecção, comparativamente com NHV. Estes resultados sugerem uma repressão mais forte do desencadeamento precoce de apoptose nas células hospedeiras pelo isolado altamente virulento. De facto, às 8h de infecção o VPSA necessita da integridade da célula hospedeira para completar o seu ciclo de vida, uma vez que nesta fase o DNA viral se encontra em activa replicação. Por outro lado, passadas 18h de infecção é esperado que pelo menos numa parte significativa das células infectadas em cultura, os vírus tenham completado a sua replicação e morfogénese, pelo que nesta fase, a apoptose na célula hospedeira não será limitativa para a produção de progenia viral. *In vivo* poderá mesmo contribuir para que o vírus iluda os mecanismos de defesa do

hospedeiro, em virtude de não serem desencadeados processos inflamatórios pela morte das células infectadas, prolongando a “invisibilidade” da infecção. Têm inclusivamente surgido várias evidências de que a fagocitose de células apoptóticas especificamente por macrófagos, provoca nestes uma inibição de respostas pró-inflamatórias, libertação de citocinas como TGF- β , IL-10 e outras moléculas anti-inflamatórias (Cocco & Ucker, 2001, Fadok *et al.*, 1998, Huynh *et al.*, 2002, Tassiulas *et al.*, 2007, Voll *et al.*, 1997) e inibição da resposta de activação na presença de INF- γ (Tassiulas *et al.*, 2007). Na infecção com *Trypanosoma cruzi*, que à semelhança do VPSA se desenvolve em macrófagos e induz intensa apoptose linfocitária, foi relatado que a fagocitose de linfócitos apoptóticos por macrófagos infectados aumentou várias ordens de grandeza o crescimento do parasita quer *in vitro* quer *in vivo* (Freire-de-Lima *et al.*, 2000). O aumento da multiplicação de *T. cruzi* nos macrófagos foi precedido de um aumento da produção por parte destes de percursores anti-inflamatórios como prostaglandinas e TGF- β , sendo para tal necessária a ligação a linfócitos apoptóticos através do receptor da vitronectina (VNR) à superfície dos macrófagos. Estes estudos sugerem um novo e interessante papel da apoptose na imunossupressão e evasão de agentes patogénicos ao sistema imunitário. As semelhanças entre a infecção por VPSA e a infecção por *T. cruzi*, relativamente ao tipo de célula infectada e ao efeito apoptogénico sobre linfócitos, permite equacionar se também na infecção *in vivo* por VPSA virulento se desenvolvem os mesmos mecanismos imunossupressores, devido à fagocitose de células apoptóticas por macrófagos. Igualmente, é plausível que a morte por apoptose dos próprios macrófagos hospedeiros da infecção e sua fagocitose por outros macrófagos da vizinhança iniba a resposta inflamatória destes últimos, tal como a fagocitose de linfócitos apoptóticos. É tentador especular que exista inclusive um mecanismo alternativo durante a infecção por VPSA que assegure que as células hospedeiras morram através de apoptose após a conclusão do ciclo viral. O facto de nos nossos estudos a inibição da actividade de caspases por zVAD-fmk durante infecção por L60 ou NHV não ter conduzido a uma clara diminuição da FIN característica de apoptose ou a um aumento da sobrevivência das células a tempos tardios de infecção, não é contrária a tal hipótese.

Os nossos estudos mostraram que a inoculação com ambos os isolados L60 ou NHV a uma MOI 3, não resulta em infecção da totalidade dos macrófagos em cultura. Procedeu-se então à determinação da incidência de apoptose em cada uma

das subpopulações, macrófagos infectados e não infectados, presentes numa mesma cultura, e assim verificar qual a sua contribuição relativa para a apoptose observada ao longo de ambas as infecções. A morfologia nuclear das células foi avaliada através do corante de DNA Hoechst, distinguindo-se as células infectadas e não infectadas através de prova de imunofluorescência com soros específicos anti-VPSA. Entre as subpopulações infectadas, observou-se uma percentagem significativa de células com núcleos picnóticos logo às 8h PI (de cerca de 35-36%), que no entanto não aumentou significativamente às 18h PI (passando em média a 43% em infecção com L60, 49% com NHV). A análise das subpopulações não infectadas das mesmas culturas, revelou uma percentagem expressiva de núcleos picnóticos e/ou fragmentados às 18h PI (em média 35,6% e 30,5% em inoculação com L60 e NHV respectivamente, 18% em culturas controlo não infectadas). Esta observação sugere que também os macrófagos não infectados na vizinhança de outros infectados poderão sofrer indução de apoptose, podendo ser susceptíveis a factores apoptogénicos libertados de células com replicação viral activa, à semelhança do que é observado em populações linfocitárias durante infecções *in vivo*. Nestas circunstâncias, a apoptose detectada nas infecções *in vitro* com L60 e NHV resulta de ambas as subpopulações em cultura, macrófagos infectados e não infectados. Apesar da proporção de células não infectadas em apoptose nas culturas inoculadas ser sempre baixa, particularmente tendo em consideração o nível basal de apoptose observada em culturas controlo não inoculadas, seria interessante estudar os mecanismos que lhe estão subjacentes. A libertação de citocinas pró-inflamatórias, nomeadamente TNF- α , IL-1 α e IL-1 β , por macrófagos infectados, foi apontada como a causa da apoptose em linfócitos *in vivo* (Salguero *et al.*, 2005). Verificámos nos nossos estudos *in vitro* que a citocina TNF- α não induziu apoptose em macrófagos de suíno, tal como referido mais adiante, pelo que é possível que outros factores apoptogénicos estejam implicados. Na inoculação por L60 verificou-se um aumento mais expressivo no número células não infectadas com morfologia nuclear apoptótica, das 8h para as 18h PI, passando em média de 22% para 36%, enquanto na inoculação com NHV o aumento foi de 24% para 31% em média. Neste modelo de infecção *in vitro*, a apoptose parece ser mais intensa entre macrófagos não infectados de culturas inoculadas com L60, comparativamente a NHV. A verificar-se *in vivo*, uma tal indução de apoptose em macrófagos na vizinhança de outros macrófagos com replicação viral activa constituiria uma estratégia

interessante de evasão viral, pela diminuição da capacidade de resposta inflamatória do hospedeiro. Por outro lado, esta observação indica que a detecção de diferenças entre L60 e NHV relativamente aos níveis de apoptose induzidos nos macrófagos a tempo tardio de infecção *in vitro* poderá ser dificultada. As metodologias quantitativas utilizadas para determinação de actividade de caspase-3, FIN de DNA e viabilidade celular, foram realizadas no conjunto total de macrófagos em cultura, infectados e não infectados. Se em inoculação por L60 a apoptose for mais fortemente induzida nas subpopulações não infectadas, mesmo que este isolado exerça um efeito protector mais efectivo nas suas células hospedeiras, este ficará diluído no conjunto total das células em cultura. Este facto poderá ter contribuído para a não detecção de diferenças evidentes na FIN de DNA e viabilidade celular entre ambas infecções ao tempo tardio de 18h.

Apesar do modelo de infecção *in vitro* utilizado ter sugerido um controlo de apoptose mais efectivo a tempo precoce de infecção pelo isolado L60, em comparação com o isolado NHV, às 18h PI não se detectou um maior título de progenia viral nas culturas infectadas por L60, embora isto possa vir a ocorrer a tempos mais tardios de infecção não estudados. Na infecção *in vivo* existirão factores a limitar a propagação do NHV, como a intervenção do sistema imunitário do animal. O NHV é não hemadsorvente devido a mutações em ambos os genes implicados neste fenómeno, *EP402R/8DR* e *EP153R/8CR* (Duarte, 2000), genes que adicionalmente poderão ter funções ao nível da imunossupressão e inibição de apoptose respectivamente (Dixon *et al.*, 2004, Hurtado *et al.*, 2004). Ainda, estudos realizados por Duarte (2000), revelaram uma deleção na região variável esquerda do genoma de NHV, que levou à perda de vários genes das FMG 360 e 530. Estes genes parecem ser determinantes para a virulência (Neilan *et al.*, 2002) e inibir a resposta a IFN tipo I (Afonso *et al.*, 2004), factores que *in vivo* poderão estar na base do controlo da propagação do NHV mas que *in vitro* obviamente não se produzem. Contudo, o que se observou em termos da modulação de apoptose exercida por L60 a tempo precoce da infecção *in vitro* poderá traduzir-se em vantagens adicionais para a propagação deste isolado no organismo.

De forma a estudar um possível papel protector de apoptose pelas infecções com L60 e NHV nas células hospedeiras, testaram-se indutores exógenos de apoptose em culturas primárias de macrófagos, nomeadamente CHX, inibidor da síntese

proteica, e STS, inibidora de proteínas cinases e indutora de apoptose na generalidade de sistemas celulares. Ambos se mostraram eficazes na indução rápida de níveis mensuráveis de apoptose (actividade de caspase-3, formação de oligonucleossomas resultantes de FIN do DNA e condensação/fragmentação da cromatina nuclear) após 3h de tratamento nas concentrações de 10 µg/ml CHX e 1 µM STS. A privação de soro ao longo de 8h e 18h de cultura induziu igualmente apoptose neste sistema celular. Testou-se ainda a citocina pró-inflamatória TNF-α de suíno, sugerida como podendo ser responsável pela apoptose induzida em linfócitos durante infecção *in vivo* por VPSA (Carrasco *et al.*, 1996a, Gomez-Villamandos *et al.*, 1995a, Oura *et al.*, 1998, Ramiro-Ibanez *et al.*, 1996). Ao contrário dos tratamentos com STS ou CHX, não se observou FIN no DNA obtido de macrófagos de suíno tratados com TNF-α, apesar de as concentrações utilizadas terem sido relativamente elevadas comparativamente às descritas para indução de apoptose por esta citocina noutros tipos celulares, inclusive em macrófagos humanos (Brodbeck *et al.*, 2002). Este resultado está no entanto de acordo com o conhecimento actual de que a ligação de TNF-α ao seu receptor TNF-R1 à superfície celular induz activação não só da via de sinalização apoptótica intracelular, mas também paralelamente da via de sobrevivência induzida pelos factores de transcrição da família Rel/NFκB (Bubici *et al.*, 2004, Papa *et al.*, 2006). A indução de apoptose sob acção de TNF-α, nomeadamente em macrófagos, parece ocorrer apenas se nas células estiver inibida a via NFκB (Liu *et al.*, 2004) ou alternativamente a transcrição ou tradução, impedindo a expressão de genes de sobrevivência induzidos por NFκB. O macrófago constitui uma das principais fontes da citocina TNF-α, sendo portanto provável que possua mecanismos de resistência à sua acção apoptótica. Estudos a propósito da diferenciação de macrófagos humanos induzida por ésteres de forbol ou aderência a plástico, mostraram que neste processo ocorre uma translocação de elevados níveis de NFκB para o núcleo, essencial para a sobrevivência celular, constituindo um marcador dos macrófagos diferenciados (Pennington *et al.*, 2001). Seria interessante verificar se semelhante translocação nuclear de NFκB ocorre nos macrófagos de suíno diferenciados por aderência a plástico que constituem o sistema celular utilizado, e também nos macrófagos de suínos *in vivo*, uma vez que o VPSA possui um gene homólogo de IκB, A238L/5-EL, implicado no controlo da actividade transcricional de NFκB durante a infecção (Powell *et al.*, 1996, Revilla *et al.*, 1998, Tait *et al.*, 2000).

Culturas de macrófagos infectadas por L60 ou NHV e posteriormente tratadas a vários tempos pós-infecção para indução de apoptose através de CHX, STS ou privação de soro, não revelaram *grosso modo* uma inibição evidente de apoptose ou aumento da viabilidade celular, comparativamente com culturas não infectadas tratadas do mesmo modo em paralelo. Apenas na infecção por L60 se observou pontualmente um decréscimo estatisticamente significativo da actividade de caspase-3 às 10h PI em tratamento com CHX, e um aumento da viabilidade celular às 8h PI em de tratamento com STS. No entanto, nunca se observou um decréscimo simultâneo de ambos os indicadores de apoptose quantificados, actividade de caspase-3 e FIN de DNA, e aumento da sobrevivência celular após os diferentes tratamentos. Apesar disso, estas observações em fases precoces da infecção estão de acordo com uma modulação mais efectiva da apoptose nesta fase por L60 em comparação com NHV, na sequência dos resultados descritos anteriormente.

Uma observação interessante resultou do tratamento com o inibidor da síntese proteica CHX em dois períodos diferentes de infecção precoce, das 4h às 7h e das 7h às 10h. No tratamento das 4-7h observou-se uma tendência para indução de níveis de FIN de DNA superiores aos observados no tratamento das 7-10h. Esta observação parece indicar que ao longo de 7h de infecção serão produzidas proteínas com algum papel protector de apoptose ou alternativamente estas acumular-se-ão na célula atingindo um limiar que oferece protecção efectiva ao fim de 7h mas não de 4h de infecção. Poderá ser este o caso nomeadamente da homóloga viral de *bcl-2*, *5-HL*, cuja presença em células infectadas pode ser detectada a partir das 3h PI (Afonso *et al.*, 1996, Neilan *et al.*, 1993).

Apesar de não se ter observado uma protecção clara de apoptose durante infecção por L60 ou NHV nas células hospedeiras quando esta foi induzida exogenamente, também não se observou uma exacerbação desta, quer a tempos precoces quer tardios de infecção, apesar de a infecção por si só induzir níveis de apoptose significativos a tempo tardio. Seria de esperar que a actuação de dois factores de stress em simultâneo sobre as células, a infecção e o tratamento indutor de apoptose, provocassem um aumento claro dos níveis de apoptose em comparação com o tratamento apenas, principalmente às 18h de infecção. De modo interessante tal não se verificou. De referir que os tratamentos indutores de apoptose realizados não induziram níveis de actividade de caspase-3 ou FIN de DNA que nos parecessem extremos, caso em que possivelmente seria difícil

observar o efeito cumulativo de um estímulo adicional. Os aumentos induzidos nos indicadores bioquímicos de apoptose foram no mínimo duas e máximo seis vezes os quantificados em células controlo não tratadas. Apenas no tratamento com CHX entre as 15-18h de infecção se observou um decréscimo estatisticamente significativo na viabilidade celular em ambas as infecções, que apesar de tudo não foi pronunciado. Estes resultados parecem confirmar que no período de 18h de infecção o VPSA não tem um efeito muito danoso para os macrófagos de suíno, apesar de a este tempo uma parte significativa das células em cultura estar infectada ($\approx 70\%$), suportando o desenvolvimento de mecanismos protectores de morte da célula hospedeira pelo VPSA. Esta protecção poderá no entanto não ser suficientemente forte para ser evidenciada durante a indução exógena de apoptose pelos indutores utilizados nos nossos estudos (CHX, STS ou PS). Alternativamente, os factores/proteínas virais de protecção poderão actuar a um nível da via apoptótica que não permita o seu bloqueio após desencadeamento por estes indutores. Este será o caso se por exemplo a sua acção inibitória ocorrer numa etapa da via apoptótica localizada a montante dos pontos de actuação da CHX, STS ou PS.

Com a finalidade de esclarecer os mecanismos subjacentes a uma eventual protecção de apoptose na célula hospedeira, exercida pelos isolados de VPSA em estudo, determinou-se a expressão dos genes virais putativamente inibidores de apoptose - *5-HL* homólogo de *bcl-2* e *4-CL* homólogo de *iap* - ao longo da infecção, com o intuito de correlacionar a sua expressão com a modulação de apoptose. Para tal, foram quantificados através de qPCR, os níveis de mRNA para cada gene viral a vários tempos ao longo da infecção em macrófagos (1,5h, 4h, 8h, 12h, 16h), utilizando-se como referência o mRNA do gene constitutivo *GAPDH*, presente nas mesmas células, que se verificou ser uma referência válida como controlo endógeno no nosso modelo de estudo. Detectou-se mRNA de ambos *5-HL* e *4-CL* muito precocemente, logo à 1,5h após ambas infecções, embora com níveis relativamente baixos que aumentaram nitidamente ao longo de 16h. À 1,5h, os níveis de mRNA de ambos os genes foram significativamente superiores em infecção por L60 comparativamente com NHV (3-5 vezes para *5-HL*, 2-6 vezes para *4-CL*). Posteriormente a este tempo deixou de haver diferenças significativas, apesar de às 16h PI se ter observado uma tendência para maior abundância de transcritos de ambos os genes em infecção por NHV. As regiões nucleotídicas dos genomas de

L60 e NHV contendo *5-HL* e *4-CL* foram sequenciadas, resultando idênticas entre si e à sequência conhecida do isolado Ba71V, pelo que as diferenças de expressão detectadas não resultarão de alterações ao nível das sequências dos genes nos dois isolados virais.

Enquanto a expressão de *5-HL* é conhecida como precoce durante infecção em macrófagos suíno, sendo a proteína viral detectada entre as 3-5h de infecção (Afonso *et al.*, 1996, Neilan *et al.*, 1993), a expressão de *4-CL* (*A224L*) foi descrita como tardia em modelo de infecção de células Vero com VPSA adaptado (Chacon *et al.*, 1995), não se observando produção da proteína antes da ocorrência de replicação do DNA viral. Chacón *et al.* (1995) referiram no entanto a detecção por Northern blot de transcritos de tamanho superior a 1400 bases, a tempo muito precoce e precoce da infecção (em RNA total obtido de culturas infectadas na presença do inibidor de síntese proteica CHX e do inibidor da replicação de DNA Ara C respectivamente), para os quais não detectaram inícios de transcrição por “primer extension”, atribuindo-os a ligação inespecífica da sonda. No nosso modelo de infecção em macrófagos de suíno, o *4-CL* é claramente transcrito muito precocemente após a entrada dos vírus nas células, e com níveis apreciáveis, uma vez que os seus níveis de mRNA ao longo da infecção foram da mesma ordem de grandeza ou superiores, aos do gene constitutivo de referência *GAPDH*, que é de expressão abundante em macrófagos de suíno (Foss *et al.*, 1998). Adicionalmente, a expressão de mRNA de *4-CL* foi sempre mais abundante que a de *5-HL* a qualquer tempo de infecção, especialmente à 1,5 PI, em que a diferença foi de muitas ordens de grandeza nos vários ensaios realizados (9-25 vezes superior em infecção por L60 e 12-34 vezes superior em infecção por NHV).

A produção de transcritos específicos à 1,5h de infecção foi confirmada através da sua detecção em Northern blot com uma sonda de RNA específica para a sequência de mRNA de *4-CL*. A este tempo, na infecção por NHV detectaram-se dois transcritos, de cerca de 1000 e 1500 bases, enquanto na infecção por L60 apenas se detectou um transcrito de 1000 bases. Mais tarde na infecção, aos tempos estudados de 8h e 16h, foi detectado um outro transcrito menor, com cerca de 700 bases, presente ao mesmo tempo que o transcrito de 1000 bases na infecção por L60, e os de 1000 e 1500 bases na infecção por NHV. O tamanho dos transcritos observados é consistente com o início da transcrição 21 a 24 pb a montante do codão de iniciação da tradução, como descrito por Chacón *et al.*

(1995), e término num de três motivos de 7-8 resíduos de timidilato consecutivos existentes a jusante do codão de terminação da tradução (Fig. 53), resultando na transcrição de sequências com aproximadamente 740, 1100 ou 1550 bases. Estes motivos são geralmente observados em regiões intergênicas do genoma do VPSA, coincidindo com o local de terminação da transcrição de genes virais precoces e tardios (Almazan *et al.*, 1992, Almazan *et al.*, 1993). No entanto, estudos da transcrição de alguns genes de VPSA mostraram que por vezes a transcrição ultrapassa estes locais, resultando em transcritos “readthrough” com sequências de genes consecutivos (Almazan *et al.*, 1992, Galindo *et al.*, 2000a, Galindo *et al.*, 2000b). 1400 pb a montante do codão de iniciação de *4-CL* existe uma ORF com a mesma orientação de transcrição mas em grelha de leitura diferente, correspondente a um gene homólogo de timidilato cinase, *A240L* (Fig. 53), que dá origem em células Vero infectadas a um transcrito muito precoce com cerca de 1000 bases (Yanez *et al.*, 1993). No entanto, se a transcrição muito precoce de *4-CL* estivesse incluída no mRNA de *A240L*, observar-se-ia um transcrito com um tamanho superior aos encontrados nos nossos estudos, com um mínimo de cerca de 2100 bases (com o início de transcrição de *A240L* e término no primeiro motivo de resíduos de timidilato a jusante do codão de terminação da tradução de *4-CL*).

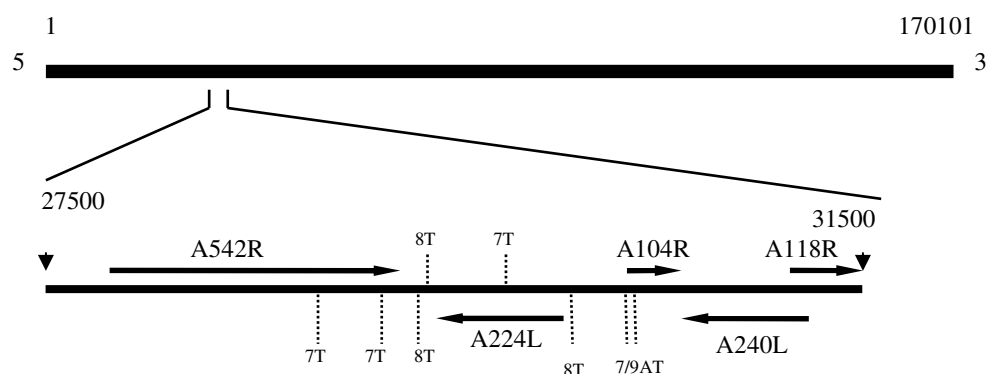


Figura 53. Organização relativa das “ORFs” que flanqueiam *A224L* (*4-CL*) ao longo do genoma de Ba71V.

Encontram-se representadas na sequência as posições aproximadas de motivos com ≥ 7 resíduos de timidilato, apontados como locais de terminação da transcrição de genes de VPSA.

Adicionalmente, não existem motivos de terminação constituídos por 7 ou mais resíduos de timidilato dentro da sequência codificante de *4-CL*, pelo que não parece provável que a transcrição de *A240L* termine dentro desta.

Presentemente são escassos os conhecimentos acerca do controlo transcricional de diferentes classes temporais de genes de VPSA. Cada gene parece ser alvo de regulação independente, tendo a sua transcrição geralmente início a uma curta distância do codão de início da tradução (Almazan *et al.*, 1992, Almazan *et al.*, 1993, Chacon *et al.*, 1995, Galindo *et al.*, 2000b, Martins *et al.*, 1994, Rodriguez *et al.*, 1996, Yanez *et al.*, 1993). Em genes de expressão tardia, a presença de uma sequência TATA a curta distância do início da transcrição parece assinalar a sequência promotora (Garcia-Escudero & Vinuela, 2000), estando igualmente presente uma destas sequências no local onde se inicia a transcrição de *A224L* (Chacon *et al.*, 1995). Porém, para genes virais precoces não são ainda conhecidas sequências de consenso de promotores. Foi sugerido que sequências ricas em A-T, geralmente presentes a curta distância dos locais de iniciação da transcrição de genes precoces de VPSA, poderão constituir sequências promotoras à semelhança do que acontece em poxvírus (Almazan *et al.*, 1992). Igualmente a montante de *4-CL* existem alguns locais com este tipo de sequências. O gene da DNA polimerase de VPSA por exemplo, é transcrito em ambas fases precoce e tardia de infecção, possuindo em cada caso um local diferente para o início da transcrição (Martins *et al.*, 1994), pelo que não é inverosímil que no caso do *4-CL* existam locais alternativos de início da transcrição que resultem nas diferentes espécies de transcritos observados. Serão necessários mais estudos para determinar se os diferentes transcritos observados para o gene *A224L/4-CL* resultarão de locais alternativos de iniciação ou de terminação da transcrição.

Apesar da transcrição muito precoce de *4-CL*, não se detectou a proteína viral nas células à 1,5h ou 4h de infecção em Western blot. Apenas às 8h PI foi claramente detectada, pelo que será produzida entre as 4h e as 8h de infecção, possivelmente após ter início a replicação viral, tal como descrito por Chacón *et al.* (1995). A detecção de proteína às 8h coincidiu ainda com a detecção do transcrito menor, de cerca de 700 bases em Northern blot, sendo possível que a tradução de proteína se inicie a partir deste transcrito em especial, e não dos outros produzidos a tempos mais precoces. Existe um gene próximo de *A224L*, localizado para a esquerda no genoma de Ba71V e com orientação de transcrição para a direita, o *A542R* (ver Fig. 53), pertencente à família multigénica 505/530 (Rodriguez *et al.*, 1994b, Yozawa *et al.*, 1994). Em modelo de infecção de células Vero este gene é transcrito muito precocemente na infecção, sendo detectado um transcrito de cerca

de 2,1 Kb apenas em células infectadas na presença de CHX, mas não na presença de Ara C ou a tempo tardio de infecção (Rodriguez *et al.*, 1994b). A sua expressão parece ser assim inibida a partir do momento em que são produzidas proteínas virais precoces na célula, denotando uma forte regulação transcricional. Curiosamente, de acordo com o tamanho observado deste transcrito ($\approx 2,1$ Kb) e o seu início de transcrição 6-7 pb a montante do codão de início da tradução como descrito pelos autores, a transcrição de *A542R* parece terminar numa sequência de 7Ts existente dentro da sequência do gene *A224L* (ver Fig. 53), desse modo perfazendo uma sequência com cerca de 2,1 kb. Contudo, os autores referiram como local de terminação possível uma outra sequência de 8Ts (correspondendo a 8As na cadeia codificante de *A224L*) localizada imediatamente a jusante da terminação de *A224L*, perfazendo um total de cerca de 1,7 kb. A transcrição muito precoce de *4-CL* e *A542R* em simultâneo poderá dar origem a mRNAs com extremidades 3' complementares, e portanto, a algum mecanismo de interferência que não permita a tradução em proteína a partir do mRNA precoce de *4-CL*, que desaparecerá após inibição da transcrição de *A542R*. A comprovar-se, este seria um novo e interessante mecanismo de regulação entre diferentes genes de VPSA.

Independentemente da transcrição, a proteína 4-CL está claramente presente em macrófagos em tempos precoces da infecção, antes das 8h, enquanto decorre a replicação viral e será importante inibir o desencadeamento de apoptose na célula hospedeira, persistindo ao longo da infecção uma vez que também é detectada claramente às 16h PI. A ambos os tempos, 8h e 16h, detectou-se mais proteína 4-CL em infecção com L60 do que com NHV (em média 2 vezes às 8h e 1,6 vezes às 16h). Confirmou-se em Western blot que a proteína 4-CL produzida no nosso modelo de infecção tem o mesmo tamanho que a do isolado Ba71V (*A224L*), cedida por outro grupo de investigação. A proteína 4-CL de L60 e NHV será portanto semelhante à proteína de Ba71V, que se verificou ter um efeito inibitório da apoptose induzida por staurosporina ou TNF- α e CHX em ensaios de transfecção em células Vero, ou pela própria infecção viral, em ensaios de comparação entre infecção com vírus parental e delectado em *A224L* (Nogal *et al.*, 2001). A *A224L* parece actuar ao nível da inibição da actividade de caspase-3, tal como outras IAPs (Nogal *et al.*, 2001), e ainda activar a via de NF κ B (Rodriguez *et al.*, 2002). Esta capacidade adicional de 4-CL para induzir activação do factor de transcrição NF κ B poderá constituir mais uma ferramenta para a inibição de apoptose na célula

hospedeira, uma vez que entre outras acções, NFκB induz a transcrição de vários genes anti-apoptóticos, nomeadamente das famílias *bcl-2* e *iap* (Kucharczak *et al.*, 2003). A maior expressão da proteína 4-CL homóloga de IAPs em infecção por L60 comparativamente a NHV, poderá conferir igualmente a este nível uma vantagem ao isolado de alta virulência na modulação de apoptose. Adicionalmente, em NHV encontra-se mutado o gene *8CR/EP153R* (Duarte, 2000), homólogo de lectinas animais tipo C, implicado também em inibição de apoptose em modelo de infecção de células Vero (Galindo *et al.*, 2000a, Hurtado *et al.*, 2004). A proteína EP153R é expressa precocemente, a partir das 6h PI em células Vero, pelo que a não funcionalidade deste gene em NHV poderá contribuir para os níveis superiores de FIN de DNA, quantificados a tempo precoce de infecção com este isolado em macrófagos de suíno, comparativamente a L60.

Durante a infecção por L60 detectou-se sempre maior quantidade de proteína 4-CL que na infecção por NHV, mesmo naqueles ensaios em que os níveis de mRNA, quantificados nas mesmas células em que se detectou a proteína, foram claramente inferiores. Este resultado é indicativo de uma regulação pós-transcricional da expressão de 4-CL, que até à data constituirá a primeira observação deste tipo relativamente a genes de VPSA. Uma análise de expressão simplesmente ao nível da transcrição é comprovadamente insuficiente para fazer inferências acerca do efeito protector de apoptose deste gene na célula hospedeira, e o mesmo poderá acontecer para outros genes virais com outras funções.

Não nos foi possível dispor de anticorpos específicos para a proteína 5-HL, pelo que não confirmámos se os níveis superiores de transcrição deste gene a tempo muito precoce da infecção por L60 (1,5h), comparativamente a infecção por NHV, se traduzem igualmente em maior produção de proteína nas células a tempo precoce. No entanto, a 5-HL é detectada a partir das 3h de infecção em macrófagos (Afonso *et al.*, 1996, Neilan *et al.*, 1993), e como tal é traduzida muito precocemente, pelo que não parece provável uma regulação pós-transcricional do seu mRNA nesta fase da infecção. É portanto verosímil que a tempo muito precoce 5-HL seja mais expressa nas células infectadas pelo isolado de alta virulência L60 do que pelo de baixa virulência NHV. Outro gene viral expresso muito precocemente é o *A238L/5-EL* inibidor de NFκB (Powell *et al.*, 1996, Revilla *et al.*, 1998), encontrando-se a proteína nas células desde fase precoce até tardia da infecção em células Vero (Revilla *et al.*, 1998). A sequência deste gene é idêntica nos dois isolados L60 e

NHV, tendo sido relatada às 6h de infecção em macrófagos uma maior expressão ao nível de mRNA em NHV comparativamente com L60 (em média 1,22 vezes superior) (Gil *et al.*, 2003). Através deste gene, o VPSA inibirá a expressão de citocinas pró-inflamatórias na dependência de NFκB nas células hospedeiras, e desse modo, o desencadeamento de respostas imunitárias à infecção. Em contrapartida, a via de sobrevivência induzida em paralelo por NFκB ficará comprometida. A expressão de proteínas virais inibidoras de apoptose ao longo da infecção, 5-HL a tempo muito precoce, acompanhada de 4-CL a tempo ligeiramente mais tardio, poderá contrabalançar o potencial efeito pró-apoptótico da inibição de NFκB.

A caracterização de mecanismos de morte celular em macrófagos infectados por isolados de diferente virulência, poderá ajudar a compreender a patogenia da PSA. O grau de virulência dos diferentes isolados de VPSA está certamente relacionado com a sua capacidade em manipular as funções da célula hospedeira, nomeadamente ao nível de mecanismos de morte celular. Os nossos estudos sugerem uma maior repressão da via de apoptose a tempo precoce de infecção *in vitro* pelo isolado de alta virulência L60, o que poderá ser necessário para prevenir a morte da célula hospedeira antes de o seu ciclo viral estar concluído. Por outro lado, na infecção pelo isolado de baixa virulência NHV poderá não haver necessidade de reprimir a via de apoptose tão fortemente como L60 para conseguir replicar-se eficazmente neste sistema. A suportar esta hipótese está a observação de que ambos os isolados produzem títulos de progenia viral semelhantes após 18h de infecção *in vitro*. A diferente modulação de apoptose por estes dois isolados de VPSA poderá ter como objectivo maximizar a multiplicação de vírus na célula hospedeira, ao mesmo tempo que a morte desta por apoptose não é inibida, ou é mesmo incentivada a tempo tardio, o que pode, como descrito acima, inibir a resposta inflamatória *in vivo*, com vantagem para a progressão da infecção viral.

Os nossos estudos poderão contribuir para o melhor esclarecimento dos mecanismos de virulência de VPSA.

6. BIBLIOGRAFIA

- Adrain, C., Murphy, B. M. & Martin, S. J. (2005). Molecular ordering of the caspase activation cascade initiated by the cytotoxic T lymphocyte/natural killer (CTL/NK) protease granzyme B. *J Biol Chem* **280**, 4663-73.
- Afonso, C. L., Alcaraz, C., Brun, A., Sussman, M. D., Onisk, D. V., Escribano, J. M. & Rock, D. L. (1992). Characterization of p30, a highly antigenic membrane and secreted protein of African swine fever virus. *Virology* **189**, 368-73.
- Afonso, C. L., Neilan, J. G., Kutish, G. F. & Rock, D. L. (1996). An African swine fever virus Bcl-2 homolog, 5-HL, suppresses apoptotic cell death. *J Virol* **70**, 4858-63.
- Afonso, C. L., Piccone, M. E., Zaffuto, K. M., Neilan, J., Kutish, G. F., Lu, Z., Balinsky, C. A., Gibb, T. R., Bean, T. J., Zsak, L. & Rock, D. L. (2004). African swine fever virus multigene family 360 and 530 genes affect host interferon response. *J Virol* **78**, 1858-64.
- Afonso, C. L., Tulman, E. R., Lu, Z., Zsak, L., Kutish, G. F. & Rock, D. L. (2000). The genome of fowlpox virus. *J Virol* **74**, 3815-31.
- Aggarwal, B. B. (2003). Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol* **3**, 745-56.
- Aguero, M., Blasco, R., Wilkinson, P. & Vinuela, E. (1990). Analysis of naturally occurring deletion variants of African swine fever virus: multigene family 110 is not essential for infectivity or virulence in pigs. *Virology* **176**, 195-204.
- Alcami, A., Carrascosa, A. L. & Vinuela, E. (1989). The entry of African swine fever virus into Vero cells. *Virology* **171**, 68-75.
- Alcami, A., Carrascosa, A. L. & Vinuela, E. (1990). Interaction of African swine fever virus with macrophages. *Virus Res* **17**, 93-104.
- Alcami, A. & Vinuela, E. (1991). Fc receptors do not mediate African swine fever virus replication in macrophages. *Virology* **181**, 756-9.
- Alcaraz, C., Rodriguez, F., Oviedo, J. M., Eiras, A., De Diego, M., Alonso, C. & Escribano, J. M. (1995). Highly specific confirmatory western blot test for African swine fever virus antibody detection using the recombinant virus protein p54. *J Virol Methods* **52**, 111-9.
- Almazan, F., Rodriguez, J. M., Andres, G., Perez, R., Vinuela, E. & Rodriguez, J. F. (1992). Transcriptional analysis of multigene family 110 of African swine fever virus. *J Virol* **66**, 6655-67.
- Almazan, F., Rodriguez, J. M., Angulo, A., Vinuela, E. & Rodriguez, J. F. (1993). Transcriptional mapping of a late gene coding for the p12 attachment protein of African swine fever virus. *J Virol* **67**, 553-6.

- Almendral, J. M., Almazan, F., Blasco, R. & Vinuela, E. (1990). Multigene families in African swine fever virus: family 110. *J Virol* **64**, 2064-72.
- Alonso, C., Miskin, J., Hernaez, B., Fernandez-Zapatero, P., Soto, L., Canto, C., Rodriguez-Crespo, I., Dixon, L. & Escribano, J. M. (2001). African swine fever virus protein p54 interacts with the microtubular motor complex through direct binding to light-chain dynein. *J Virol* **75**, 9819-27.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**, 403-10.
- Andersen, C. L., Jensen, J. L. & Orntoft, T. F. (2004). Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* **64**, 5245-50.
- Andres, G., Garcia-Escudero, R., Simon-Mateo, C. & Vinuela, E. (1998). African swine fever virus is enveloped by a two-membraned collapsed cisterna derived from the endoplasmic reticulum. *J Virol* **72**, 8988-9001.
- Andres, G., Simon-Mateo, C. & Vinuela, E. (1997). Assembly of African swine fever virus: role of polyprotein pp220. *J Virol* **71**, 2331-41.
- Angulo, A., Vinuela, E. & Alcamí, A. (1993). Inhibition of African swine fever virus binding and infectivity by purified recombinant virus attachment protein p12. *J Virol* **67**, 5463-71.
- Annis, M. G., Yethon, J. A., Leber, B. & Andrews, D. W. (2004). There is more to life and death than mitochondria: Bcl-2 proteins at the endoplasmic reticulum. *Biochim Biophys Acta* **1644**, 115-23.
- Aubert, M. & Jerome, K. R. (2003). Apoptosis prevention as a mechanism of immune evasion. *Int Rev Immunol* **22**, 361-71.
- Aubert, M., O'Toole, J. & Blaho, J. A. (1999). Induction and prevention of apoptosis in human HEp-2 cells by herpes simplex virus type 1. *J Virol* **73**, 10359-70.
- Barkett, M. & Gilmore, T. D. (1999). Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* **18**, 6910-24.
- Basto, A. P., Nix, R. J., Boinas, F., Mendes, S., Silva, M. J., Cartaxeiro, C., Portugal, R. S., Leitao, A., Dixon, L. K. & Martins, C. (2006). Kinetics of African swine fever virus infection in *Ornithodoros erraticus* ticks. *J Gen Virol* **87**, 1863-71.
- Bastos, A. D., Penrith, M. L., Cruciere, C., Edrich, J. L., Hutchings, G., Roger, F., Couacy-Hymann, E. & G, R. T. (2003). Genotyping field strains of African swine fever virus by partial p72 gene characterisation. *Arch Virol* **148**, 693-706.
- Belmokhtar, C. A., Hillion, J., Dudognon, C., Fiorentino, S., Flexor, M., Lanotte, M. & Segal-Bendirdjian, E. (2003). Apoptosome-independent pathway for

- apoptosis. Biochemical analysis of APAF-1 defects and biological outcomes. *J Biol Chem* **278**, 29571-80.
- Benedict, C. A., Norris, P. S. & Ware, C. F. (2002). To kill or be killed: viral evasion of apoptosis. *Nat Immunol* **3**, 1013-8.
- Bertrand, R., Solary, E., O'Connor, P., Kohn, K. W. & Pommier, Y. (1994). Induction of a common pathway of apoptosis by staurosporine. *Exp Cell Res* **211**, 314-21.
- Bierer, B. E. & Burakoff, S. J. (1989). T-lymphocyte activation: the biology and function of CD2 and CD4. *Immunol Rev* **111**, 267-94.
- Biront, P., Castryck, F. & Leunen, J. (1987). An epizootic of African swine fever in Belgium and its eradication. *Vet Rec* **120**, 432-4.
- Blank, M. & Shiloh, Y. (2007). Programs for cell death: apoptosis is only one way to go. *Cell Cycle* **6**, 686-95.
- Blasco, R., Agüero, M., Almendral, J. M. & Vinuela, E. (1989a). Variable and constant regions in African swine fever virus DNA. *Virology* **168**, 330-8.
- Blasco, R., de la Vega, I., Almazan, F., Agüero, M. & Vinuela, E. (1989b). Genetic variation of African swine fever virus: variable regions near the ends of the viral DNA. *Virology* **173**, 251-7.
- Borca, M. V., Carrillo, C., Zsak, L., Laegreid, W. W., Kutish, G. F., Neilan, J. G., Burrage, T. G. & Rock, D. L. (1998). Deletion of a CD2-like gene, 8-DR, from African swine fever virus affects viral infection in domestic swine. *J Virol* **72**, 2881-9.
- Borca, M. V., Kutish, G. F., Afonso, C. L., Irusta, P., Carrillo, C., Brun, A., Sussman, M. & Rock, D. L. (1994). An African swine fever virus gene with similarity to the T-lymphocyte surface antigen CD2 mediates hemadsorption. *Virology* **199**, 463-8.
- Bossy-Wetzel, E., Newmeyer, D. D. & Green, D. R. (1998). Mitochondrial cytochrome c release in apoptosis occurs upstream of DEVD-specific caspase activation and independently of mitochondrial transmembrane depolarization. *Embo J* **17**, 37-49.
- Breese, S. S., Jr. & De Boer, C. J. (1966). Electron microscope observations of African swine fever virus in tissue culture cells. *Virology* **28**, 420-428.
- Brodbeck, W. G., Shive, M. S., Colton, E., Ziats, N. P. & Anderson, J. M. (2002). Interleukin-4 inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced and spontaneous apoptosis of biomaterial-adherent macrophages. *J Lab Clin Med* **139**, 90-100.
- Brookes, S. M., Dixon, L. K. & Parkhouse, R. M. (1996). Assembly of African Swine fever virus: quantitative ultrastructural analysis in vitro and in vivo. *Virology* **224**, 84-92.

- Brugarolas, J., Chandrasekaran, C., Gordon, J. I., Beach, D., Jacks, T. & Hannon, G. J. (1995). Radiation-induced cell cycle arrest compromised by p21 deficiency. *Nature* **377**, 552-7.
- Brun, A., Rivas, C., Esteban, M., Escribano, J. M. & Alonso, C. (1996). African swine fever virus gene A179L, a viral homologue of bcl-2, protects cells from programmed cell death. *Virology* **225**, 227-30.
- Brun, A., Rodriguez, F., Escribano, J. M. & Alonso, C. (1998). Functionality and cell anchorage dependence of the African swine fever virus gene A179L, a viral bcl-2 homolog, in insect cells. *J Virol* **72**, 10227-33.
- Bubici, C., Papa, S., Pham, C. G., Zazzeroni, F. & Franzoso, G. (2004). NF-kappaB and JNK: an intricate affair. *Cell Cycle* **3**, 1524-9.
- Burrage, T. G., Lu, Z., Neilan, J. G., Rock, D. L. & Zsak, L. (2004). African swine fever virus multigene family 360 genes affect virus replication and generalization of infection in Ornithodoros porcinus ticks. *J Virol* **78**, 2445-53.
- Cambi, A., Koopman, M. & Figdor, C. G. (2005). How C-type lectins detect pathogens. *Cell Microbiol* **7**, 481-8.
- Cameron, C., Hota-Mitchell, S., Chen, L., Barrett, J., Cao, J. X., Macaulay, C., Willer, D., Evans, D. & McFadden, G. (1999). The complete DNA sequence of myxoma virus. *Virology* **264**, 298-318.
- Carrasco, L., de Lara, F. C., Martin de las Mulas, J., Gomez-Villamandos, J. C., Perez, J., Wilkinson, P. J. & Sierra, M. A. (1996a). Apoptosis in lymph nodes in acute African swine fever. *J Comp Pathol* **115**, 415-28.
- Carrasco, L., Gomez-Villamandos, J. C., Bautista, M. J., Martin de las Mulas, J., Villeda, C. J., Wilkinson, P. J. & Sierra, M. A. (1996b). In vivo replication of African swine fever virus (Malawi '83) in neutrophils. *Vet Res* **27**, 55-62.
- Carrascosa, A. L., Bustos, M. J., Nogal, M. L., Gonzalez de Buitrago, G. & Revilla, Y. (2002). Apoptosis induced in an early step of African swine fever virus entry into vero cells does not require virus replication. *Virology* **294**, 372-82.
- Carrascosa, A. L., del Val, M., Santaren, J. F. & Vinuela, E. (1985). Purification and properties of African swine fever virus. *J Virol* **54**, 337-44.
- Carrascosa, A. L., Sastre, I. & Vinuela, E. (1991). African swine fever virus attachment protein. *J Virol* **65**, 2283-9.
- Carrascosa, A. L., Sastre, I. & Vinuela, E. (1995). Production and purification of recombinant African swine fever virus attachment protein p12. *J Biotechnol* **40**, 73-86.
- Carrascosa, J. L., Carazo, J. M., Carrascosa, A. L., Garcia, N., Santisteban, A. & Vinuela, E. (1984). General morphology and capsid fine structure of African swine fever virus particles. *Virology* **132**, 160-72.

- Carvalho, Z. G. & Rodrigues-Pousada, C. (1986). African swine fever virus gene expression in infected Vero cells. *J Gen Virol* **67** (Pt 7), 1343-50.
- Chacon, M. R., Almazan, F., Nogal, M. L., Vinuela, E. & Rodriguez, J. F. (1995). The African swine fever virus IAP homolog is a late structural polypeptide. *Virology* **214**, 670-4.
- Chang, L. & Karin, M. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* **410**, 37-40.
- Chao, W., Shen, Y., Li, L. & Rosenzweig, A. (2002). Importance of FADD signaling in serum deprivation- and hypoxia-induced cardiomyocyte apoptosis. *J Biol Chem* **277**, 31639-45.
- Chipuk, J. E. & Green, D. R. (2006). Dissecting p53-dependent apoptosis. *Cell Death Differ* **13**, 994-1002.
- Chu, Z. L., McKinsey, T. A., Liu, L., Gentry, J. J., Malim, M. H. & Ballard, D. W. (1997). Suppression of tumor necrosis factor-induced cell death by inhibitor of apoptosis c-IAP2 is under NF-kappaB control. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 10057-62.
- Cocco, R. E. & Ucker, D. S. (2001). Distinct modes of macrophage recognition for apoptotic and necrotic cells are not specified exclusively by phosphatidylserine exposure. *Mol Biol Cell* **12**, 919-30.
- Colasanti, M., Gradoni, L., Mattu, M., Persichini, T., Salvati, L., Venturini, G. & Ascenzi, P. (2002). Molecular bases for the anti-parasitic effect of NO (Review). *Int J Mol Med* **9**, 131-4.
- Colgrove, G. S. (1968). Immunofluorescence and inclusion bodies in circulating leukocytes of pigs infected with African swine fever virus. *Bull Epizoot Dis Afr* **16**, 341-3.
- Colgrove, G. S., Haelterman, E. O. & Coggins, L. (1969). Pathogenesis of African swine fever in young pigs. *Am J Vet Res* **30**, 1343-59.
- Corpet, F. (1988). Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucleic Acids Res* **16**, 10881-10890.
- Cory, S. & Adams, J. M. (2002). The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer* **2**, 647-56.
- Cory, S., Huang, D. C. & Adams, J. M. (2003). The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* **22**, 8590-607.
- Costa, J. V. (1990). African swine fever virus. In *Molecular biology of iridoviruses*, pp. 247-270. Edited by G. Darai. Norwell, Mass.: Kluwer Academic Publishers.
- Crook, N. E., Clem, R. J. & Miller, L. K. (1993). An apoptosis-inhibiting baculovirus gene with a zinc finger-like motif. *J Virol* **67**, 2168-74.

- Date, T., Taniguchi, I., Inada, K., Matsuo, S., Miyanaga, S., Yamane, T., Abe, Y., Sugimoto, K. & Mochizuki, S. (2005). Nicorandil inhibits serum starvation-induced apoptosis in vascular endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol* **46**, 721-6.
- de la Vega, I., Gonzalez, A., Blasco, R., Calvo, V. & Vinuela, E. (1994). Nucleotide sequence and variability of the inverted terminal repetitions of African swine fever virus DNA. *Virology* **201**, 152-6.
- de la Vega, I., Vinuela, E. & Blasco, R. (1990). Genetic variation and multigene families in African swine fever virus. *Virology* **179**, 234-46.
- de Matos, A. P. & Carvalho, Z. G. (1993). African swine fever virus interaction with microtubules. *Biol Cell* **78**, 229-34.
- Deng, Y., Ren, X., Yang, L., Lin, Y. & Wu, X. (2003). A JNK-dependent pathway is required for TNF α -induced apoptosis. *Cell* **115**, 61-70.
- Dheda, K., Huggett, J. F., Chang, J. S., Kim, L. U., Bustin, S. A., Johnson, M. A., Rook, G. A. & Zumla, A. (2005). The implications of using an inappropriate reference gene for real-time reverse transcription PCR data normalization. *Anal Biochem* **344**, 141-3.
- Dixon, L. K., Abrams, C. C., Bowick, G., Goatley, L. C., Kay-Jackson, P. C., Chapman, D., Liverani, E., Nix, R., Silk, R. & Zhang, F. (2004). African swine fever virus proteins involved in evading host defence systems. *Vet Immunol Immunopathol* **100**, 117-34.
- Dixon, L. K., Baylis, S. A., Vydelingum, S., Twigg, S. R., Hammond, J. M., Hingamp, P. M., Bristow, C., Wilkinson, P. J. & Smith, G. L. (1993). African swine fever virus genome content and variability. *Arch Virol Suppl* **7**, 185-99.
- Dixon, L. K., Costa, J. V., Escribano, J. M., Kock, D. L., Viñuela, E. & Wilkinson, P. J. (2000). Family *Asfarviridae*. In *Virus taxonomy: Classification and nomenclature of virus. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, pp. 159-165. Edited by M. H. V. van Regenmortel, C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, E. B. Casstens, M. K. Estes, S. M. Lemon, D. J. McGeach, J. Maniloff, M. A. Mayo, C. R. Pringle & R. B. Wickner. San Diego: Academic Press.
- Dixon, L. K. & Wilkinson, P. J. (1988). Genetic diversity of African swine fever virus isolates from soft ticks (*Ornithodoros moubata*) inhabiting warthog burrows in Zambia. *J Gen Virol* **69** (Pt 12), 2981-93.
- Dozois, C. M., Oswald, E., Gautier, N., Serthelon, J. P., Fairbrother, J. M. & Oswald, I. P. (1997). A reverse transcription-polymerase chain reaction method to analyze porcine cytokine gene expression. *Vet Immunol Immunopathol* **58**, 287-300.
- Driscoll, P. C., Cyster, J. G., Campbell, I. D. & Williams, A. F. (1991). Structure of domain 1 of rat T lymphocyte CD2 antigen. *Nature* **353**, 762-5.

- Duarte, M. (2000). Bases moleculares da virulência e hemadsorção nos isolados nacionais Lisboa 60 e Lisboa 68 do vírus da peste suína Africana. Oeiras: Instituto de Tecnologia Química e Biológica. Universidade Nova de Lisboa, Tese de Doutoramento.
- Ekert, P. G., Silke, J. & Vaux, D. L. (1999). Caspase inhibitors. *Cell Death Differ* **6**, 1081-6.
- Enjuanes, L., Carrascosa, A. L. & Vinuela, E. (1976). Isolation and properties of the DNA of African swine fever (ASF) virus. *J Gen Virol* **32**, 479-92.
- Esparza, I., Gonzalez, J. C. & Vinuela, E. (1988). Effect of interferon-alpha, interferon-gamma and tumour necrosis factor on African swine fever virus replication in porcine monocytes and macrophages. *J Gen Virol* **69** (Pt 12), 2973-80.
- Esteves, A., Marques, M. I. & Costa, J. V. (1986). Two-dimensional analysis of African swine fever virus proteins and proteins induced in infected cells. *Virology* **152**, 192-206.
- Estoppey, S., Rodriguez, I., Sadoul, R. & Martinou, J. C. (1997). Bcl-2 prevents activation of CPP32 cysteine protease and cleavage of poly (ADP-ribose) polymerase and U1-70 kD proteins in staurosporine-mediated apoptosis. *Cell Death Differ* **4**, 34-8.
- Fadok, V. A., Bratton, D. L., Konowal, A., Freed, P. W., Westcott, J. Y. & Henson, P. M. (1998). Macrophages that have ingested apoptotic cells in vitro inhibit proinflammatory cytokine production through autocrine/paracrine mechanisms involving TGF-beta, PGE2, and PAF. *J Clin Invest* **101**, 890-8.
- Fan, T. J., Han, L. H., Cong, R. S. & Liang, J. (2005). Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **37**, 719-27.
- FAO (2000). Recognizing African swine fever. A field manual. Edited by M. Rweyemamu. Rome: FAO.
- FAO (2001). Manual on the preparation of African swine fever contingency plan. Edited by W. A. Geering, M. L. Penrith & D. Nyakahuma. Rome: FAO.
- FAO (2007). African Swine Fever spreads from Georgia to Armenia. Em: <http://www.fao.org/newsroom/en/news/2007/1000671/index.html>. (Acedido em 15 de Outubro de 2007).
- Feng, G. & Kaplowitz, N. (2002). Mechanism of staurosporine-induced apoptosis in murine hepatocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **282**, G825-34.
- Forman, A. J., Wardley, R. C. & Wilkinson, P. J. (1982). The immunological response of pigs and guinea pigs to antigens of African swine fever virus. *Arch Virol* **74**, 91-100.
- Foss, D. L., Baarsch, M. J. & Murtaugh, M. P. (1998). Regulation of hypoxanthine phosphoribosyltransferase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and

- beta-actin mRNA expression in porcine immune cells and tissues. *Anim Biotechnol* **9**, 67-78.
- Freire-de-Lima, C. G., Nascimento, D. O., Soares, M. B., Bozza, P. T., Castro-Faria-Neto, H. C., de Mello, F. G., DosReis, G. A. & Lopes, M. F. (2000). Uptake of apoptotic cells drives the growth of a pathogenic trypanosome in macrophages. *Nature* **403**, 199-203.
- Fucini, R. V., Chen, J. L., Sharma, C., Kessels, M. M. & Stamnes, M. (2002). Golgi vesicle proteins are linked to the assembly of an actin complex defined by mAbp1. *Mol Biol Cell* **13**, 621-31.
- Galindo, I., Almazan, F., Bustos, M. J., Vinuela, E. & Carrascosa, A. L. (2000a). African swine fever virus EP153R open reading frame encodes a glycoprotein involved in the hemadsorption of infected cells. *Virology* **266**, 340-51.
- Galindo, I., Vinuela, E. & Carrascosa, A. L. (1997). Protein cell receptors mediate the saturable interaction of African swine fever virus attachment protein p12 with the surface of permissive cells. *Virus Res* **49**, 193-204.
- Galindo, I., Vinuela, E. & Carrascosa, A. L. (2000b). Characterization of the african swine fever virus protein p49: a new late structural polypeptide. *J Gen Virol* **81**, 59-65.
- Garcia-Escudero, R. & Vinuela, E. (2000). Structure of African swine fever virus late promoters: requirement of a TATA sequence at the initiation region. *J Virol* **74**, 8176-82.
- Gause, W. C. & Adamovicz, J. (1994). The use of the PCR to quantitate gene expression. *PCR Methods Appl* **3**, S123-35.
- Geenen, K., Favoreel, H. W., Olsen, L., Enquist, L. W. & Nauwynck, H. J. (2005). The pseudorabies virus US3 protein kinase possesses anti-apoptotic activity that protects cells from apoptosis during infection and after treatment with sorbitol or staurosporine. *Virology* **331**, 144-50.
- Genovesi, E. V., Knudsen, R. C., Whyard, T. C. & Mebus, C. A. (1988). Moderately virulent African swine fever virus infection: blood cell changes and infective virus distribution among blood components. *Am J Vet Res* **49**, 338-44.
- Gewies, A. (2003). ApoReview: Introduction to apoptosis. Em: <http://www.celldeath.de/mainfram.html>. (Acedido em 13 de Outubro de 2007).
- Ghosh, S., May, M. J. & Kopp, E. B. (1998). NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* **16**, 225-60.
- Gil, S., Spagnuolo-Weaver, M., Canals, A., Sepulveda, N., Oliveira, J., Aleixo, A., Allan, G., Leitao, A. & Martins, C. L. (2003). Expression at mRNA level of cytokines and A238L gene in porcine blood-derived macrophages infected in vitro with African swine fever virus (ASFV) isolates of different virulence. *Arch Virol* **148**, 2077-97.

- Gilmore, A. P. (2005). Anoikis. *Cell Death Differ* **12 Suppl 2**, 1473-7.
- Gomez-Puertas, P., Rodriguez, F., Oviedo, J. M., Brun, A., Alonso, C. & Escribano, J. M. (1998). The African swine fever virus proteins p54 and p30 are involved in two distinct steps of virus attachment and both contribute to the antibody-mediated protective immune response. *Virology* **243**, 461-71.
- Gomez-Puertas, P., Rodriguez, F., Oviedo, J. M., Ramiro-Ibanez, F., Ruiz-Gonzalvo, F., Alonso, C. & Escribano, J. M. (1996). Neutralizing antibodies to different proteins of African swine fever virus inhibit both virus attachment and internalization. *J Virol* **70**, 5689-94.
- Gomez-Villamandos, J. C., Hervas, J., Mendez, A., Carrasco, L., Martin de las Mulas, J., Villeda, C. J., Wilkinson, P. J. & Sierra, M. A. (1995a). Experimental African swine fever: apoptosis of lymphocytes and virus replication in other cells. *J Gen Virol* **76** (Pt 9), 2399-405.
- Gomez-Villamandos, J. C., Hervas, J., Mendez, A., Carrasco, L., Villeda, C. J., Sierra, M. A. & Wilkonson, P. J. (1995b). A pathological study of the perisinusoidal unit of the liver in acute African swine fever. *Res Vet Sci* **59**, 146-51.
- Gomez-Villamandos, J. C., Hervas, J., Mendez, A., Carrasco, L., Villeda, C. J., Wilkinson, P. J. & Sierra, M. A. (1995c). Pathological changes in the renal interstitial capillaries of pigs inoculated with two different strains of African swine fever virus. *J Comp Pathol* **112**, 283-98.
- Gomez-Villamandos, J. C., Hervas, J., Mendez, A., Carrasco, L., Villeda, C. J., Wilkinson, P. J. & Sierra, M. A. (1995d). Ultrastructural study of the renal tubular system in acute experimental African swine fever: virus replication in glomerular mesangial cells and in the collecting ducts. *Arch Virol* **140**, 581-9.
- Gomez del Moral, M., Ortuno, E., Fernandez-Zapatero, P., Alonso, F., Alonso, C., Ezquerro, A. & Dominguez, J. (1999). African swine fever virus infection induces tumor necrosis factor alpha production: implications in pathogenesis. *J Virol* **73**, 2173-80.
- Gonzague, M., Roger, F., Bastos, A., Burger, C., Randriamparany, T., Smondack, S. & Cruciére, C. (2001). Isolation of a non-haemadsorbing, non-cytopathic strain of African swine fever virus in Madagascar. *Epidemiol Infect* **126**, 453-9.
- Gonzalez-Juarrero, M., Lunney, J. K., Sanchez-Vizcaino, J. M. & Mebus, C. (1992). Modulation of splenic macrophages, and swine leukocyte antigen (SLA) and viral antigen expression following African swine fever virus (ASFV) inoculation. *Arch Virol* **123**, 145-56.
- Gonzalez, A., Calvo, V., Almazan, F., Almendral, J. M., Ramirez, J. C., de la Vega, I., Blasco, R. & Vinuela, E. (1990). Multigene families in African swine fever virus: family 360. *J Virol* **64**, 2073-81.
- Granja, A. G., Nogal, M. L., Hurtado, C., Del Aguila, C., Carrascosa, A. L., Salas, M. L., Fresno, M. & Revilla, Y. (2006a). The viral protein A238L inhibits TNF-

- alpha expression through a CBP/p300 transcriptional coactivators pathway. *J Immunol* **176**, 451-62.
- Granja, A. G., Nogal, M. L., Hurtado, C., Salas, J., Salas, M. L., Carrascosa, A. L. & Revilla, Y. (2004a). Modulation of p53 cellular function and cell death by African swine fever virus. *J Virol* **78**, 7165-74.
- Granja, A. G., Nogal, M. L., Hurtado, C., Vila, V., Carrascosa, A. L., Salas, M. L., Fresno, M. & Revilla, Y. (2004b). The viral protein A238L inhibits cyclooxygenase-2 expression through a nuclear factor of activated T cell-dependent transactivation pathway. *J Biol Chem* **279**, 53736-46.
- Granja, A. G., Sabina, P., Salas, M. L., Fresno, M. & Revilla, Y. (2006b). Regulation of Inducible Nitric Oxide Synthase Expression by Viral A238L-Mediated Inhibition of p65/RelA Acetylation and p300 Transactivation. *J Virol* **80**, 10487-96.
- Greig, A. (1972). Pathogenesis of African swine fever in pigs naturally exposed to the disease. *J Comp Pathol* **82**, 73-9.
- Greig, A. & Plowright, W. (1970). The excretion of two virulent strains of African swine fever virus by domestic pigs. *J Hyg (Lond)* **68**, 673-82.
- Gupta, S. (2003). Molecular signaling in death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis (Review). *Int J Oncol* **22**, 15-20.
- Hamdy, F. M. & Dardiri, A. H. (1984). Clinical and immunologic responses of pigs to African swine fever virus isolated from the Western Hemisphere. *Am J Vet Res* **45**, 711-4.
- Hardwick, J. M. & Bellows, D. S. (2003). Viral versus cellular BCL-2 proteins. *Cell Death Differ* **10 Suppl 1**, S68-76.
- Harkin, S. T., Cohen, G. M. & Gescher, A. (1998). Modulation of apoptosis in rat thymocytes by analogs of staurosporine: lack of direct association with inhibition of protein kinase C. *Mol Pharmacol* **54**, 663-70.
- Hata, S., Koyama, A. H., Shiota, H., Adachi, A., Goshima, F. & Nishiyama, Y. (1999). Antiapoptotic activity of herpes simplex virus type 2: the role of US3 protein kinase gene. *Microbes Infect* **1**, 601-7.
- Hay, S. & Kannourakis, G. (2002). A time to kill: viral manipulation of the cell death program. *J Gen Virol* **83**, 1547-64.
- Hayden, M. S. & Ghosh, S. (2004). Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev* **18**, 2195-224.
- Heath, C. M., Windsor, M. & Wileman, T. (2001). Aggresomes resemble sites specialized for virus assembly. *J Cell Biol* **153**, 449-55.
- Hernaez, B., Diaz-Gil, G., Garcia-Gallo, M., Ignacio Quetglas, J., Rodriguez-Crespo, I., Dixon, L., Escribano, J. M. & Alonso, C. (2004). The African swine fever

- virus dynein-binding protein p54 induces infected cell apoptosis. *FEBS Lett* **569**, 224-8.
- Hess, W. R. (1981). African swine fever: a reassessment. *Adv Vet Sci Comp Med* **25**, 39-69.
- Heuschele, W. P. (1967). Studies on the pathogenesis of African swine fever. I. Quantitative studies on the sequential development of virus in pig tissues. *Arch Gesamte Virusforsch* **21**, 349-56.
- Heuschele, W. P., Coggins, L. & Stone, S. S. (1966). Fluorescent antibody studies on African swine fever virus. *Am J Vet Res* **27**, 477-84.
- Hofmann, J. (2001). Modulation of protein kinase C in antitumor treatment. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* **142**, 1-96.
- Hofmann, J. (2004). Protein kinase C isozymes as potential targets for anticancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* **4**, 125-46.
- Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S. & Zumla, A. (2005). Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes Immun* **6**, 279-84.
- Hurbin, A., Coll, J. L., Dubrez-Daloz, L., Mari, B., Auberger, P., Brambilla, C. & Favrot, M. C. (2005). Cooperation of amphiregulin and insulin-like growth factor-1 inhibits Bax- and Bad-mediated apoptosis via a protein kinase C-dependent pathway in non-small cell lung cancer cells. *J Biol Chem* **280**, 19757-67.
- Hurtado, C., Granja, A. G., Bustos, M. J., Nogal, M. L., Gonzalez de Buitrago, G., de Yebenes, V. G., Salas, M. L., Revilla, Y. & Carrascosa, A. L. (2004). The C-type lectin homologue gene (EP153R) of African swine fever virus inhibits apoptosis both in virus infection and in heterologous expression. *Virology* **326**, 160-70.
- Huynh, M. L., Fadok, V. A. & Henson, P. M. (2002). Phosphatidylserine-dependent ingestion of apoptotic cells promotes TGF-beta1 secretion and the resolution of inflammation. *J Clin Invest* **109**, 41-50.
- Jacobsen, M. D., Weil, M. & Raff, M. C. (1996). Role of Ced-3/ICE-family proteases in staurosporine-induced programmed cell death. *J Cell Biol* **133**, 1041-51.
- Jiang, A. & Clark, E. A. (2001). Involvement of Bik, a proapoptotic member of the Bcl-2 family, in surface IgM-mediated B cell apoptosis. *J Immunol* **166**, 6025-33.
- Johnston, J. A., Ward, C. L. & Kopito, R. R. (1998). Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins. *J Cell Biol* **143**, 1883-98.
- Karber, G. (1931). Fifty percent end point calculation. *Archiv fur Experimentelle Pathologie und Pharmakologie*, pp. 480-483.
- Karin, M. & Lin, A. (2002). NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* **3**, 221-7.

- Kay-Jackson, P. C., Goatley, L. C., Cox, L., Miskin, J. E., Parkhouse, R. M., Wienands, J. & Dixon, L. K. (2004). The CD2v protein of African swine fever virus interacts with the actin-binding adaptor protein SH3P7. *J Gen Virol* **85**, 119-30.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**, 239-57.
- Kobayashi, D., Watanabe, N., Yamauchi, N., Tsuji, N., Sato, T., Sasaki, H., Okamoto, T. & Niitsu, Y. (1997). Protein kinase C inhibitors augment tumor-necrosis-factor-induced apoptosis in normal human diploid cells. *Chemotherapy* **43**, 415-23.
- Koyama, A. H., Fukumori, T., Fujita, M., Irie, H. & Adachi, A. (2000). Physiological significance of apoptosis in animal virus infection. *Microbes Infect* **2**, 1111-7.
- Kroemer, G., El-Deiry, W. S., Golstein, P., Peter, M. E., Vaux, D., Vandenabeele, P., Zhivotovsky, B., Blagosklonny, M. V., Malorni, W., Knight, R. A., Piacentini, M., Nagata, S. & Melino, G. (2005). Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ* **12 Suppl 2**, 1463-7.
- Kucharczak, J., Simmons, M. J., Fan, Y. & Gelinas, C. (2003). To be, or not to be: NF-kappaB is the answer--role of Rel/NF-kappaB in the regulation of apoptosis. *Oncogene* **22**, 8961-82.
- Kuo, T. H., Kim, H. R., Zhu, L., Yu, Y., Lin, H. M. & Tsang, W. (1998). Modulation of endoplasmic reticulum calcium pump by Bcl-2. *Oncogene* **17**, 1903-10.
- Leitao, A., Cartaxeiro, C., Coelho, R., Cruz, B., Parkhouse, R. M., Portugal, F., Vigario, J. D. & Martins, C. L. (2001). The non-haemadsorbing African swine fever virus isolate ASFV/NH/P68 provides a model for defining the protective anti-virus immune response. *J Gen Virol* **82**, 513-23.
- Lemaire, C., Andreau, K., Souvannavong, V. & Adam, A. (1999). Specific dual effect of cycloheximide on B lymphocyte apoptosis: involvement of CPP32/caspase-3. *Biochem Pharmacol* **58**, 85-93.
- Lewis, J. G., Adams, D. O. & Fan, S. (1995). Selective sensitivity of macrophages to cytotoxicity by inhibitors of macromolecular synthesis: induction of apoptosis. *J Leukoc Biol* **57**, 635-42.
- Li, L. Y., Luo, X. & Wang, X. (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* **412**, 95-9.
- Li, M., Brooks, C. L., Wu-Baer, F., Chen, D., Baer, R. & Gu, W. (2003). Mono- versus polyubiquitination: differential control of p53 fate by Mdm2. *Science* **302**, 1972-5.
- Li, Q. & Verma, I. M. (2002). NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* **2**, 725-34.

- Li, Q., Withoff, S. & Verma, I. M. (2005). Inflammation-associated cancer: NF-kappaB is the lynchpin. *Trends Immunol* **26**, 318-25.
- Liebermann, D. A., Hoffman, B. & Vesely, D. (2007). p53 induced growth arrest versus apoptosis and its modulation by survival cytokines. *Cell Cycle* **6**, 166-70.
- Liu, H., Ma, Y., Pagliari, L. J., Perlman, H., Yu, C., Lin, A. & Pope, R. M. (2004). TNF-alpha-induced apoptosis of macrophages following inhibition of NF-kappa B: a central role for disruption of mitochondria. *J Immunol* **172**, 1907-15.
- Liu, X., Kim, C. N., Yang, J., Jemmerson, R. & Wang, X. (1996). Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* **86**, 147-57.
- Lockshin, R. A. & Zakeri, Z. (2004). Caspase-independent cell death? *Oncogene* **23**, 2766-73.
- Lopez-Otin, C., Freije, J. M., Parra, F., Mendez, E. & Vinuela, E. (1990). Mapping and sequence of the gene coding for protein p72, the major capsid protein of African swine fever virus. *Virology* **175**, 477-84.
- Lu, Q. & Mellgren, R. L. (1996). Calpain inhibitors and serine protease inhibitors can produce apoptosis in HL-60 cells. *Arch Biochem Biophys* **334**, 175-81.
- Lubon, H. & Hennighausen, L. (1987). Nuclear proteins from lactating mammary glands bind to the promoter of a milk protein gene. *Nucleic Acids Res* **15**, 2103-21.
- Malmquist, W. A. (1963). Serologic and immunologic studies with African swine fever virus. *Am J Vet Res* **24**, 450-9.
- Malmquist, W. A. & Hay, D. (1960a). Hemadsorption and cytopathic effect produced by African Swine Fever virus in swine bone marrow and buffy coat cultures. *Am J Vet Res* **21**, 104-8.
- Malmquist, W. A. & Hay, D. (1960b). Hemadsorption and cytopathic effect produced by ASFV in swine bone marrow and buffy coat cultures. *American Journal of Veterinary Research* **21**, 104-108.
- Manso Ribeiro, J., Nunes Petisca J, L., Lopes Frazao, F. & Sobral, M. (1963). Vaccination against ASF. *Bulletin Office International des Epizooties* **60**, 921-937.
- Manso Ribeiro, J. J., Azevedo, A. R., Teixeira, M. J., Braço Forte, M. C., Ribeiro, A. M., Oliveira, F., Noronha, C., Pereira, C. & Vigário, J. (1958). Peste porcine provoquée par une souche different (souche L) de la souche classique. *Bull Off Int Epizoot* **50**, 516-534.
- Martins, A., Ribeiro, G., Marques, M. I. & Costa, J. V. (1994). Genetic identification and nucleotide sequence of the DNA polymerase gene of African swine fever virus. *Nucleic Acids Res* **22**, 208-13.

- Martins, C., Mebus, C., Schol, T., Lawman, M. & Lunney, J. (1988). Virus-Specific CTL in SLA-Inbred Swine Recovered from Experimental African Swine Fever (ASFV) Infection. *Annl N Y Acad Sci* **532**, 462-464.
- Martins, C. L., Lawman, M. J., Scholl, T., Mebus, C. A. & Lunney, J. K. (1993). African swine fever virus specific porcine cytotoxic T cell activity. *Arch Virol* **129**, 211-25.
- Marzi, A., Gramberg, T., Simmons, G., Moller, P., Rennekamp, A. J., Krumbiegel, M., Geier, M., Eisemann, J., Turza, N., Saunier, B., Steinkasserer, A., Becker, S., Bates, P., Hofmann, H. & Pohlmann, S. (2004). DC-SIGN and DC-SIGNR interact with the glycoprotein of Marburg virus and the S protein of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J Virol* **78**, 12090-5.
- McCrossan, M., Windsor, M., Ponnambalam, S., Armstrong, J. & Wileman, T. (2001). The trans Golgi network is lost from cells infected with African swine fever virus. *J Virol* **75**, 11755-65.
- McCullough, K. C., Basta, S., Knotig, S., Gerber, H., Schaffner, R., Kim, Y. B., Saalmuller, A. & Summerfield, A. (1999). Intermediate stages in monocyte-macrophage differentiation modulate phenotype and susceptibility to virus infection. *Immunology* **98**, 203-12.
- McCullough, K. C., Schaffner, R., Fraefel, W. & Kihm, U. (1993). The relative density of CD44-positive porcine monocytic cell populations varies between isolations and upon culture and influences susceptibility to infection by African swine fever virus. *Immunol Lett* **37**, 83-90.
- Mebus, C. A. & Dardiri, A. H. (1980). Western hemisphere isolates of African swine fever virus: asymptomatic carriers and resistance to challenge inoculation. *Am J Vet Res* **41**, 1867-9.
- Melino, G., Knight, R. A. & Nicotera, P. (2005). How many ways to die? How many different models of cell death? *Cell Death Differ* **12 Suppl 2**, 1457-62.
- Mise-Omata, S., Montagne, B., Deckert, M., Wienands, J. & Acuto, O. (2003). Mammalian actin binding protein 1 is essential for endocytosis but not lamellipodia formation: functional analysis by RNA interference. *Biochem Biophys Res Commun* **301**, 704-10.
- Miskin, J. E., Abrams, C. C., Goatley, L. C. & Dixon, L. K. (1998). A viral mechanism for inhibition of the cellular phosphatase calcineurin. *Science* **281**, 562-5.
- Modjtahedi, N., Giordanetto, F., Madeo, F. & Kroemer, G. (2006). Apoptosis-inducing factor: vital and lethal. *Trends Cell Biol* **16**, 264-72.
- Moingeon, P., Chang, H. C., Wallner, B. P., Stebbins, C., Frey, A. Z. & Reinherz, E. L. (1989). CD2-mediated adhesion facilitates T lymphocyte antigen recognition function. *Nature* **339**, 312-4.
- Montgomery, R. E. (1921). On a form of swine fever occurring in British East Africa (Kenya colony). *J Comp Pathol* **34**, 243-262.

- Murphy, F. A., Gibbs, E. P. J., Horzinek, M. C. & Studdert, M. J. (1999). *Veterinary Virology*, 3rd edn. San Diego: Academic Press.
- Neilan, J. G., Borca, M. V., Lu, Z., Kutish, G. F., Kleiboeker, S. B., Carrillo, C., Zsak, L. & Rock, D. L. (1999). An African swine fever virus ORF with similarity to C-type lectins is non-essential for growth in swine macrophages in vitro and for virus virulence in domestic swine. *J Gen Virol* **80** (Pt 10), 2693-7.
- Neilan, J. G., Lu, Z., Afonso, C. L., Kutish, G. F., Sussman, M. D. & Rock, D. L. (1993). An African swine fever virus gene with similarity to the proto-oncogene bcl-2 and the Epstein-Barr virus gene BHRF1. *J Virol* **67**, 4391-4.
- Neilan, J. G., Lu, Z., Kutish, G. F., Zsak, L., Burrage, T. G., Borca, M. V., Carrillo, C. & Rock, D. L. (1997a). A BIR motif containing gene of African swine fever virus, 4CL, is nonessential for growth in vitro and viral virulence. *Virology* **230**, 252-64.
- Neilan, J. G., Lu, Z., Kutish, G. F., Zsak, L., Lewis, T. L. & Rock, D. L. (1997b). A conserved African swine fever virus IkappaB homolog, 5EL, is nonessential for growth in vitro and virulence in domestic swine. *Virology* **235**, 377-85.
- Neilan, J. G., Zsak, L., Lu, Z., Burrage, T. G., Kutish, G. F. & Rock, D. L. (2004). Neutralizing antibodies to African swine fever virus proteins p30, p54, and p72 are not sufficient for antibody-mediated protection. *Virology* **319**, 337-42.
- Neilan, J. G., Zsak, L., Lu, Z., Kutish, G. F., Afonso, C. L. & Rock, D. L. (2002). Novel swine virulence determinant in the left variable region of the African swine fever virus genome. *J Virol* **76**, 3095-104.
- Netherton, C. L., McCrossan, M. C., Denyer, M., Ponnambalam, S., Armstrong, J., Takamatsu, H. H. & Wileman, T. E. (2006). African swine fever virus causes microtubule-dependent dispersal of the trans-golgi network and slows delivery of membrane protein to the plasma membrane. *J Virol* **80**, 11385-92.
- Newmeyer, D. D. & Ferguson-Miller, S. (2003). Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell* **112**, 481-90.
- Nix, R. J., Gallardo, C., Hutchings, G., Blanco, E. & Dixon, L. K. (2006). Molecular epidemiology of African swine fever virus studied by analysis of four variable genome regions. *Arch Virol* **151**, 2475-94.
- Nogal, M. L., Gonzalez de Buitrago, G., Rodriguez, C., Cubelos, B., Carrascosa, A. L., Salas, M. L. & Revilla, Y. (2001). African swine fever virus IAP homologue inhibits caspase activation and promotes cell survival in mammalian cells. *J Virol* **75**, 2535-43.
- Nunes, J. F., Vigario, J. D. & Terrinha, A. M. (1975). Ultrastructural study of African swine fever virus replication in cultures of swine bone marrow cells. *Arch Virol* **49**, 59-66.
- O'Brien, V. (1998). Viruses and apoptosis. *J Gen Virol* **79** (Pt 8), 1833-45.

- O'Connell, A. R., Holohan, C., Torriglia, A., Lee, B. W. & Stenson-Cox, C. (2006). Characterization of a serine protease-mediated cell death program activated in human leukemia cells. *Exp Cell Res* **312**, 27-39.
- OIE (2005). Terrestrial Animal Health Code, 14th Edition edn. Paris, France: OIE.
- OIE (2007a). African swine fever (ASF) confirmed in Georgia. Em: http://www.oie.int/eng/press/en_070607.htm. (Acedido em 1 de Outubro de 2007)
- OIE (2007b). African swine fever, Russia. Em: http://www.oie.int/wahid-prod/public.php?page=single_report&pop=1&reportid=6546. (Acedido em 28 de Dezembro 2007)
- OIE (2008). African swine fever, Azerbaijan. Em: http://www.oie.int/wahid-prod/public.php?page=single_report&pop=1&reportid=6730. (Acedido em 5 de Janeiro de 2008)
- Okada, H. & Mak, T. W. (2004). Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer* **4**, 592-603.
- Ortin, J., Enjuanes, L. & Vinuela, E. (1979). Cross-links in African swine fever virus DNA. *J Virol* **31**, 579-83.
- Oura, C. A., Denyer, M. S., Takamatsu, H. & Parkhouse, R. M. (2005). In vivo depletion of CD8+ T lymphocytes abrogates protective immunity to African swine fever virus. *J Gen Virol* **86**, 2445-50.
- Oura, C. A., Powell, P. P. & Parkhouse, R. M. (1998). African swine fever: a disease characterized by apoptosis. *J Gen Virol* **79** (Pt 6), 1427-38.
- Pan, I. C. & Hess, W. R. (1984). Virulence in African swine fever: its measurement and implications. *Am J Vet Res* **45**, 361-6.
- Pan, I. C., Shimizu, M. & Hess, W. R. (1980). Replication of African swine fever virus in cell cultures. *Am J Vet Res* **41**, 1357-67.
- Papa, S., Bubici, C., Zazzeroni, F., Pham, C. G., Kuntzen, C., Knabb, J. R., Dean, K. & Franzoso, G. (2006). The NF-kappaB-mediated control of the JNK cascade in the antagonism of programmed cell death in health and disease. *Cell Death Differ* **13**, 712-29.
- Papa, S., Zazzeroni, F., Pham, C. G., Bubici, C. & Franzoso, G. (2004). Linking JNK signaling to NF-kappaB: a key to survival. *J Cell Sci* **117**, 5197-208.
- Peet, G. W. & Li, J. (1999). IkappaB kinases alpha and beta show a random sequential kinetic mechanism and are inhibited by staurosporine and quercetin. *J Biol Chem* **274**, 32655-61.
- Peng, X., Maruo, T., Matsuo, H., Takekida, S. & Deguchi, J. (1998). Serum deprivation-induced apoptosis in cultured porcine granulosa cells is

- characterized by increased expression of p53 protein, Fas antigen and Fas ligand and by decreased expression of PCNA. *Endocr J* **45**, 247-53.
- Penninger, J. M. & Kroemer, G. (2003). Mitochondria, AIF and caspases--rivaling for cell death execution. *Nat Cell Biol* **5**, 97-9.
- Pennington, K. N., Taylor, J. A., Bren, G. D. & Paya, C. V. (2001). IkappaB kinase-dependent chronic activation of NF-kappaB is necessary for p21(WAF1/Cip1) inhibition of differentiation-induced apoptosis of monocytes. *Mol Cell Biol* **21**, 1930-41.
- Pfaffl, M. W., Tichopad, A., Prgomet, C. & Neuvians, T. P. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett* **26**, 509-15.
- Pires, S., Ribeiro, G. & Costa, J. V. (1997). Sequence and organization of the left multigene family 110 region of the Vero-adapted L60V strain of African swine fever virus. *Virus Genes* **15**, 271-4.
- Plowright, W., Brown, F. & Parker, J. (1966). Evidence for the type of nucleic acid in African swine fever virus. *Arch Gesamte Virusforsch* **19**, 289-304.
- Plowright, W., Parker, J. & Staple, R. F. (1968). The growth of a virulent strain of African swine fever virus in domestic pigs. *J Hyg (Lond)* **66**, 117-34.
- Plowright, W., Thomson, G. R. & Naser, J. A. (1994). African swine fever. In *Infectious diseases of livestock*, pp. 568-599. Edited by J. A. W. Coetzer, G. R. Thomson & R. C. Tustin: Oxford University Press.
- Polster, B. M., Pevsner, J. & Hardwick, J. M. (2004). Viral Bcl-2 homologs and their role in virus replication and associated diseases. *Biochim Biophys Acta* **1644**, 211-27.
- Powell, P. P., Dixon, L. K. & Parkhouse, R. M. (1996). An IkappaB homolog encoded by African swine fever virus provides a novel mechanism for downregulation of proinflammatory cytokine responses in host macrophages. *J Virol* **70**, 8527-33.
- Prados, F. J., Vinuela, E. & Alcamí, A. (1993). Sequence and characterization of the major early phosphoprotein p32 of African swine fever virus. *J Virol* **67**, 2475-85.
- Qiao, L., Koutsos, M., Tsai, L. L., Kozoni, V., Guzman, J., Shiff, S. J. & Rigas, B. (1996). Staurosporine inhibits the proliferation, alters the cell cycle distribution and induces apoptosis in HT-29 human colon adenocarcinoma cells. *Cancer Lett* **107**, 83-9.
- Ramiro-Ibanez, F., Ortega, A., Brun, A., Escribano, J. M. & Alonso, C. (1996). Apoptosis: a mechanism of cell killing and lymphoid organ impairment during acute African swine fever virus infection. *J Gen Virol* **77** (Pt 9), 2209-19.

- Rao, A., Luo, C. & Hogan, P. G. (1997). Transcription factors of the NFAT family: regulation and function. *Annu Rev Immunol* **15**, 707-47.
- Revilla-Fernandez, S., Wallner, B., Truschner, K., Benczak, A., Brem, G., Schmoll, F., Mueller, M. & Steinborn, R. (2005). The use of endogenous and exogenous reference RNAs for qualitative and quantitative detection of PRRSV in porcine semen. *J Virol Methods* **126**, 21-30.
- Revilla, Y., Callejo, M., Rodriguez, J. M., Culebras, E., Nogal, M. L., Salas, M. L., Vinuela, E. & Fresno, M. (1998). Inhibition of nuclear factor kappaB activation by a virus-encoded IkappaB-like protein. *J Biol Chem* **273**, 5405-11.
- Revilla, Y., Cebrian, A., Baixeras, E., Martinez, C., Vinuela, E. & Salas, M. L. (1997). Inhibition of apoptosis by the African swine fever virus Bcl-2 homologue: role of the BH1 domain. *Virology* **228**, 400-4.
- Rodriguez, C. I., Nogal, M. L., Carrascosa, A. L., Salas, M. L., Fresno, M. & Revilla, Y. (2002). African swine fever virus IAP-like protein induces the activation of nuclear factor kappa B. *J Virol* **76**, 3936-42.
- Rodriguez, F., Alcaraz, C., Eiras, A., Yanez, R. J., Rodriguez, J. M., Alonso, C., Rodriguez, J. F. & Escribano, J. M. (1994a). Characterization and molecular basis of heterogeneity of the African swine fever virus envelope protein p54. *J Virol* **68**, 7244-52.
- Rodriguez, J. M., Garcia-Escudero, R., Salas, M. L. & Andres, G. (2004). African swine fever virus structural protein p54 is essential for the recruitment of envelope precursors to assembly sites. *J Virol* **78**, 4299-1313.
- Rodriguez, J. M., Salas, M. L. & Vinuela, E. (1996). Intermediate class of mRNAs in African swine fever virus. *J Virol* **70**, 8584-9.
- Rodriguez, J. M., Yanez, R. J., Almazan, F., Vinuela, E. & Rodriguez, J. F. (1993). African swine fever virus encodes a CD2 homolog responsible for the adhesion of erythrocytes to infected cells. *J Virol* **67**, 5312-20.
- Rodriguez, J. M., Yanez, R. J., Pan, R., Rodriguez, J. F., Salas, M. L. & Vinuela, E. (1994b). Multigene families in African swine fever virus: family 505. *J Virol* **68**, 2746-51.
- Rojo, G., Chamorro, M., Salas, M. L., Vinuela, E., Cuezva, J. M. & Salas, J. (1998). Migration of mitochondria to viral assembly sites in African swine fever virus-infected cells. *J Virol* **72**, 7583-8.
- Rojo, G., Garcia-Beato, R., Vinuela, E., Salas, M. L. & Salas, J. (1999). Replication of African swine fever virus DNA in infected cells. *Virology* **257**, 524-36.
- Rouiller, I., Brookes, S. M., Hyatt, A. D., Windsor, M. & Wileman, T. (1998). African swine fever virus is wrapped by the endoplasmic reticulum. *J Virol* **72**, 2373-87.

- Rozen, S. & Stkaletsky, H. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*, pp. 365-386. Edited by S. Krawetz & S. Misener. Totowa, NJ: Humana Press.
- Ruegg, U. T. & Burgess, G. M. (1989). Staurosporine, K-252 and UCN-01: potent but nonspecific inhibitors of protein kinases. *Trends Pharmacol Sci* **10**, 218-20.
- Saelens, X., Festjens, N., Vande Walle, L., van Gurp, M., van Loo, G. & Vandenabeele, P. (2004). Toxic proteins released from mitochondria in cell death. *Oncogene* **23**, 2861-74.
- Salas, M. L., Kuznar, J. & Vinuela, E. (1981). Polyadenylation, methylation, and capping of the RNA synthesized in vitro by African swine fever virus. *Virology* **113**, 484-91.
- Salguero, F. J., Sanchez-Cordon, P. J., Nunez, A., Fernandez de Marco, M. & Gomez-Villamandos, J. C. (2005). Proinflammatory cytokines induce lymphocyte apoptosis in acute African swine fever infection. *J Comp Pathol* **132**, 289-302.
- Sanchez Botija, C. (1982). African swine fever. New developments. *Rev sci tech Off int Epiz* **1**, 1065-1094.
- Schlafer, D. H. & Mebus, C. A. (1984). Abortion in sows experimentally infected with African swine fever virus: Clinical features. *Am J Vet Res* **45**, 1353-1360.
- Schuler, M. & Green, D. R. (2005). Transcription, apoptosis and p53: catch-22. *Trends Genet* **21**, 182-7.
- Scorrano, L., Oakes, S. A., Opferman, J. T., Cheng, E. H., Sorcinelli, M. D., Pozzan, T. & Korsmeyer, S. J. (2003). BAX and BAK regulation of endoplasmic reticulum Ca²⁺: a control point for apoptosis. *Science* **300**, 135-9.
- Sharon, N. & Lis, H. (2004). History of lectins: from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology* **14**, 53R-62R.
- Shchelkunov, S. N., Safronov, P. F., Totmenin, A. V., Petrov, N. A., Ryazankina, O. I., Gutorov, V. V. & Kotwal, G. J. (1998). The genomic sequence analysis of the left and right species-specific terminal region of a cowpox virus strain reveals unique sequences and a cluster of intact ORFs for immunomodulatory and host range proteins. *Virology* **243**, 432-60.
- Shibasaki, F., Kondo, E., Akagi, T. & McKeon, F. (1997). Suppression of signalling through transcription factor NF-AT by interactions between calcineurin and Bcl-2. *Nature* **386**, 728-31.
- Sierra, M. A., Bernabe, A., Mozos, E., Mendez, A. & Jover, A. (1987). Ultrastructure of the liver in pigs with experimental African swine fever. *Vet Pathol* **24**, 460-2.

- Sierra, M. A., Gomez-Villamandos, J. C., Carrasco, L., Fernandez, A., Mozos, E. & Jover, A. (1991). In vivo study of hemadsorption in African swine fever virus infected cells. *Vet Pathol* **28**, 178-81.
- Sierra, M. A., Quezada, M., Fernandez, A., Carrasco, L., Gomez-Villamandos, J. C., Martin de las Mulas, J. & Sanchez-Vizcaino, J. M. (1989). Experimental African swine fever: evidence of the virus in interstitial tissues of the kidney. *Vet Pathol* **26**, 173-6.
- Simon-Mateo, C., Andres, G., Almazan, F. & Vinuela, E. (1997). Proteolytic processing in African swine fever virus: evidence for a new structural polyprotein, pp62. *J Virol* **71**, 5799-804.
- Simon-Mateo, C., Andres, G. & Vinuela, E. (1993). Polyprotein processing in African swine fever virus: a novel gene expression strategy for a DNA virus. *Embo J* **12**, 2977-87.
- Sogo, J. M., Almendral, J. M., Talavera, A. & Vinuela, E. (1984). Terminal and internal inverted repetitions in African swine fever virus DNA. *Virology* **133**, 271-5.
- Sordet, O., Rebe, C., Plenchette, S., Zermati, Y., Hermine, O., Vainchenker, W., Garrido, C., Solary, E. & Dubrez-Daloz, L. (2002). Specific involvement of caspases in the differentiation of monocytes into macrophages. *Blood* **100**, 4446-53.
- Srinivasula, S. M., Gupta, S., Datta, P., Zhang, Z., Hegde, R., Cheong, N., Fernandes-Alnemri, T. & Alnemri, E. S. (2003). Inhibitor of apoptosis proteins are substrates for the mitochondrial serine protease Omi/HtrA2. *J Biol Chem* **278**, 31469-72.
- Srivastava, R. K., Sasaki, C. Y., Hardwick, J. M. & Longo, D. L. (1999). Bcl-2-mediated drug resistance: inhibition of apoptosis by blocking nuclear factor of activated T lymphocytes (NFAT)-induced Fas ligand transcription. *J Exp Med* **190**, 253-65.
- Stefanovic, S., Windsor, M., Nagata, K. I., Inagaki, M. & Wileman, T. (2005). Vimentin rearrangement during African swine fever virus infection involves retrograde transport along microtubules and phosphorylation of vimentin by calcium calmodulin kinase II. *J Virol* **79**, 11766-75.
- Stepczynska, A., Lauber, K., Engels, I. H., Janssen, O., Kabelitz, D., Wesselborg, S. & Schulze-Osthoff, K. (2001). Staurosporine and conventional anticancer drugs induce overlapping, yet distinct pathways of apoptosis and caspase activation. *Oncogene* **20**, 1193-202.
- Tait, S. W., Reid, E. B., Greaves, D. R., Wileman, T. E. & Powell, P. P. (2000). Mechanism of inactivation of NF-kappa B by a viral homologue of I kappa b alpha. Signal-induced release of I kappa b alpha results in binding of the viral homologue to NF-kappa B. *J Biol Chem* **275**, 34656-64.

- Tang, D., Lahti, J. M., Grenet, J. & Kidd, V. J. (1999). Cycloheximide-induced T-cell death is mediated by a Fas-associated death domain-dependent mechanism. *J Biol Chem* **274**, 7245-52.
- Tassiulas, I., Park-Min, K. H., Hu, Y., Kellerman, L., Mevorach, D. & Ivashkiv, L. B. (2007). Apoptotic cells inhibit LPS-induced cytokine and chemokine production and IFN responses in macrophages. *Hum Immunol* **68**, 156-64.
- Taylor, E. L., Megson, I. L., Haslett, C. & Rossi, A. G. (2003). Nitric oxide: a key regulator of myeloid inflammatory cell apoptosis. *Cell Death Differ* **10**, 418-30.
- Terpstra, C. & Wensvoort, G. (1986). [African swine fever in the Netherlands]. *Tijdschr Diergeneeskde* **111**, 389-92.
- Trapani, J. A. & Smyth, M. J. (2002). Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol* **2**, 735-47.
- Uren, A. G., Coulson, E. J. & Vaux, D. L. (1998). Conservation of baculovirus inhibitor of apoptosis repeat proteins (BIRPs) in viruses, nematodes, vertebrates and yeasts. *Trends Biochem Sci* **23**, 159-62.
- Valdeira, M. L., Bernardes, C., Cruz, B. & Geraldès, A. (1998). Entry of African swine fever virus into Vero cells and uncoating. *Vet Microbiol* **60**, 131-40.
- Vallee, I., Tait, S. W. & Powell, P. P. (2001). African swine fever virus infection of porcine aortic endothelial cells leads to inhibition of inflammatory responses, activation of the thrombotic state, and apoptosis. *J Virol* **75**, 10372-82.
- Van Cruchten, S. & Van Den Broeck, W. (2002). Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol* **31**, 214-23.
- Vandenabeele, P., Vanden Berghe, T. & Festjens, N. (2006). Caspase inhibitors promote alternative cell death pathways. *Sci STKE* **2006**, pe44.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. & Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* **3**, RESEARCH0034.
- Vaux, D. L. & Silke, J. (2005). IAPs, RINGs and ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 287-97.
- Vigario, J. D., Terrinha, A. M. & Moura Nunes, J. F. (1974). Antigenic relationships among strains of African swine fever virus. *Arch Gesamte Virusforsch* **45**, 272-7.
- Villeda, C. J., Williams, S. M., Wilkinson, P. J. & Vinuela, E. (1993a). Consumption coagulopathy associated with shock in acute African swine fever. *Arch Virol* **133**, 467-75.
- Villeda, C. J., Williams, S. M., Wilkinson, P. J. & Vinuela, E. (1993b). Haemostatic abnormalities in African swine fever a comparison of two virus strains of

- different virulence (Dominican Republic '78 and Malta '78). *Arch Virol* **130**, 71-83.
- Vinuela, E. (1985). African swine fever virus. *Curr Top Microbiol Immunol* **116**, 151-70.
- Voigt, S., Sandford, G. R., Ding, L. & Burns, W. H. (2001). Identification and characterization of a spliced C-type lectin-like gene encoded by rat cytomegalovirus. *J Virol* **75**, 603-11.
- Voll, R. E., Herrmann, M., Roth, E. A., Stach, C., Kalden, J. R. & Girkontaite, I. (1997). Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* **390**, 350-1.
- Wajant, H., Pfizenmaier, K. & Scheurich, P. (2003). Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* **10**, 45-65.
- Wang, H. G., Pathan, N., Ethell, I. M., Krajewski, S., Yamaguchi, Y., Shibasaki, F., McKeon, F., Bobo, T., Franke, T. F. & Reed, J. C. (1999). Ca²⁺-induced apoptosis through calcineurin dephosphorylation of BAD. *Science* **284**, 339-43.
- Wang, K. K. (2000). Calpain and caspase: can you tell the difference? *Trends Neurosci* **23**, 20-6.
- Wardley, R. C., de, M. A. C., Black, D. N., de Castro Portugal, F. L., Enjuanes, L., Hess, W. R., Mebus, C., Ordas, A., Rutili, D., Sanchez Vizcaino, J., Vigario, J. D., Wilkinson, P. J., Moura Nunes, J. F. & Thomson, G. (1983). African Swine Fever virus. Brief review. *Arch Virol* **76**, 73-90.
- Wardley, R. C. & Wilkinson, P. J. (1977). The association of African swine fever virus with blood components of infected pigs. *Arch Virol* **55**, 327-34.
- Warren, D. T., Andrews, P. D., Gourlay, C. W. & Ayscough, K. R. (2002). Sla1p couples the yeast endocytic machinery to proteins regulating actin dynamics. *J Cell Sci* **115**, 1703-15.
- Wei, J., Sun, Z., Chen, Q. & Gu, J. (2006). Serum deprivation induced apoptosis in macrophage is mediated by autocrine secretion of type I IFNs. *Apoptosis* **11**, 545-54.
- Whittall, J. T. & Parkhouse, R. M. (1997). Changes in swine macrophage phenotype after infection with African swine fever virus: cytokine production and responsiveness to interferon-gamma and lipopolysaccharide. *Immunology* **91**, 444-9.
- Wilcock, D., Duncan, S. A., Traktman, P., Zhang, W. H. & Smith, G. L. (1999). The vaccinia virus A4OR gene product is a nonstructural, type II membrane glycoprotein that is expressed at the cell surface. *J Gen Virol* **80** (Pt 8), 2137-48.
- Wilkinson, P. J. (1986). Epidemiology of African swine fever. *Rev sci tech Off int Epiz* **5**, 487-493.

- Wilkinson, P. J. (1989). African swine fever virus. In *Virus Infections of Porcines*. Edited by M. C. Pensaert. Amsterdam: Elsevier.
- Wilkinson, P. J. & Donaldson, A. I. (1977). Transmission studies with African swine fever virus. The early distribution of virus in pigs infected by airborne virus. *J Comp Pathol* **87**, 497-501.
- Wilkinson, P. J., Donaldson, A. I., Greig, A. & Bruce, W. (1977). Transmission studies with African swine fever virus. Infections of pigs by airborne virus. *J Comp Pathol* **87**, 487-95.
- Wilkinson, P. J. & Wardley, R. C. (1978). The replication of African swine fever virus in pig endothelial cells. *Br Vet J* **134**, 280-2.
- Xu, Y. (2003). Regulation of p53 responses by post-translational modifications. *Cell Death Differ* **10**, 400-3.
- Yamamoto, Y. & Gaynor, R. B. (2004). I κ B kinases: key regulators of the NF- κ B pathway. *Trends Biochem Sci* **29**, 72-9.
- Yanez, R. J., Rodriguez, J. M., Nogal, M. L., Yuste, L., Enriquez, C., Rodriguez, J. F. & Vinuela, E. (1995). Analysis of the complete nucleotide sequence of African swine fever virus. *Virology* **208**, 249-78.
- Yanez, R. J., Rodriguez, J. M., Rodriguez, J. F., Salas, M. L. & Vinuela, E. (1993). African swine fever virus thymidylate kinase gene: sequence and transcriptional mapping. *J Gen Virol* **74** (Pt 8), 1633-8.
- Yang, Y., Fang, S., Jensen, J. P., Weissman, A. M. & Ashwell, J. D. (2000). Ubiquitin protein ligase activity of IAPs and their degradation in proteasomes in response to apoptotic stimuli. *Science* **288**, 874-7.
- Yin, X. M., Oltvai, Z. N. & Korsmeyer, S. J. (1994). BH1 and BH2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with Bax. *Nature* **369**, 321-3.
- Yozawa, T., Kutish, G. F., Afonso, C. L., Lu, Z. & Rock, D. L. (1994). Two novel multigene families, 530 and 300, in the terminal variable regions of African swine fever virus genome. *Virology* **202**, 997-1002.
- Yuan, J. & Yankner, B. A. (2000). Apoptosis in the nervous system. *Nature* **407**, 802-9.
- Yue, T. L., Wang, C., Romanic, A. M., Kikly, K., Keller, P., DeWolf, W. E., Jr., Hart, T. K., Thomas, H. C., Storer, B., Gu, J. L., Wang, X. & Feuerstein, G. Z. (1998). Staurosporine-induced apoptosis in cardiomyocytes: A potential role of caspase-3. *J Mol Cell Cardiol* **30**, 495-507.
- Zermeno, C., Guzman-Morales, J., Macotella, Y., Nava, G., Lopez-Barrera, F., Kouri, J. B., Lavalle, C., de la Escalera, G. M. & Clapp, C. (2006). Prolactin inhibits the apoptosis of chondrocytes induced by serum starvation. *J Endocrinol* **189**, R1-8.

Zsak, L., Lu, Z., Burrage, T. G., Neilan, J. G., Kutish, G. F., Moore, D. M. & Rock, D. L. (2001). African swine fever virus multigene family 360 and 530 genes are novel macrophage host range determinants. *J Virol* **75**, 3066-76