

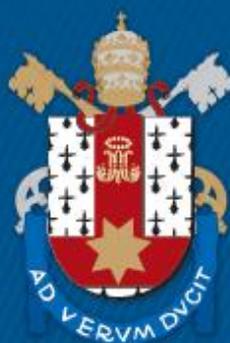
PUCRS

ESCOLA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO

GABRIELA ACEVEDO FERREIRA
**MECANISMOS DE MORTE UTILIZADOS PELAS CÉLULAS EPITELIAIS ALVEOLARES
INFECTADAS COM O VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO**

Porto Alegre
2016

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE

GABRIELA ACEVEDO FERREIRA

**MECANISMOS DE MORTE UTILIZADOS PELAS CÉLULAS EPITELIAIS
ALVEOLARES INFECTADAS COM O VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO**

PORTO ALEGRE

2016

GABRIELA ACEVEDO FERREIRA

**MECANISMOS DE MORTE UTILIZADOS PELAS CÉLULAS EPITELIAIS
ALVEOLARES INFECTADAS COM O VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde, área de concentração Clínica Médica pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

ORIENTADOR: MARCUS HERBERT JONES
COORIENTADORA: BÁRBARA NERY PORTO

PORTO ALEGRE

2016

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

F383m Ferreira, Gabriela Acevedo

Mecanismos de morte utilizados pelas células epiteliais alveolares infectadas com o vírus sincicial respiratório / Gabriela Acevedo Ferreira. — 2016.

59 f : il.

Diss. (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde, Área de concentração em Clínica Médica, PUCRS, Porto Alegre, 2016.

Orientador: Prof. Dr. Marcus Herbert Jones.

Co-orientador: Profa. Dra. Bárbara Nery Porto.

1. Medicina. 2. Infecções Respiratórias. 3. Vírus Sinciciais Respiratórios. 4. Morte Celular. 5. Apoptose. I. Jones, Marcus Herbert. II. Porto, Bárbara Nery. III. Título.

CDD: 616.2

CDU: 616.24:616-001

NLM: QW 168.5.P2

Alessandra Pinto Fagundes
Bibliotecária
CRB10/1244

GABRIELA ACEVEDO FERREIRA

**MECANISMOS DE MORTE UTILIZADOS PELAS CÉLULAS EPITELIAIS
ALVEOLARES INFECTADAS COM O VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO**

Dissertação apresentada como requisito para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde, área de concentração Clínica Médica pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

APROVADA EM: 03.03.2016

BANCA EXAMINADORA:

DR. LEONARDO ARAÚJO PINTO

DRA. ALINE ANDREA DA CUNHA

DR. JOSÉ EDUARDO VARGAS

PORTO ALEGRE

2016

Dedico esta dissertação à minha mãe,
por não me deixar desistir de ir atrás dos meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, aos meus pais, Rosemary e Leonardo, pois sem eles a realização desta etapa não seria possível, obrigada pelo amor e apoio incondicional.

Ao meu irmão, Gonzalo, por todo o apoio e suporte durante esta etapa.

A minha orientadora, Bárbara Porto, por ter aberto as portas para mim e por toda dedicação e paciência que teve comigo durante toda essa jornada, muito obrigada por todos os ensinamentos.

Um agradecimento especial a minha colega e amiga, Carolina Luft, minha parceira desde os tempos de iniciação científica, obrigada por me mostrar novos caminhos.

Aos meus colegas de laboratório, em especial à Stéfanie Muraro por todo suporte, paciência, aprendizado e pelas milhares de alíquotas de vírus.

Natália Jaeger, por não desistir das minhas citometrias, pelas análises até altas horas e por toda ajuda nos experimentos, muito obrigada.

À minha amiga e confidente, Pryscilla Alves, quero te agradecer por todo incentivo que me destes durante estes 2 anos, e por cada mensagem positiva nos dias de experimentos e as de encorajamento nesta reta final.

Aos demais que de alguma forma colaboraram para que este trabalho se tornasse realidade.

*“A verdadeira coragem é ir atrás dos seus sonhos mesmo
quando todos dizem que ele é impossível”*

Cora Coralina

RESUMO

A infecção pelo vírus sincicial respiratório (VSR) é a principal causa de hospitalização infantil, bem como um grande problema de saúde e dos custos econômicos no mundo inteiro. VSR causa infecção do trato respiratório (RTI) em adultos e doença do trato respiratório inferior (ITRI), incluindo bronquiolite aguda e pneumonia, em crianças e crianças jovens. Infelizmente, a infecção por RSV fornece uma proteção imune limitada à uma reinfeção, principalmente devido a memória imunológica insuficiente, o que conduz a uma resposta inflamatória exacerbada no trato respiratório promovendo dano nas vias aéreas durante a liberação do vírus. Com todos os estudos já feitos, vacinas seguras e eficazes contra RSV estão atualmente indisponíveis. Mesmo assim, uma estratégia profilática com base em um anticorpo humanizado neutralizante contra RSV é amplamente utilizado em recém-nascidos de alto risco, tais como recém-nascidos prematuros e aqueles que sofrem de doenças cardiovascular e imunossupressão. As células epiteliais alveolares são a primeira linha de defesa contra o vírus, sendo o local mais associado com a inflamação na doença. A entrada do vírus sincicial respiratório para as células epiteliais alveolares (CEAs) é um passo importante para o processo de infecção, envolvendo a ligação das proteínas G e F do VSR à moléculas ligadas na superfície da célula hospedeira. A infecção por vírus sincicial respiratório está associada com a morte celular epitelial e inflamação vigorosa, a morte apoptótica das células infectadas é um mecanismo para reduzir a replicação do vírus. E neste estudo mostramos a infecção induzida pelo vírus sincicial respiratório ativo em células epiteliais da linhagem A549, mostrando a via de morte celular induzida pelas células hospedeiras, nossos resultados mostram a via da apoptose induzida a partir da ativação de caspase-3 e não dependência da produção da produção de espécies reativas de oxigênio.

ABSTRACT

Infection by respiratory syncytial virus (RSV) is the leading cause of childhood hospitalization as well as a major health and economic burden worldwide. RSV causes RTI in adults and lower respiratory tract illness (LRTI), including acute bronchiolitis and pneumonia, in infants and young children. Unfortunately, RSV infection provides only limited immune protection to reinfection, mostly due to inadequate immunological memory, which leads to an exacerbated inflammatory response in the respiratory tract promoting airway damage during virus clearance. Despite extensive research efforts, safe and effective vaccines against RSV are currently unavailable. Nevertheless, a prophylactic strategy based on a humanized neutralizing antibody against RSV is widely used in newborn at high-risk, such as preterm infants and those suffering from cardiovascular diseases and immunosuppression. The alveolar epithelial cells are the first line of defense against the virus, most associated with the local inflammation in the disease. The entry of respiratory syncytial virus to alveolar epithelial cells (AECs) is an important step in the infection process involving binding of the RSV G and F protein molecules bound to the surface of the host cell. Infection with respiratory syncytial virus is associated with the epithelial cell death and vigorous inflammation, apoptotic death of infected cells is a mechanism to reduce virus replication.

And this study showed infection induced by active respiratory syncytial virus in the epithelial cells of the A549 line showing the pathway of cell death induced by the host cells, our results show the pathway of apoptosis induced from the caspase-3 activation and no dependence production of the production of reactive oxygen species.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura do vírus sincicial respiratório.	16
Figura 2: Vias que levam à ativação da caspase 3.....	24

LISTA DE SIGLAS

ANOVA – “*One-Way Analysis of Variance*”

ATF-2: “*Activating Transcription Factor 2*”

ATP - Adenosina Trifosfato

CAD: Caspases Ativada por DNAase

CCL: Ligante de quimiocina (C-C)

CDDP: Cisplatina

CEAs: Células Epiteliais Alveolares

CEP: Comitê de Ética em Pesquisa

CO₂- Dióxido de Carbono

CXC: Ligante de quimiocinas (C-X-C)

DFF: Fator de Fragmentação de DNA

DMEM: “*Dulbecco’s Modified Eagles Medium*”

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DPI: “*Diphenyleneiodonium*”

DR: “*Death Receptors*”

ERO: Espécies Reativas de Oxigênio

FDA: Food and Drug Administration”

GAG: Glicosaminoglicanos

GTP: “*guanosine-5'-triphosphate*”

H₂DCFDA: “*5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester*”

H₂O₂: Peróxido de Hidrogênio

HO-: Radicais hidroxila

IAP: “*Inhibitors of Apoptosis Proteins*”

IATR: Infecção Aguda do Trato Respiratório

ICAM-1: Molécula De Adesão Intercelular -1

IFN: Interferon

IFN-γ: Interferon Gamma

IFN-β: Interferon beta

IFR: Fatores Reguladores de Interferon

IL-1β: Interleucina 1 beta

IL-8: Interleucina 8

IP-10: Proteína indutora de interferon-gamma de 10kDa
ISG15: Gene Estimulado por Interferon 15
ITRI: Infecção do Trato Respiratório Inferior
LPS: Lipopolissacarídeos
MHC: “*Major Histocompatibility Complex*”
MIP-1 α : *Macrophage Inflammatory Proteins*
MTT: 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NAC: N-Acetilcisteína
NCCD – “*Nomenclature Committee on Cell Death*”
NF-IL-6: Fatores Nucleares IL-6
NF-KB: Fator Nuclear Kappa B
NHBE: “*Primary Normal Human Bronchial-tracheal Epithelial Cells*”
OMS: Organização Mundial da Saúde
PKC: Proteína Quinase C
PRR: Receptores de Reconhecimento Padrão
PBS: “*Phosphate-Buffered Saline*”
RANTES: “*Regulated on Activation, Normal T cell Expressed and Secreted*”
RIG-I: Gene Induzido por ácido Retinoico
RLR: “*Receptors like RIG-I*”
RNA - Ácido Ribonucléico
ROS: “*Reactive Oxygen Species*”
SAEC: “*Small Airway Epithelial Cells*”
SFB: Soro Fetal Bovino
SOCS: Supressores de Sinalização das Citocinas
STATS: Sinais Transdutores e Ativadores de Transcrição
TLR: Receptores Toll-like
TNF- α : Fator de Necrose Tumoral alfa
TNF: Fator de Necrose Tumoral
TRAIL: “*TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand*”
TSLP: Citocina Linfopoiética Estromal Tímica
UV – Ultravioleta
VSR: Vírus Sincicial Respiratório
VSR-IF: Vírus Sincicial Respiratório Inativado com Formalina

SUMÁRIO

1.	REVISÃO DA LITERATURA.....	14
1.1.	SITUANDO A PROBLEMÁTICA	14
1.2.	VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO (VSR)	15
1.3.	INFECÇÃO DAS CÉLULAS EPITELIAIS ALVEOLARES	18
1.4.	MORTE CELULAR.....	21
1.4.1.	APOPTOSE	21
1.5.	INFECÇÃO POR VSR E MORTE CELULAR PROGRAMADA	24
2.	JUSTIFICATIVA	27
3.	OBJETIVOS	28
3.1.	OBJETIVO GERAL:	28
3.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS:	28
4.	ARTIGO CIENTÍFICO.....	29

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1. SITUANDO A PROBLEMÁTICA

Os vírus mais frequentemente envolvidos nas infecções respiratórias são rinovírus, vírus sincicial respiratório (VSR), coronavírus, adenovírus, parainfluenza e influenza (DOLIN, 2007). Os vírus respiratórios são importante causa de pneumonia, tanto em crianças quanto em adultos. As pneumonias virais ocorrem mais frequentemente em crianças pequenas e idosos. Em adultos, o vírus da influenza é o principal agente etiológico. Em crianças, os principais agentes etiológicos envolvidos são VSR, vírus parainfluenza, adenovírus e vírus da influenza (TREANOR; HAYDEN, 2000; FALSEY, 2007).

A infecção pelo VSR pode se manifestar na forma de uma rinite, coriza ou otite enquanto abrange apenas o trato respiratório superior. Podendo progredir para uma bronquiolite ou pneumonia ao se estabelecer no trato respiratório inferior, exigindo hospitalização, oxigenoterapia, ventilação mecânica e podendo levar à morte (TREGONING & SCHWARZE, 2010).

A bronquiolite é uma doença inflamatória aguda das pequenas vias aéreas, caracterizada por obstrução bronquiolar, alçaonamento aéreo, hiperinsuflação pulmonar e atelectasias. O agente etiológico mais frequente é o VSR, isolado em mais de 75% das crianças menores de dois anos com bronquiolite. Outros agentes etiológicos incluem o parainfluenza vírus tipo 1 e 3, influenza B, adenovírus tipo 1, 2 e 5, *Mycoplasma pneumoniae*, rinovírus, enterovírus e herpes simplex vírus (TREANOR; HAYDEN, 2000; SHAH; SHARIEFF, 2007).

Bronquiolite aguda causada por vírus respiratórios é a doença mais prevalente em crianças nos dois primeiros anos de vida, com grande impacto em hospitalizações e custos para o sistema de saúde. Aproximadamente 30 em cada 1000 crianças hospitalizam por bronquiolite em todo o mundo (STEIN, 2008). Vinte por cento de todas as crianças apresentam ao menos um episódio de sibilância no primeiro ano de vida, sendo que a maioria é diagnosticada com infecção por vírus. O Vírus Sincicial Respiratório (VSR), identificado pela primeira vez em 1956, é considerado a principal causa isolada de infecção respiratória na infância (BLOUNT et al., 1956; CHANOCK et al., 1962).

Com exceção da influenza, as infecções respiratórias virais do trato respiratório não são a maior causa de mortalidade direta nos países desenvolvidos, estima-se que contribuem com 20% - 30% dos 4,5 milhões de morte anuais por infecção respiratória (PEIRIS, 2003). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que ocorram em todo o mundo 64 milhões de casos e 160 mil mortes por infecção respiratória causada por VSR a cada ano (WHO, 2009). Devido à prevalência do VSR, quase todas as crianças já foram infectadas pelo vírus ao alcançarem os 2 anos de idade. Os maiores índices de infecção ocorrem no terceiro e quarto meses de vida. O VSR não provoca uma resposta imune duradoura e por isso é comum a reinfeção (GARENNE; RONSMANS; CAMPBELL, 1992).

Dados epidemiológicos de países em desenvolvimento mostram que o VSR é uma importante causa de ITRI em crianças, responsável por aproximadamente 70% de todos os casos. Provavelmente devido à presença de fatores agravantes, como superpopulação, poluição e desnutrição, a taxa de mortalidade após ITRI por VSR pode chegar a 7% nas crianças com menos de 2 anos de idade. Essa taxa é consideravelmente maior que a dos países desenvolvidos (0,5 – 2,0%), o que torna essa infecção viral um importante problema de saúde pública nessas regiões (BRICKS, 2001; GARENNE; RONSMANS; CAMPBELL, 1992).

1.2. VÍRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO (VSR)

Este vírus foi primeiramente isolado em 1955, a partir de um chimpanzé em cativeiro com problemas nas vias respiratórias superiores, e logo se descobriu ter origem humana (COLLINS, 2011).

Pertencendo à família *Paramyxoviridae*, VSR é um vírus envelopado, com RNA de fita simples, contendo 15.200 nucleotídeos, no sentido negativo (3'-5'), podendo codificar 11 proteínas, dentre essas proteínas, duas estão presentes na superfície do vírion: a proteína de adesão (G) e a proteína de fusão (F), como representado na figura 1, (BUENO et al., 2008; LAY et al., 2013; OGRA, 2004). As proteínas não-estruturais, NS1 e NS2, junto com as proteínas G e F, constituem os componentes-chave para o ciclo infeccioso e para a evasão da resposta imune do hospedeiro. (BUENO et al., 2008; HARRIS; WERLING, 2003).

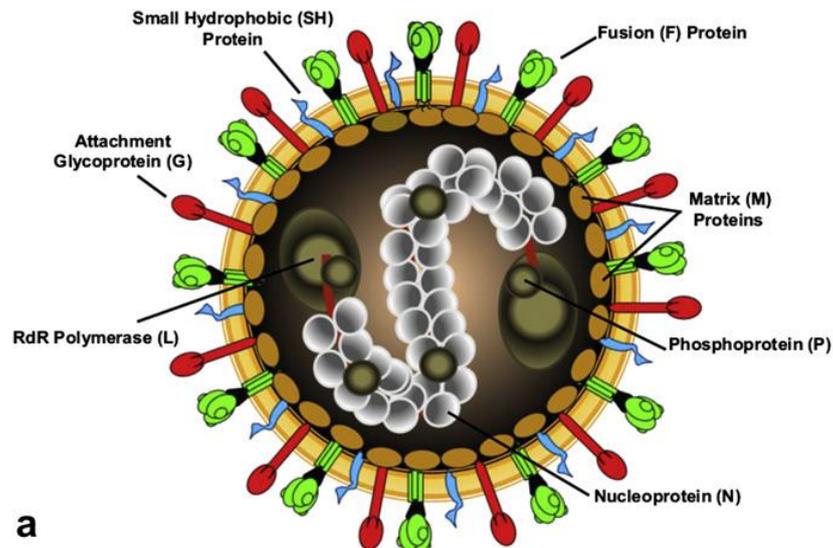


Figura 1: Estrutura do vírus sincicial respiratório.

Fonte: Lay et al., 2013

A proteína F tem como função principal dirigir a entrada do vírus pela fusão do vírion com a membrana celular hospedeira, podendo ainda mediar a fusão com outras células vizinhas formando um sincício. A glicoproteína G é a principal proteína de ligação ao hospedeiro do VSR e possui uma única região hidrofóbica que atua como peptídeo sinal e ainda como âncora membranar. Quatro proteínas do nucleocapsídeo são responsáveis pela replicação e transcrição do genoma viral: a proteína da nucleocapsídeo N; a fosfoproteína P, o fator anti-terminação M2-1 e a grande subunidade da polimerase L. A proteína N liga RNA genômico e anti-genômico originando a nucleocapsídeo resistente a RNAses, fato que protege o genoma de TLRs e helicases que desencadeiam a resposta imune. O vírus entra na célula por fusão com a membrana celular, resultante da ligação da proteína G a glicosaminoglicanos (GAGs). A expressão e replicação do genoma viral ocorrem no citoplasma. O gene M2-2 governa a transição entre a transcrição e síntese de RNA viral, sendo que a polimerase irá iniciar a replicação do RNA viral por ligação à sua extremidade 3'. A replicação origina uma cadeia de RNA (+) complementar ao genoma (antigenoma) que servirá de molde para a síntese do genoma viral. Ambos serão revestidos pela proteína N e, por fim, a proteína M irá promover a montagem do vírion, interagindo com as proteínas do envelope e da nucleocapsídeo (CHANG, 2011;

COLLINS, 2011; COLLINS; GRAHAM, 2008; COWTON; MCGIVERN; FEARN, 2006; HACKING; HULL, 2002).

Embora seja altamente infectivo, o VSR não induz uma memória imunológica efetiva e infecções repetidas são frequentes. Os sintomas da infecção por VSR em adultos normalmente se manifestam como uma rinite, mas em bebês prematuros, em crianças com menos de 2 anos e em idosos é comum uma infecção grave. Levando em consideração os dados epidemiológicos, o VSR é responsável por causar um problema de saúde que é extremamente caro para os pacientes, governos e sistemas de saúde (BUENO et al., 2008).

Infelizmente, até os dias de hoje não existe uma vacina comercialmente disponível contra esse patógeno. Os primeiros testes para desenvolver uma vacina contra VSR foram realizados com uma formulação de VSR inativado com formalina (VSR-IF) na década de 1960. Entretanto, as crianças vacinadas desenvolveram uma doença pulmonar exacerbada e precisaram de hospitalização sob infecção por VSR, enquanto as crianças não vacinadas apresentaram sintomas significativamente mais leves (KIM et al., 1969). Durante muito tempo o fracasso da vacina com VSR-IF permaneceu sem explicações, principalmente devido ao pouco entendimento das respostas imunes disparadas por infecções virais. Porém, estudos recentes sugeriram que a vacina com VSR-IF falhou devido à sua habilidade em induzir uma resposta imune tipo Th2 contra o vírus (MOGHADDAM et al., 2006; WARIS et al., 1996). A resposta tipo Th2 é caracterizada pela ativação e proliferação de células T CD4+ que secretam um padrão de citocinas que promovem a infiltração de eosinófilos e neutrófilos no tecido pulmonar. Esse microambiente celular alérgico diminui a ativação de células T CD8+ e suas funções efetoras, como a produção de IFN- γ (BUENO et al., 2008). Assim, a remoção do vírus é diminuída e a sua propagação, promovida. Estudos com o soro obtido de crianças imunizadas com a vacina VSR-IF mostraram que anticorpos contra as proteínas F e G foram gerados, mas eles apresentaram uma capacidade neutralizante baixa (OPENSHAW; TREGONING, 2005).

São conhecidos dois fármacos aprovados pela “*Food and Drug Administration*” (FDA) para o tratamento de doenças relacionadas com infecções por VSR – Palizumab e Ribavirina. O Palizumab é um anticorpo monoclonal humano que tem como alvo a glicoproteína F do vírus VSR e que previne a

propagação do vírus para as vias respiratórias inferiores. A sua prescrição é apenas indicada a crianças com elevado risco. O Ribavirina, um análogo sintético da guanosina é atualmente usado no tratamento de infecções severas por VSR embora as evidências de benefícios sejam limitadas, o risco de toxicidade seja elevado e presente elevados custos. Atua na depleção do *guanosine-5'-triphosphate* (GTP) intracelular pela inibição da desidrogenase da inosina-monofosfato (IMPDH), inibição da polimerase viral e ainda indução de erros/mutações no genoma viral letais para o mesmo (EMPEY; JR.; KOLLS, 2010; OLSZEWSKA; OPENSHAW, 2009).

1.3. INFECÇÃO DAS CÉLULAS EPITELIAIS ALVEOLARES

As células epiteliais alveolares são a primeira linha de defesa contra o vírus, sendo o local mais associado com a inflamação na doença. A entrada do vírus sincicial respiratório para as células epiteliais alveolares (CEAs) é um passo importante para o processo de infecção, envolve ligação das proteínas G e F do VSR à moléculas ligadas na superfície da célula hospedeira (LAMBERT et al. 1988).

Especificamente, VSR infecta o epitélio respiratório pela interação entre os domínios de ligação-heparina da glicoproteína G e os glicosaminoglicanos da superfície da célula (MARTÍNEZ; MELERO, 2000). Ambas glicoproteínas (F e G) são capazes de ligar nos glicosaminoglicanos da célula hospedeira, mas a G contribui para a maioria das ligações virais (BOURGEOIS et al., 1998).

Após a entrada na célula, o genoma viral pode ser liberado no citoplasma como moléculas de ácido nucléico livre, quanto como complexos de ácido nucléico e proteínas. Para então começar o processo de desmontagem dos componentes virais, levando à replicação do genoma viral, com a formação de novas partículas virais. A liberação destas partículas recém-formadas da célula hospedeira pode ocorrer de diferentes formas. Vírus envelopados podem sair da célula por brotamento através da membrana plasmática ou pela fusão de vesículas secretoras contendo partículas virais com a membrana plasmática. Os vírus não envelopados são geralmente liberados por lise da membrana celular (MARSH; HELENIUS, 2006).

Bloquear a entrada do vírus é um mecanismo atrativo para terapias antivirais e, por esta razão, a maioria dos trabalhos de investigação tem sido dirigida para as funções das glicoproteínas de superfície F e G. A sua importância é realçada pela observação de que a imunidade humoral eficaz só é conferida por anticorpos para estas proteínas (HACKING; HULL, 2002).

Entrada do RSV é percebida pelo epitélio respiratório, sendo o primeiro local de encontro entre os vírus respiratórios e o hospedeiro. Como um resultado desta interação inicial, uma resposta imune inata é induzida cedo no local da infecção. Especificamente, os componentes do RSV são detectados por AECs em diferentes etapas da infecção, através de receptores de reconhecimento de padrão (PRRs). Dois principais PRRs são usados para detectar RNA viral e induzir citocinas, incluindo interferons (IFNs), e respostas antivirais. Estes receptores consistem de receptores Toll-like (TLRs) e receptores tipo gene induzido por ácido retinóico I (RIG-I); (RLR), sendo que ambos reconhecem múltiplas formas de RNA produzidos durante o ciclo de vida do vírus. Após a detecção de RNA viral, ambos os TLRs e RLRs iniciam cascatas de sinalização que convergem para a ativação nuclear e posterior ativação das três famílias de fatores de transcrição: NF- κ B, fatores reguladores de interferon (IRFs), e ATF-2 /cJun. Entre todos os TLRs, TLR3 é um dos mais abundantes, sendo expresso constitutivamente em AECs humanas (BAUM; GARCÍA-SASTRE, 2010; PICHLMAIR et al., 2006; SHA et al., 2004).

A infecção por RSV induz o RIG-I a produzir IFN- β , por meio de uma regulação positiva da expressão parácrina de TLR3 (ASENJO; RODRÍGUEZ; VILLANUEVA, 2005). TLR3 expresso por AECs contribui para o reconhecimento do VSR durante a infecção por ligação ao RNA viral gerado durante a replicação de VSR. Como consequência, a ativação de NF- κ B desencadeia a expressão de IFN de tipo I e a produção da quimiocina IL-8/CXCL8 (BUENO et al., 2011; RUDD et al., 2005).

Além disso, a sinalização via TLR3 é importante na resposta tardia contra a infecção pelo RSV, enquanto que RIG-I medeia a ativação de NF- κ B e IRF- 3 nas fases iniciais da infecção por VSR, induzindo a expressão de IFN- β , IP-10/CXCL10 (proteína indutora de interferon-gamma de 10kDa), RANTES/CCL5 (regulada sob ativação, expressa e secretada por células T normais), e ISG15 (gene estimulado por interferon 15). Juntos, estes resultados sublinham funções

temporais distintas para RIG-I e de TLR3 na mediação da imunidade inata induzida por RSV, o qual é acoplado a vias distintas que controlam a ativação de fatores de transcrição de IRF-3 e a NF- κ B. Assim, o acoplamento de receptores TLR e RIG-I levam ao início de uma resposta imune do hospedeiro, numa tentativa de controlar a infecção por RSV (BUENO et al., 2011).

No entanto, a infecção por RSV detectada em AECs, por RIG-I e TLR3, recentemente, tem sido mostrado por estar envolvida na produção da citocina linfopoietina estromal tímica (TSLP), a interleucina 7 (IL-7) derivada de células epiteliais, envolvida no desenvolvimento de reações alérgicas e asma (LEE et al., 2012; QIAO; LI; JIN, 2011). Este último indica que PRRs ativados por RSV podem induzir respostas imunes inapropriadas ao hospedeiro para limpar a infecção viral em AECs. Após a infecção de RSV, as alterações substanciais na expressão de TLR pode ser observada em AECs. A infecção por RSV é significativamente regulada por TLR 1 E 10, a replicação e transcrição viral são dependentes da indução do RNAm das AECs humanas (XIE et al., 2009).

O TLR4 tem sido sugerido como um mediador chave da hiperreatividade inflamatória induzida por RSV no pulmão infectado, já que a infecção com o vírus aumenta a expressão de TLR4, mas também afeta a localização da membrana de diferentes tipos de AECs humanas (MONICK et al., 2003).

A ligação de LPS para regular TLR4 (tendo em vista que o RSV aumenta a ligação de LPS no epitélio) ativa MAP quinase e a produção de citocinas inflamatórias, tais como IL-8 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), sugerindo que a infecção por RSV pode sensibilizar respostas epiteliais do pulmão para alguns agentes inflamatórios. Assim, o RSV pode alterar a expressão do TLR4 e modular a via de sinalização associada com este receptor para melhorar a expressão de moléculas pró-inflamatórias em AECs. TLR7 é capaz de reconhecer componentes derivados de vírus, parece controlar a remodelação AEC e hiper/metaplasia de células caliciformes para induzir a superprodução de muco. O papel deste receptor na secreção de citocinas e a modulação da patologia por RSV em AECs continua a ser determinado (LUKACS et al., 2010).

As alterações dos padrões de expressão dos TLR podem ser um processo importante que contribui para a patologia e evolução clínica de indivíduos infectados. Os TLRs ativam vias que negligenciam uma infecção viral em desenvolvimento. Assim, o VSR tem desenvolvido mecanismos moleculares

que suprimem a imunidade inata, sem afetar a resposta inflamatória do hospedeiro (SPANN et al., 2004).

1.4. MORTE CELULAR

Em 2009, *Nomenclature Comittee on Cell Death* (NCCD) propôs um conjunto de recomendações para a definição de morfologias distintas de morte celular e para o uso adequado de terminologia relacionada aos tipos de morte, incluindo apoptose, necrose e catástrofe mitótica. O NCCD propõe critérios unificados para a definição de morte celular e de suas diferentes morfologias, formulando várias advertências contra o uso indevido de palavras e conceitos que retardam o progresso na área de pesquisa morte celular (GALLUZZI et al., 2012).

1.4.1. APOPTOSE

Em 1964, foi proposto o termo "morte celular programada" para designar um tipo de morte celular que ocorre de forma não acidental. (LOCKSHIN; WILLIAMS, 1964). Em 1972, foi sugerido o termo apoptose para indicar esse tipo de morte celular (KERR; WYLLIE; CURRIE, 1972).

Apoptose, ou morte celular programada, é um processo essencial para a manutenção do desenvolvimento dos seres vivos, sendo importante para eliminar células supérfluas ou defeituosas. Organismos multicelulares são capazes de induzi-la como resposta a estímulos intracelulares ou extracelulares (HENGARTNER, 2000). Ocorrendo nas mais diversas situações, como organogênese, hematopoiese normal e patológica, na reposição fisiológica de certos tecidos maduros, na atrofia dos órgãos, na resposta inflamatória e na eliminação de células após dano celular por agentes genotóxicos (RANGANATH et al. 2001).

A demonstração de que a apoptose é um mecanismo inato de defesa antineoplásica e que vários agentes quimioterápicos agem através da indução desse tipo de morte celular levou a uma intensa investigação dos mecanismos moleculares da apoptose e sua aplicação no tratamento do câncer (NICHOLSON, 2000).

Podendo ser definida como um processo cuidadosamente regulado, ela é caracterizada por possuir uma morfologia específica e características bioquímicas. É iniciada por estímulos fisiológicos e patológicos (as células nem sempre responderão aos mesmos estímulos), e a sua expressão completa requer uma cascata de sinalização em que a ativação de caspases desempenham um papel central. (ELMORE, 2007; ZEISS, 2003)

Ela também ocorre como mecanismo de defesa nas reações imunes ou quando as células são danificadas por doenças ou agentes nocivos (NORBURY; HICKSON, 2001).

As características deste tipo de morte são o arredondamento celular, retração de pseudopodes, redução do volume celular (picnose; picnose é o resultado da condensação da cromatina e a maior característica da apoptose), condensação da cromatina, fragmentação nuclear e separação dos fragmentos celulares em corpos apoptóticos (*budding*), pouca ou nenhuma modificação ultraestrutural de organelas citoplasmáticas e formação de vesículas pela membrana plasmática. (ELMORE, 2007; NARDACCI et al., 2015).

Corpos apoptóticos consistem de citoplasma com organelas embaladas com ou sem um fragmento nuclear. A integridade da organela ainda é mantida e tudo ocorre dentro de uma membrana plasmática intacta. Esses corpos são fagocitados por macrófagos, células parenquimais ou células neoplásticas e degradadas com o fagolisossomo. (ELMORE, 2007)

Os mecanismos de apoptose são altamente complexos e sofisticados, que envolvem uma cascata dependente de energia de eventos moleculares. Pesquisas mostram que há duas principais vias apoptóticas: a via extrínseca ou morte e da via intrínseca ou mitocondrial. Existem evidências de que as duas vias estão ligadas e que moléculas de uma via pode influenciar a outra (IGNEY; KRAMMER, 2002).

As vias de sinalização extrínsecas que iniciam a apoptose envolvem interações mediadas pelo receptor transmembrana. Estes receptores de morte envolvem membros que são receptores de gene da superfamília do fator de necrose tumoral (TNF), estes receptores formam o domínio de morte (LOCKSLEY; KILLEEN; LENARDO, 2001). Este domínio desempenha um papel fundamental na transmissão do sinal de morte a partir da superfície da célula para as vias de sinalização intracelulares. Os ligantes e receptores mais bem

caracterizados incluem FasL/FasR, TNF- α /TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 e Apo2L/DR5, como podemos ver na figura 2 (ASHKENAZI, 1998; CHICHEPORTICHE et al., 1997; PETER; KRAMMER, 1998; RUBIO-MOSCARDO et al., 2005; SULIMAN et al., 2001).

A apoptose intrínseca envolve um conjunto diversificado de estímulos não mediados por receptores que produzem sinais intracelulares que atuam diretamente sobre os alvos dentro da célula e são acontecimentos mitocondriais. Os estímulos que iniciam essa via produzem sinais negativos que envolvem a ausência de certos fatores de crescimento, hormônios e citocinas, que pode levar à insuficiência de supressão de programas de morte, desencadeando a apoptose. Outros estímulos que atuam de forma positiva incluem, mas não estão limitados a radiação, toxinas, hipóxia, hipertermia, infecções virais, e os radicais livres (ELMORE, 2007).

Todos estes estímulos causam alterações na membrana mitocondrial interna, que resulta numa abertura da transição de permeabilidade mitocondrial (MPT), perda de potencial mitocondrial transmembranar e libertação de dois grupos principais de proteínas pró-apoptóticas normalmente isoladas do espaço intermembranar para o citosol (SAELENS et al., 2004). O primeiro grupo consiste de citocromo C, as proteases-serinas SMAC / DIABLO, e o HtrA2 / Omi (CAI; YANG; JONES, 1998; DU et al., 2000; GARRIDO et al., 2006; VAN LOO et al., 2002) Estas proteínas ativam a via mitocondrial dependente de caspase. O citocromo C liga-se e ativa Apaf-1, bem como pro-caspase-9, formando uma "apoptossomo", conduzindo a ativação da caspase-9 (Figura 2) (CHINNAIYAN, 1999; HILL et al., 2004). SMAC/DIABLO e HtrA2/Omi promovem a apoptose inibindo a atividade das proteínas inibidoras de apoptose (IAP)(SCHIMMER, 2004; VAN LOO et al., 2002).

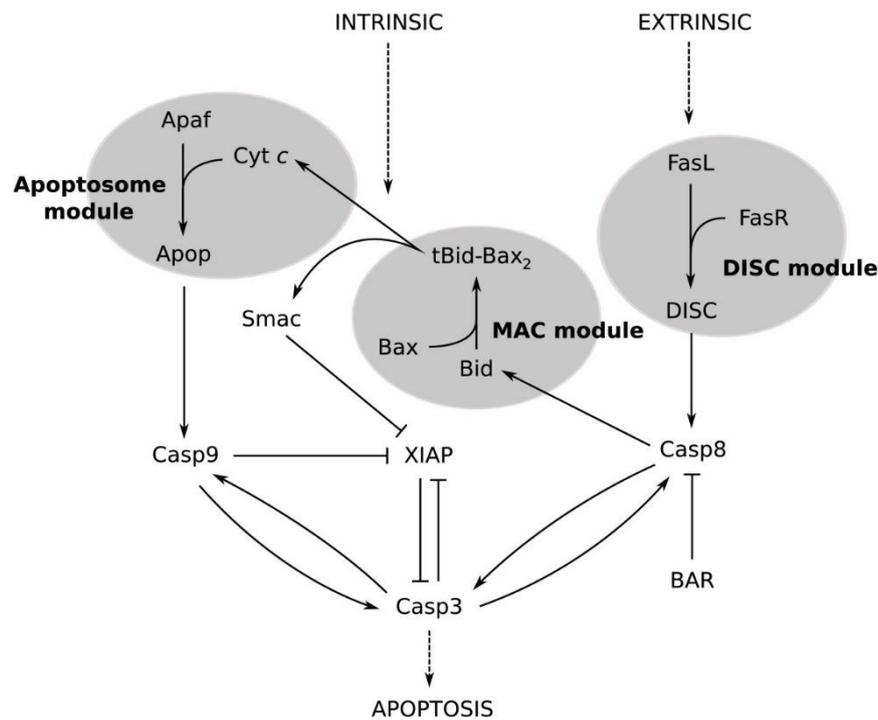


Figura 2: Vias que levam à ativação da caspase 3

Fonte: https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/4b/Extrinsic_and_intrinsic_pathways_to_caspase-3_activation.jpg

A apoptose, além de desempenhar um papel importante no controle de diversos processos vitais, está associado a inúmeras doenças, como o câncer. A compreensão dos mecanismos apoptóticos permitiu o desenvolvimento de novas estratégias no tratamento do câncer. Tais estratégias são embasadas na indução da morte nas células tumorais e em uma maior resposta aos tratamentos com radiação e agentes citotóxicos (NICHOLSON, 2000).

1.5. INFECÇÃO POR VSR E MORTE CELULAR PROGRAMADA

Infecção por vírus sincicial respiratório está associada com a morte celular epitelial e inflamação vigorosa. A morte apoptótica das células infectadas é um mecanismo para reduzir a replicação do vírus. A apoptose pode também ser um fator importante para aumentar a apresentação de antígenos e a resposta imune do hospedeiro. A infecção por VSR é fortemente regulada pela expressão do fator de necrose tumoral, *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) e o seus receptores de morte funcionais DR4 e DR5. As células infectadas com VSR

tornaram-se altamente sensíveis a apoptose induzida por TRAIL exógeno (SULIMAN et al., 2001).

Infecção pelo VSR também induziu vários fatores pró-apoptóticos da família Bcl-2 e caspases 3, 6, 7, 8, 9 e 10, representando tanto o receptor, quanto as vias de morte apoptóticas dependente da mitocôndria. RSV também mediava a forte indução de fatores anti-apoptóticos da família Bcl-2, especialmente de Mcl-1, que podem ser responsáveis pela indução de apoptose tardia em células infectadas com RSV na ausência da indução da via exógena TRAIL (SULIMAN et al., 2001).

In vitro, o VSR se mostrou capaz de induzir a expressão de várias proteínas nas células epiteliais, incluindo proteínas do RSV, como a proteína F, quando sua expressão é induzida desencadeia a apoptose, ICAM-1 e MHC classe I, que podem potencialmente interagir com as células T CD8+ para iniciar a apoptose da célula alvo. Um mecanismo de adesão da célula T –célula induzida à morte é a interação de FasL nos linfócitos T CD8+ e Fas expresso na célula alvo. A fim de determinar a capacidade do RSV induzir Fas no epitélio respiratório, estudou-se a infecção por VSR em uma linhagem de células epiteliais humanas (A549). RNAm de Fas e os níveis de proteína aumentam de duas a quatro vezes, após infecção por RSV. As células em apoptose sofreram várias alterações, incluindo fragmentação e degradação de DNA genômico, consistente com a ativação do fator de fragmentação de DNA ou DNAase ativada por caspases (DFF ou CAD) (BITKO; BARIK, 2001; ECKARDT-MICHEL et al., 2008; O'DONNELL; MILLIGAN; STARK, 1999).

1.6. OXIDAÇÃO REATIVA

A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do nosso metabolismo e, assim, os radicais livres são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica. No organismo, os radicais livres (ERO e ERN) encontram-se envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. No entanto, seu excesso apresenta efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação dos lipídios de membrana e agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas, carboidratos e DNA. O organismo humano sofre ação

constante de ERO e ERN geradas em processos inflamatórios, por alguma disfunção biológica ou provenientes dos alimentos.

ERO são capazes de danificar diversas estruturas celulares através de reações de oxidação, quando esta reação ocorre na membrana celular, a oxidação de lipídios interfere no transporte ativo/passivo normal através da membrana, podendo ocasionar a ruptura dessas, levando à morte celular. Dentre as diversas moléculas de ERO está o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), extremamente permeável, atravessa facilmente a membrana celular e nuclear reagindo com metais presentes na célula, gerando o radical hidroxila ($HO\cdot$) (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

2. JUSTIFICATIVA

O vírus sincicial respiratório é o mais prevalente agente etiológico viral de infecção aguda do trato respiratório (IATR) e a principal causa de hospitalização no mundo devido a doença respiratória, causando grande problema de saúde pública para sistemas de saúde, segundo a organização mundial de saúde (OMS) (MONTTO, 2002; ROBINSON, 2008).

O VSR é a principal causa de pneumonia e bronquiolite viral em todo o mundo, infectando mais do que 70% das crianças no primeiro ano de vida e 100% das crianças com menos de 2 anos de idade (BUENO et al, 2008; WHO, 2009).

Estudos têm sido feitos em busca de um tratamento melhor para as doenças causadas pelo vírus, mas vacinas seguras e eficazes contra RSV estão atualmente indisponíveis. Contudo, uma estratégia profilática com base em um anticorpo humanizado neutralizante contra VSR é amplamente utilizado em recém-nascidos de alto risco. Esta estratégia diminui a probabilidade de infecção em recém-nascidos expostos ao vírus. No entanto, esta abordagem é cara e inacessível para a maioria dos sistemas de saúde pública no mundo (VILLAGE, 1998).

Tendo em vista as diversas patogêneses causadas pelo VSR, um bom entendimento sobre os mecanismos de morte que as células afetadas utilizam é de extrema importância, já que assim é possível visar uma forma eficaz para o desenvolvimento de novas terapias que tenham um custo mais baixo e que possa estar acessível a todos.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL:

Caracterizar os mecanismos de morte celular utilizada pelas células epiteliais quando infectadas pelo vírus sincicial respiratório.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 3.2.1. Analisar a viabilidade celular nas células epiteliais infectadas com o VSR;
- 3.2.2. Buscar a via de morte utilizada pelas células epiteliais, quando as mesmas estão infectadas pelo VSR;
- 3.2.3. Verificar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pelas células epiteliais infectadas pelo VSR;
- 3.2.4. Analisar o efeito da inibição da produção de ROS por sobre a morte das células epiteliais infectadas por VSR.

4. CAPÍTULO 2: ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo Submetido: Scientia Medica

MECANISMOS DE MORTE UTILIZADOS PELAS CÉLULAS EPITELIAIS ALVEOLARES INFECTADAS COM O VIRUS SINCICIAL RESPIRATÓRIO

Gabriela Acevedo Ferreira¹, Stéfanie Primon Muraro¹, Natália Jaeger², Renato Tetelbom Stein³, Bárbara Nery Porto¹.

¹Laboratório de Imunologia Clínica e Experimental, Centro Infant, Instituto de Pesquisas Biomédicas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

²Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, Instituto de Pesquisas Biomédicas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

³Laboratório de Respirologia Pediátrica, Centro Infant, Instituto de Pesquisas Biomédicas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil

RESUMO

Objetivos: Caracterizar os mecanismos de morte celular utilizada pelas células epiteliais quando infectadas pelo vírus sincicial respiratório.

Métodos: O ensaio de MTT foi utilizado para determinar o efeito citotóxico do VSR em células epiteliais alveolares da linhagem A549, além de sua viabilidade quando infectadas. Utilizou-se Anexina X PI e caspase -3 para avaliar o tipo de morte celular. Foram analisadas a produção de ERO nas células infectadas e seu envolvimento com a morte celular.

Resultados: Células epiteliais alveolares quando infectadas com vírus inativado por ultravioleta, permanecem viáveis, já quando infectadas com o vírus ativo sofrem morte apoptótica, que é resultado da expressão de caspase 3 por estas células e não depende de espécies reativas de oxigênio, apesar de produzirem ERO induzidas pelo VSR.

Conclusão: Foi demonstrado que as células epiteliais alveolares quando infectadas pelo VSR recebem uma cascata de sinalizações que levam a morte por apoptose e o vírus necessita ser ativo para a entrada na célula hospedeira, esta morte acontece por meio da ativação da caspase 3 nas células, não sendo dependente da produção de espécies reativas de oxigênio.

INTRODUÇÃO

A infecção pelo vírus sincicial respiratório (VSR) é a principal causa de hospitalização infantil, bem como um grande problema de saúde e dos custos econômicos no mundo inteiro (MONTO, 2002; ROBINSON, 2008).

Devido à prevalência do VSR, quase todas as crianças já foram infectadas pelo vírus ao alcançarem os 2 anos de idade. Os maiores índices de infecção ocorrem no terceiro e quarto meses de vida. A maior parte das crianças abaixo dos 2 anos infectadas pelo VSR apresenta doença leve do trato respiratório superior; entretanto, algumas crianças estão sujeitas ao risco de infecção grave do trato respiratório inferior (ITRI), que exige hospitalização, oxigenoterapia, ventilação mecânica e pode levar à morte. Infelizmente, a infecção por RSV fornece uma proteção imune limitada à uma reinfeção, principalmente devido a memória imunológica insuficiente, o que conduz a uma resposta inflamatória exacerbada no trato respiratório promovendo dano nas vias aéreas durante a liberação do vírus (GARENNE; RONSMANS; CAMPBELL, 1992).

As células epiteliais alveolares são a primeira linha de defesa contra o vírus, sendo o local mais associado com a inflamação na doença. A entrada do vírus sincicial respiratório para as células epiteliais alveolares (CEAs) é um passo importante para o processo de infecção, envolvendo a ligação das proteínas G e F do VSR às moléculas ligadas na superfície da célula hospedeira (VAN DIEPEN et al., 2010).

A infecção por vírus sincicial respiratório está associada com a morte celular epitelial e inflamação vigorosa, a morte apoptótica das células infectadas é um mecanismo para reduzir a replicação do vírus (SULIMAN et al., 2001).

METODOLOGIA UTILIZADA

ASPECTOS ÉTICOS

Esse estudo foi revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) com o protocolo de número: CEP 821.858.

CULTURA DE CÉLULAS

Células epiteliais alveolares da linhagem A549 cresceram e foram mantidas em DMEM suplementado com 10% SFB e 0.1 mg/mL de gentamicina. Todas as células foram incubadas em 37°C, com 5% de CO₂ em uma estufa umidificada, tendo seu meio trocado a cada 48 horas.

CULTIVO DO VSR

Neste estudo, foi utilizada a cepa A do Vírus Sincicial Respiratório, doada pelo Dr. Fernando Polack (Fundación Infant, Argentina).

O VSR cresceu em células Hep-2. O vírus foi purificado a partir do sobrenadante das culturas de células e o título viral foi determinado por infecção de monocamadas de células HEp-2, seguido por um ensaio de placa com carboximetilcelulose (MILLER et al., 2003). As alíquotas de vírus foram armazenadas a -80 ° C.

INFECÇÃO DAS CÉLULAS EPITELIAIS A549

A infecção das células foi feita 24 horas após o plaqueamento das mesmas, as células foram lavadas com PBS 1X e infectadas com a concentração de 10^7 PFU/mL em DMEM sem soro, foram incubadas a 37°C e 5% de CO₂ por 2 horas, depois disso o meio foi trocado por DMEM 10% de SFB.

VIABILIDADE CELULAR

Para avaliar a viabilidade celular foi realizado o ensaio do 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Após retirar 100µL de meio de cada poço, 40µL de MTT foi adicionado a todos os poços da placa. Posteriormente a placa foi incubada a 37°C por 4 horas. Retirou-se o sobrenadante contendo MTT e foi adicionado dimetilsulfóxido (DMSO) para dissolver os cristais violetas formados pelo MTT. Depois de 5 minutos, foram obtidas as densidades ópticas das placas através de um leitor EZ Reader 400 (Biochrom), utilizando um comprimento de onda de 570nm. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

ENSAIO DE MORTE CELULAR

O ensaio de Anexina/PI foi feito seguindo o protocolo do fabricante (BD Bioscience). Foram feitos 3 grupos, controle (CN), triton X-100 (0,1%) e células infectadas (RSV 10^7 PFU/mL); as células foram plaqueadas (5×10^3 células/200µL) em placas de cultura de 96 poços, depois de 24 horas incubadas as células foram infectadas com o vírus (10^7 PFU/mL). Desde então as células permaneceram 96 horas incubadas, o tratamento com o triton foi feito 2 horas antes do ensaio. Foram medidos por citometria de fluxo usando FACSCanto II

(Becton Dickinson) com o software BD FACSDiva e analisado usando o FlowJo v 7.5.

ENSAIO DE ATIVAÇÃO DE CASPASE-3

O ensaio de *PE Active caspase-3 Apoptosis*, foi realizado seguindo o protocolo do fabricante (BD Pharmigem). Foram feitos 3 grupos controle (CN), cisplatina (CDDP) (LIBBS) e células infectadas (RSV 10^7 PFU/mL). As células foram plaqueadas (5×10^3 células/200 μ L) em placas de cultura de 96 poços, depois de 24 horas incubadas as células foram infectadas com o vírus (10^7 PFU/mL). Desde então as células permaneceram 96 horas incubadas, o tratamento com cisplatina foi feito 24 horas antes do ensaio. A atividade da caspase foi medida por citometria de fluxo usando FACSCanto II (Becton Dickinson) com o software BD FACSDiva e analisado usando o FlowJo v 7.5.

ENSAIO DE PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

A determinação de produção intracelular de ERO foi baseada na oxidação de CM-H₂DCFDA *5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester* (2,5 μ M) (Invitrogen) para obter um composto fluorescente intracelular. As células A549 (5×10^3 células/microtubo) foram infectadas com VSR (10^7 PFU/mL) durante 96 horas. Foram incubadas com 0.03% de H₂O₂ por 1 hora e CM-H₂DCFDA por mais 1 hora em 37°C e 5% CO₂. A produção de ROS citosólica foi avaliada por citometria de fluxo usando FACSCanto II (Becton Dickinson) com o software BD FACSDiva e analisado usando o FlowJo v 7.5.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados são apresentados como média \pm SEM. Os resultados foram analisados utilizando GraphPad Prism 5. As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram avaliados por análise de variância ANOVA com correção de Tukey ou com o teste t de Student. O nível de significância foi estabelecido em $P < 0,05$.

RESULTADOS

PROLIFERAÇÃO CELULAR DURANTE 96 HORAS

A curva de proliferação das células A549 foi feita para avaliar a melhor quantidade de células a ser posteriormente infectada com VSR pelo período de 96 horas. Pode-se observar que há uma diminuição na viabilidade celular na maior quantidade de células utilizada ($1 \times 10^4/200 \mu\text{L}$), os poços da placa de 96 estavam com o seu fundo completo por uma monocamada e muitas células já estavam soltas (Fig. 1). Assim, a quantidade de 5×10^3 células foi escolhida, pois não havia morte celular e a monocamada se mantinha completa até o final das 96 horas.

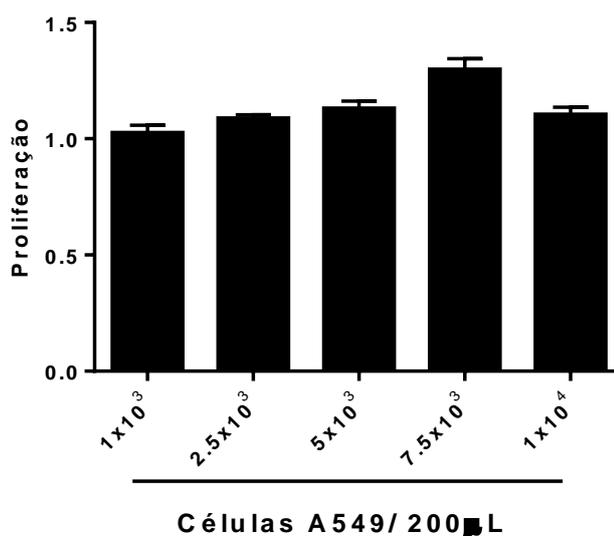


Figura 1: Proliferação das células epiteliais alveolares.

As células epiteliais alveolares (10^3 - 10^4 / mL) foram plaqueadas e incubadas por 96 horas a 37°C com 5% de CO_2 . Os dados são representativos de pelo menos 3 experimentos independentes realizados em triplicata e representam a média \pm SEM.

CURVA CONCENTRAÇÃO-RESPOSTA E CINÉTICA DA INFECÇÃO PELO VSR EM CÉLULAS A549

O ensaio MTT foi utilizado para determinar o efeito citotóxico do VSR em células epiteliais alveolares da linhagem A549. Para este experimento foram utilizados dois controles, no positivo foi utilizado 0,1% de Triton X-100 (Sigma) e no controle negativo as células eram mantidas em DMEM 10% sem nenhum tratamento. O ensaio foi feito em 24, 48, 72 e 96 horas para a análise do tempo em que as células sofreriam a morte. Nossos resultados mostram que o vírus começa a induzir a morte das células A549 na concentração de 5×10^5 PFU/mL, diminuindo a viabilidade para 75%. À medida em que a concentração do vírus aumenta, a viabilidade das células diminui, chegando a quase 25% na concentração de 1×10^7 PFU/mL (Fig. 2A).

Além da curva de concentração do vírus, uma cinética foi feita, para avaliar o melhor tempo para a morte celular e assim padronizar para todos os outros ensaios que seriam feitos posteriormente. Nossas análises mostram que o vírus (1×10^7 PFU/mL), a partir de 72 horas, induz uma diminuição brusca na viabilidade das células A549, para menos de 50%. Em 96 horas de infecção, a viabilidade das células cai para menos de 25% (Fig. 2B).

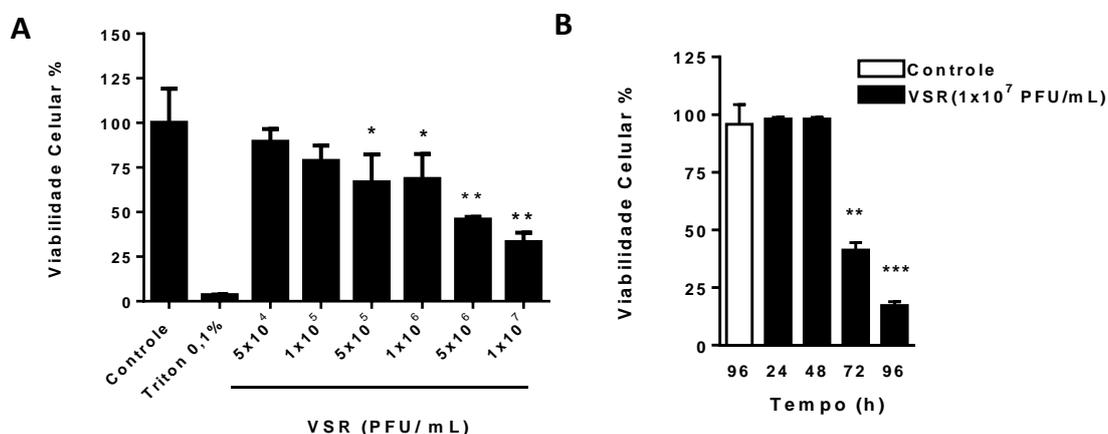


Figura 2: Curva dose-resposta das células epiteliais alveolares em 96 horas, cinética.

(A) As células epiteliais alveolares ($5 \times 10^3/\text{ml}$) foram infectadas com o VSR (10^4 - 10^7 UFP/ml), estimuladas com triton 0,1% ou deixadas sem estímulo durante 96 horas h a 37°C com 5% de CO_2 . (B) avaliando o melhor tempo para a morte celular foi feita a cinética, mostrando que nos tempos de 72 e 96 horas a morte celular é representativa. Os dados são representativos de pelo menos 3 experimentos independentes realizadas em triplicata e representam a média \pm SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $P < 0,001$ quando comparado com o controle negativo.

CÉLULAS EPITELIAIS ALVEOLARES INFECTADAS COM VÍRUS INATIVADO PERMANECEM VIÁVEIS

Utilizamos o ensaio de MTT para analisar se as células se manteriam vivas quando infectadas com o VSR inativado, comparando-as com as infectadas com o vírus ativo. A inativação pode ser feita de diversas formas, químicas e físicas, neste caso usamos a luz ultravioleta por 30 minutos.

O VSR na maior concentração testada (1×10^7 PFU/mL) foi capaz de diminuir a viabilidade das células A549 para 50% (Fig. 3). Por outro lado, o vírus inativado por UV não alterou a viabilidade das células (Fig. 3), indicando que uma replicação ativa do vírus é necessária para causar a morte das células.

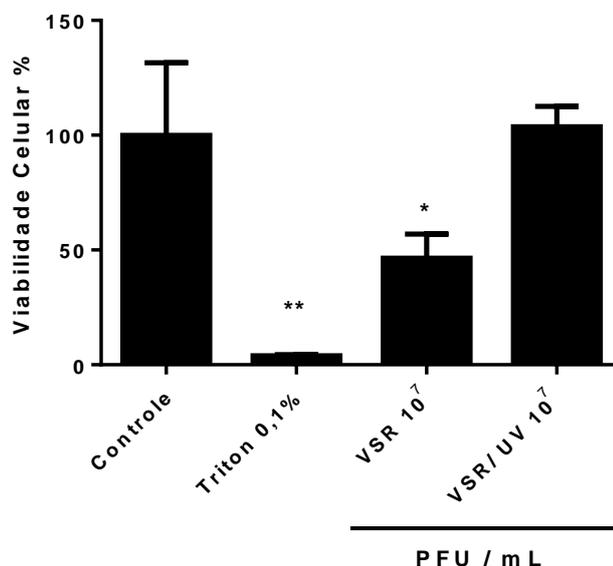


Figura 3: Células infectadas com RSV/UV permanecem viáveis

As células epiteliais alveolares ($5 \times 10^3/\text{ml}$) foram infectadas com o VSR (10^7 PFU/ml) ativo e inativado por UV (30 minutos), estimuladas com triton 0,1% ou deixadas sem estímulo por 96 h a 37°C com 5% de CO_2 . Os dados são representativos de pelo menos 3 experimentos independentes realizadas em triplicata e representam a média \pm SEM. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ comparando com o controle negativo.

CÉLULAS EPITELIAIS ALVEOLARES INFECTADAS SOFREM MORTE APOPTÓTICA

Para avaliar o tipo de morte induzida pelo VSR em células A549, nós fizemos o ensaio de ligação à anexina V e marcação com iodeto de propídio (PI). Em células apoptóticas, a fosfatidilserina é deslocada da parte interna para a parte externa da membrana plasmática, onde pode ser detectada pelos conjugados de anexina V (MARTIN et al., 1995).

Após 96 horas de infecção, apenas 13.2% das células não infectadas entraram em apoptose, enquanto que as células infectadas por RSV estavam apoptóticas, em fase inicial 94.7% (Fig 4A, B). Com este ensaio foi possível demonstrar que existia morte nas células infectadas e que elas utilizavam a via apoptótica, já que o ensaio mostrou que apenas 0,005 % das células infectadas morriam por necrose, no grupo controle somente 0.05 % (Fig 4C).

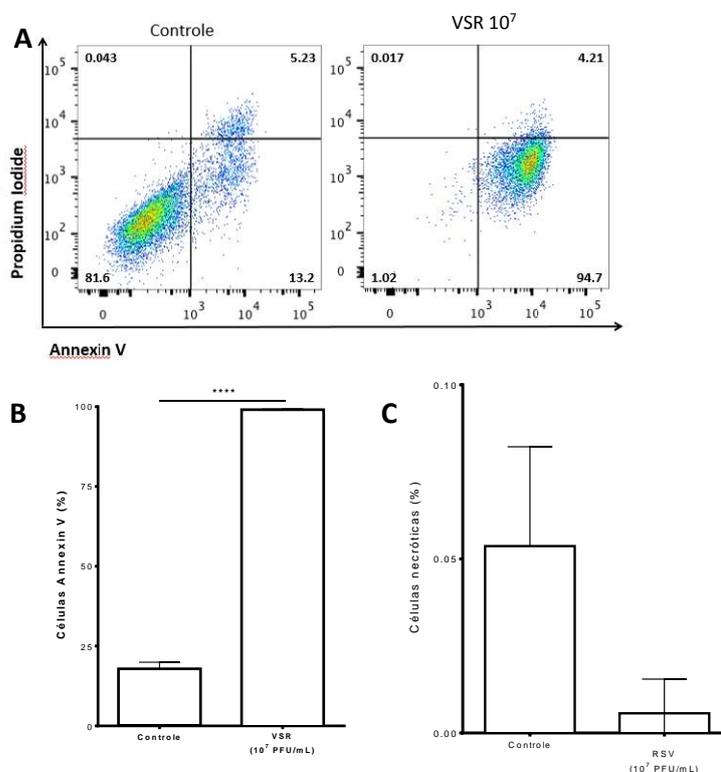


Figura 4: Células epiteliais alveolares infectadas pelo VSR sofrem apoptose.

(A) As células epiteliais alveolares (5×10^3 / ml), foram infectadas com o VSR (10^7) e 94 horas depois foram tratadas com triton (0,1%), e mantidas a 37°C com 5% de CO_2 , 2 horas depois a atividade de Annexina V e PI foram medidas por citometria de fluxo. Plot mostrando que células

controle e infectadas estão sofrendo apoptose. (B) As células infectadas são marcadas com por Annexina, diferentemente das células controle. (C) As células de ambos grupos, tem uma porcentagem mínima de células que sofrem morte necrótica. Os dados são representativos de pelo menos 2 experimentos independentes realizadas em triplicata e representam a média \pm SEM. **** $p < 0,0001$ comparando com o controle negativo.

CÉLULAS EPITELIAIS ALVEOLARES INFECTADAS COM VSR EXPRESSAM CASPASE-3

Este ensaio foi feito para analisar a via de morte utilizada pelas células epiteliais quando infectadas pelo VSR. As células A549 foram infectadas com vírus na maior concentração (1×10^7 PFU/mL) por um período de 96 horas.

A Fig. 5A mostra os *plots* de citometria, onde selecionamos as células por seu tamanho e granulosidade, para ver a porcentagem de células viáveis. Como controle positivo, as células foram estimuladas com cisplatina (CDDP), um agente quimioterápico conhecido por induzir apoptose nesta linhagem celular [8]. Na Fig. 5B, está representada a porcentagem de células viáveis em cada grupo, mostrando que as células infectadas pelo vírus tiveram 75% de morte. A infecção por VSR induziu a expressão de caspase-3 em 95% das células A549, enquanto que a CDDP induziu a expressão em 47%, e no controle negativo (apenas meio de cultura), apenas 9% das células foram positivas para caspase-3 (Fig. 5C). Esses dados mostram que o VSR induz a morte por apoptose através da expressão de caspase-3 nas células A549.

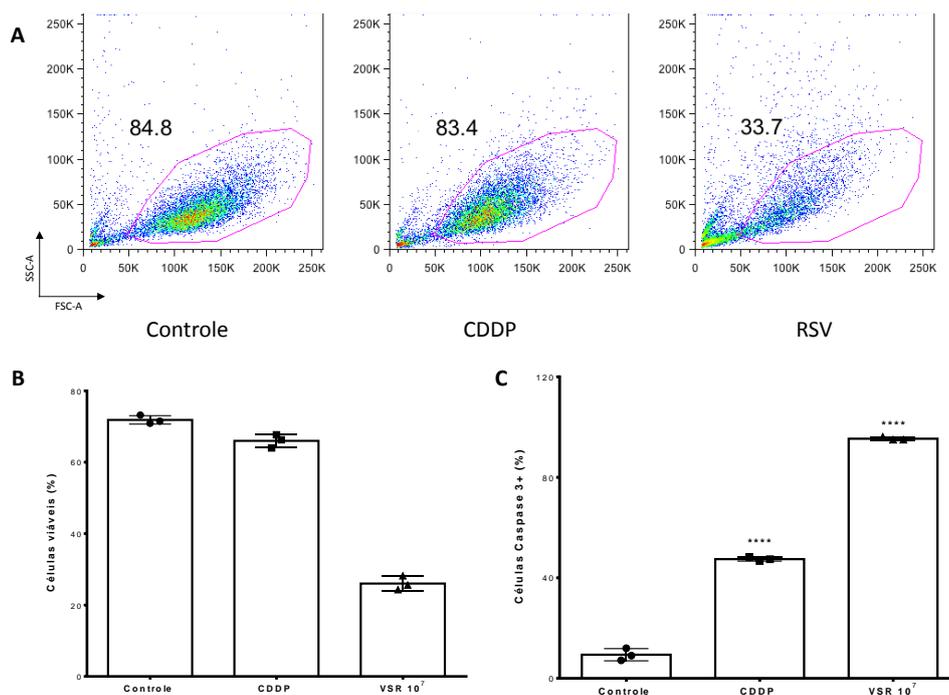


Figura 5: Células epiteliais alveolares infectadas com VSR expressam caspase-3.

As células epiteliais alveolares (5×10^3 /mL), foram infectadas com o VSR (10^7 PFU/mL) e 72 horas depois foram tratadas com cisplatina ($20\mu\text{M}$), e mantidas a 37°C com 5% de CO_2 24 horas depois a atividade da caspase foi medida por citometria de fluxo usando FACSCanto II. (A) *Plots* representando a porcentagem de células viáveis nos grupos controle, cisplatina (CDDP) e VSR. (B) Gráfico representando a porcentagem de células viáveis nos grupos controle, cisplatina (CDDP) e VSR. (C) Mostrando que as células expressam caspase-3. Os dados são representativos de pelo menos 2 experimentos independentes realizadas em triplicata e representam a média \pm SEM. **** $p < 0,0001$ comparando com o controle negativo.

O VSR INDUZ A PRODUÇÃO DE ERO PELAS CÉLULAS EPITELIAIS ALVEOLARES

Este ensaio foi feito para analisar a se há produção ou não de ERO em células infectadas pelo VSR. As células A549 foram infectadas com vírus na maior concentração (1×10^7 PFU/mL) por 2, 4, 8, 12, 24, 48, 72 e 96 horas.

Foi observado que o VSR induziu a geração de ERO em células A549 quando incubadas com o vírus em 2, 4, 8 e 12 horas, sendo este aumento significativo nos tempos de 2 e 12 horas. Verificamos que este efeito foi diminuindo ao longo dos tempos testados.

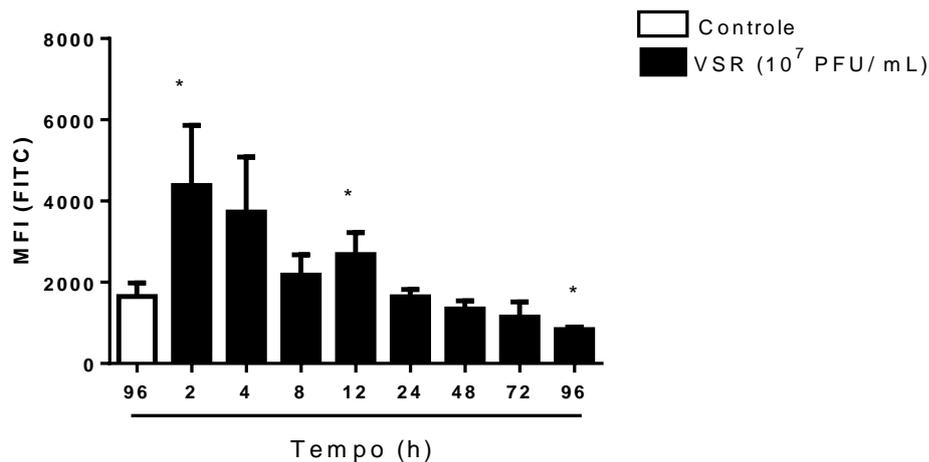


Figura 6: produção de ERO pelas células epiteliais alveolares.

As células epiteliais alveolares (5×10^3), foram infectadas com o VSR (10^7 PFU/ mL), estimuladas com peróxido de hidrogênio e incubadas com CM-H2DCFDA e analisadas em 2,4,8,12,24,48,72 e 96 pós infecção. A produção de ERO foi medida por citometria de fluxo usando FACSCanto II. Os dados são representativos de pelo menos 2 experimentos independentes realizadas em triplicata e representam a média \pm SEM. * $p < 0,05$ comparando com o controle negativo.

MORTE INDUZIDA PELO VÍRUS É INDEPENDENTE DE ERO

Para caracterizar o envolvimento de ERO na morte celular induzida pelo vírus, as células foram tratadas com inibidores de ERO, NAC, DPI e Apocinina.

As células A549 foram pré-tratadas por uma hora com os inibidores e depois infectadas com vírus na maior concentração (1×10^7 PFU/mL) por um período de 72 horas, incubadas a 37°C e 5% de CO_2 . O ensaio de viabilidade celular mostrou que a inibição de ERO diminui a viabilidade, quando somada a infecção pelo VSR levam a morte celular, quando comparadas com as células que apenas receberam o tratamento. Com exceção do tratamento com DPI, onde o tratamento levou a morte celular.

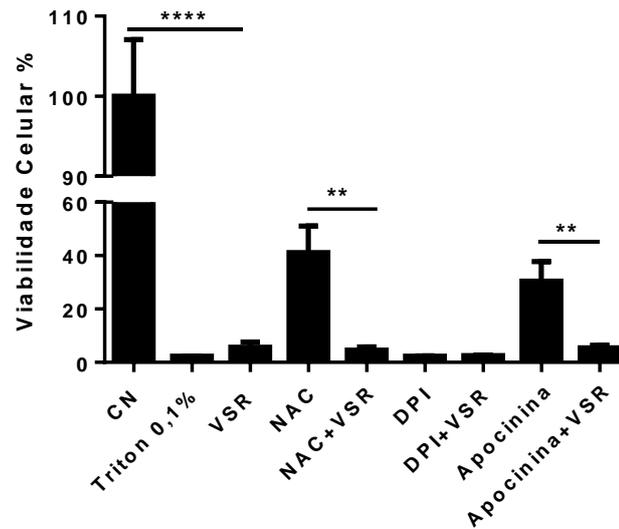


Figura 7: A morte celular induzida pelo VSR não depende de ERO

As células epiteliais alveolares ($5 \times 10^3/\text{ml}$) foram pré-tratadas e infectadas com o VSR (10^7 PFU/ml), estimuladas com triton 0,1% ou deixadas sem estímulo por 72 h a 37°C com 5% de CO_2 . Os dados são representativos de pelo menos 2 experimentos independentes realizadas em triplicata e representam a média \pm SEM. ** $p < 0,01$ **** $p < 0,0001$ comparando com o controle negativo.

DISCUSSÃO

Neste estudo, foram avaliados os mecanismos envolvidos na morte celular induzida pela infecção com o vírus sincicial respiratório. A infecção das células epiteliais alveolares com o VSR ativo levou a morte destas células pela via apoptótica, via esta que é dependente da expressão de caspase-3, estas células não apresentaram dependência da produção de espécies reativas de oxigênio.

Nossos resultados corroboram com muitos estudos feitos, envolvendo a infecção de células epiteliais alveolares, diferentemente de alguns estudos, nós utilizamos a linhagem A549 que já foi descrita como um bom modelo de células epiteliais. Além disso mostramos resultados em 96 horas, a maioria dos estudos têm seus resultados até 72 horas.

Em células A549, mudanças significativas não são observadas nas primeiras 24 horas pós infecção, mas a formação de sincícios pelo VSR, começa a partir das 48 horas pós infecção, quando comparadas com outras células (NHBE E SAEC) as A549 são menos sensíveis à infecção pelo VSR. Elas exibiram um aumento na formação de sincícios quando comparadas com as células primárias (KOTELKIN et al., 2003).

No entanto recentemente um novo modelo *ex vivo/in vitro* de infecção por VSR foi descrito, utilizando células epiteliais brônquicas primárias pediátricas diferenciadas (WD-PBMC), tendo características fisiológicas, representando um bom modelo para se estudar as interações do trato respiratório com o VSR (LAY et al., 2013; VILLENAVE et al., 2012).

Já foi mostrado que resultados observados em cultura celular são consistentes com as observações histopatológicas de casos graves e fatais de

VSR. Mostrando características similares na patogênese causada por infecção pelo VSR em células epiteliais alveolares nos modelos *in vivo* e *ex vivo/in vitro*. (VILLENAVE et al., 2012).

No entanto, um efeito citopático diferente em linhagens celulares, raramente era visto em WD-PBECs infectadas com VSR BT2a ou A2, indicando que as células cultivadas em monocamadas, derivadas de tumores não refletem bem o que é visto em células normais (LAY et al., 2013).

De acordo com estudos já publicados foi observado a diferença existente entre o número de células viáveis quando infectadas com vírus ativo e inativado, o grupo infectado com VSR inativado por UV permanece com suas células viáveis, já as células infectadas com o vírus ativo têm grande porcentagem de morte (KOTELKIN et al., 2003).

Foi mostrado que o vírus inativado não é capaz de infectar as células epiteliais, já que no processo de inativação por luz ultravioleta acaba mudando sua conformação, isso prejudica a entrada do vírus, pois moléculas de superfície são perdidas e interfere na fase de adsorção da célula, onde não ocorre a ligação (SEITZ et al., 2002).

Estudos mostraram que a exposição da célula ao vírus ativo é importante para a produção de proteínas envolvidas na atividade apoptótica e regulação de Fas. Quando expostas ao vírus inativado, têm um resultado parecido ao do controle, onde não há aumento, nem produção dessas proteínas (O'DONNELL; MILLIGAN; STARK, 1999).

Infecção por vírus sincicial respiratório está associada com a morte celular epitelial e inflamação vigorosa, a morte apoptótica das células infectadas é um mecanismo para reduzir a replicação do vírus. A apoptose pode também ser um

fator importante para aumentar a apresentação de antígenos e a resposta imune do hospedeiro (SULIMAN et al., 2001).

Como foi mostrado neste estudo, as células epiteliais infectadas pelo VSR, tem uma morte celular programa: pela via da apoptose. A apoptose é processo biológico fundamental pelo qual as células, planejam sua própria auto-destruição (GRIVICICH IVANA , REGNER ANDRÉA, 2007).

Nós mostramos através do ensaio de caspase 3, onde a grande parte das células infectadas expressavam essa proteína. E outras vias de morte foram excluídas com o ensaio de annexina e PI que demonstrou que as células sofriam uma apoptose inicial e uma pequena porcentagem sofria a morte por necrose. Isto sugere que a ativação de mecanismos apoptóticos pode ser crítica para limpar células epiteliais infectadas com VSR quando as respostas de células T citotóxicas estão ausentes (WELLIVER et al., 2007).

Já foi reportado que as células epiteliais sofrem morte celular programada após a infecção com RSV. Para reafirmar o resultado visto no ensaio de caspase-3, realizamos o ensaio de Annexina e PI, para confirmar a morte apoptótica e excluir as demais vias de morte (BITKO; BARIK, 2001; LAY et al., 2013; VILLENAVE et al., 2012).

As próprias células são capazes de induzir a morte celular programada como resposta a estímulos intracelulares ou extracelulares. Essa morte pode ocorrer de diversas formas: apoptose, autofagia, necrose, mitose catastrófica e senescência (CASTEDO et al., 2004; GRIVICICH IVANA , REGNER ANDRÉA, 2007).

Corroborando com o nosso resultado, Lay et al. 2013 já mostrou que as células epiteliais alveolares quando infectadas com o vírus sincicial respiratório,

expressam a caspase-3. A coloração para a caspase 3 em tecidos de indivíduos com casos fatais de bronquiolite, foi mostrado por Welliver et al como um marcador para apoptose. Na infecção por VSR, caspase 3 e o antígeno viral foram detectados em células epiteliais brônquicas, sugerindo a ativação da morte por apoptose (LAY et al., 2013; WELLIVER et al., 2007).

As caspases sinalizam para a apoptose e clivam esses substratos levando à condensação e fragmentação nuclear, externalização de fosfolípidios de membrana que irão sinalizar para estas células serem fagocitadas por macrófagos. São conhecidas 14 caspases humanas, sendo que seis (caspases -3, -6, -7, -8, -9, -10) participam da apoptose (BOATRIGT et al., 2003; NICHOLSON, 2000).

Níveis altos de ERO levam as células A549 a autofagia; pois pode levar a danos significativos no DNA e várias respostas celulares, incluindo a paragem do ciclo celular, senescência e apoptose. Com a relação entre os níveis de ERO e morte celular, fizemos este ensaio para verificar se a morte causada pelo vírus era dependente ou não da produção de espécies reativas de oxigênio (CHEN et al., 2015).

ERO são capazes de danificar diversas estruturas celulares através de reações de oxidação, quando esta reação ocorre na membrana celular, a oxidação de lipídios interfere no transporte ativo/passivo normal através da membrana, podendo ocasionar a ruptura dessa, levando à morte celular. Dentre as diversas moléculas de ERO está o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), extremamente permeável, atravessa facilmente a membrana celular e nuclear reagindo com metais presentes na célula, gerando o radical hidroxila ($HO\cdot$) (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

As células epiteliais alveolares foram capazes de produzir espécies reativas de oxigênio, quando infectadas com o vírus ativo, entretanto a morte celular induzida pelo VSR não é dependente, visto que houve morte nas células que foram tratadas com inibidores das vias de produção de ERO.

Estudos anteriores observaram que ERO pode facilitar ou até mesmo *promover a replicação de muitos vírus. Infecções com os vírus da hepatite B* crônica e da hepatite C estão associadas ao aumento da produção de ERO no fígado. A produção de ERO interfere nos processos e sinalizações celulares, como a proliferação e apoptose, podendo atuar com o um segundo mensageiro destas vias. Portanto, mais estudos são necessários para verificar se a produção de ERO no início da infecção por VSR está diretamente ligada a apoptose celular verificada a partir de 24 horas (LIOU; STORZ, 2010; WARIS; AHSAN, 2006).

Em conclusão, este estudo demonstra que as células epiteliais alveolares quando infectadas pelo VSR recebem uma cascata de sinalizações que levam a morte por apoptose e o vírus necessita ser ativo para a entrada na célula hospedeira, esta morte acontece por meio da ativação da caspase 3 nas células, não sendo dependente da produção de espécies reativas de oxigênio.

REFERÊNCIAS

- ASENJO, A.; RODRÍGUEZ, L.; VILLANUEVA, N. Determination of phosphorylated residues from human respiratory syncytial virus P protein that are dynamically dephosphorylated by cellular phosphatases: A possible role for serine 54. **Journal of General Virology**, v. 86, n. 4, p. 1109–1120, 2005.
- ASHKENAZI, A. Death Receptors: Signaling and Modulation. **Science**, v. 281, n. 5381, p. 1305–1308, 1998.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quimica Nova**, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.
- BAUM, A.; GARCÍA-SASTRE, A. Induction of type I interferon by RNA viruses: cellular receptors and their substrates. **Amino Acids**, v. 38, n. 5, p. 1283–1299, 2010.
- BITKO, V.; BARIK, S. An endoplasmic reticulum-specific stress-activated caspase (caspase-12) is implicated in the apoptosis of A549 epithelial cells by respiratory syncytial virus. **Journal of cellular biochemistry**, v. 80, n. 3, p. 441–54, 2001.
- BOATRIGT, K. M. et al. A Unified Model for Apical Caspase Activation. v. 11, p. 529–541, 2003.
- BOURGEOIS, C. et al. Heparin-like structures on respiratory syncytial virus are involved in its infectivity in vitro. **Journal of virology**, v. 72, n. 9, p. 7221–7227, 1998.
- BRICKS, L. F. Review Prevention of Respiratory Syncytial Virus. **Most**, v. 56, n. 3, p. 79–90, 2001.

BUENO, S. M. et al. Host immunity during RSV pathogenesis. **International immunopharmacology**, v. 8, n. 10, p. 1320–9, 2008.

BUENO, S. M. et al. Local cytokine response upon respiratory syncytial virus infection. **Immunology Letters**, v. 136, n. 2, p. 122–129, 2011.

CAI, J.; YANG, J.; JONES, D. Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics**, v. 1366, n. 1–2, p. 139–149, 1998.

CASTEDO, M. et al. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. **Oncogene**, v. 23, n. 16, p. 2825–2837, 2004.

CHANG, J. Current progress on development of respiratory syncytial virus vaccine. **BMB Reports**, v. 44, n. 4, p. 232–237, 2011.

CHANOCK, R. M. et al. Acute respiratory diseases of viral etiology. IV. Respiratory syncytial virus. **American journal of public health and the nation's health**, v. 52, n. 6, p. 918–25, 1962.

CHEN, N. et al. ROS/Autophagy/Nrf2 Pathway Mediated Low-Dose Radiation Induced Radio-Resistance in Human Lung Adenocarcinoma A549 Cell. **International Journal of Biological Sciences**, v. 11, n. 7, p. 833–844, 2015.

CHICHEPORTICHE, Y. et al. TWEAK, a new secreted ligand in the tumor necrosis factor family that weakly induces apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 51, p. 32401–32410, 1997.

CHINNAIYAN, A M. The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. **Neoplasia (New York, N.Y.)**, v. 1, n. 1, p. 5–15, 1999.

COLLINS, P. L. Progress in understanding and controlling respiratory syncytial virus: still crazy after all these years. **Virus Resp.**, v. 162, p. 80–99, 2011.

COLLINS, P. L.; GRAHAM, B. S. Viral and Host Factors in Human Respiratory

Syncytial Virus Pathogenesis. **Journal of Virology**, v. 82, n. 5, p. 2040–2055, 2008.

COWTON, V. M.; MCGIVERN, D. R.; FEARN, R. Unravelling the complexities of respiratory syncytial virus RNA synthesis. **The Journal of general virology**, v. 87, n. Pt 7, p. 1805–21, 2006.

DU, C. et al. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. **Cell**, v. 102, n. 1, p. 33–42, 2000.

ECKARDT-MICHEL, J. et al. The fusion protein of respiratory syncytial virus triggers p53-dependent apoptosis. **Journal of virology**, v. 82, n. 7, p. 3236–3249, 2008.

ELMORE, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. **Toxicol Pathology**, v. 35, n. 4, p. 495–516, 2007.

EMPEY, K. M.; JR., R. S. P.; KOLLS, J. K. Pharmacologic Advances in the Treatment and Prevention of Respiratory Syncytial Virus. **Clinical Infect Diases**, v. 50, n. 9, p. 1258–1267, 2010.

GALLUZZI, L. et al. Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. **Cell Death and Differentiation**, v. 19, n. 1, p. 107–120, 2012.

GARENNE, M.; RONSMANS, C.; CAMPBELL, H. The magnitude of mortality from acute respiratory infections in children under 5 years in developing countries. **World Health Stat Q**, v. 45, n. 2–3, p. 180–191, 1992.

GARRIDO, C. et al. Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. **Cell Death and Differentiation**, v. 13, n. 9, p. 1423–1433, 2006.

GRIVICICH IVANA , REGNER ANDRÉA, B. DA R. A. Morte Celular por

Apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 335–343, 2007.

HACKING, D.; HULL, J. Respiratory syncytial virus - Viral biology and the host response. **Journal of Infection**, v. 45, n. 1, p. 18–24, 2002.

HARRIS, J.; WERLING, D. Binding and entry of respiratory syncytial virus into host cells and initiation of the innate immune response. **Cellular Microbiology**, v. 5, n. 10, p. 671–680, 2003.

HENGARTNER, M. O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 770–6, 2000.

HILL, M. M. et al. Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. **The EMBO journal**, v. 23, n. 10, p. 2134–2145, 2004.

IGNEY, F. H.; KRAMMER, P. H. Death and Anti-Death: Tumour Resistance To Apoptosis. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 4, p. 277–288, 2002.

KERR, J. F.; WYLLIE, A. H.; CURRIE, A. R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **British journal of cancer**, v. 26, n. 4, p. 239–57, 1972.

KOTELKIN, A. et al. Respiratory Syncytial Virus Infection Sensitizes Cells to Apoptosis Mediated by Tumor Necrosis Factor-Related Apoptosis-Inducing Ligand. **Culture**, v. 77, n. 17, p. 9156–9172, 2003.

LAY, M. K. et al. Advances in understanding respiratory syncytial virus infection in airway epithelial cells and consequential effects on the immune response. **Microbes Infect**, v. 15, n. 3, p. 230–242, 2013.

LEE, H.-C. et al. Thymic stromal lymphopoietin is induced by respiratory syncytial virus–infected airway epithelial cells and promotes a type 2 response to infection. v. 18, n. 9, p. 1187–1196, 2012.

- LIOU, G.-Y.; STORZ, P. Reactive oxygen species in cancer. **Free Radic Res**, v. 44, n. 5, 2010.
- LOCKSHIN, R. A.; WILLIAMS, C. M. Programmed cell death—II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkmoths. **Journal of Insect Physiology**, v. 10, p. 643–649, 1964.
- LOCKSLEY, R. M.; KILLEEN, N.; LENARDO, M. J. The TNF and TNF receptor superfamilies: Integrating mammalian biology. **Cell**, v. 104, n. 4, p. 487–501, 2001.
- LUKACS, N. W. et al. Respiratory virus-induced TLR7 activation controls IL-17-associated increased mucus via IL-23 regulation. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 185, n. 4, p. 2231–9, 2010.
- MARSH, M.; HELENIUS, A. Virus entry: Open sesame. **Cell**, v. 124, n. 4, p. 729–740, 2006.
- MARTIN, S. J. et al. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. **The Journal of experimental medicine**, v. 182, n. 5, p. 1545–1556, 1995.
- MARTÍNEZ, I.; MELERO, J. A. Binding of human respiratory syncytial virus to cells : implication of sulfated cell surface proteoglycans. **J Gen.Virol.**, v. 81, n. Pt 11, p. 2715–2722, 2000.
- MILLER, A. L. et al. CXCR2 regulates respiratory syncytial virus-induced airway hyperreactivity and mucus overproduction. **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 6, p. 3348–3356, 2003.
- MOGHADDAM, A. et al. A potential molecular mechanism for hypersensitivity caused by formalin-inactivated vaccines. **Nature Medicine**, v. 12, n. 8, p. 905–

907, 2006.

MONICK, M. M. et al. Respiratory Syncytial Virus Up-regulates TLR4 and Sensitizes Airway Epithelial Cells to Endotoxin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 52, p. 53035–53044, 2003.

MONTO, A. S. Epidemiology of viral respiratory infections. **The American journal of medicine**, v. 112 Suppl, p. 4S–12S, 2002.

NARDACCI, R. et al. Syncytial apoptosis signaling network induced by the HIV-1 envelope glycoprotein complex: an overview. **Cell Death and Disease**, v. 6, n. 8, p. e1846, 2015.

NICHOLSON, D. W. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 810–816, 2000.

NORBURY, C. J.; HICKSON, I. D. Cellular Responses to DNA Damage. **Pharmacol. Toxicol.**, v. 41, p. 367–401, 2001.

O'DONNELL, D. R.; MILLIGAN, L.; STARK, J. M. Induction of CD95 (Fas) and apoptosis in respiratory epithelial cell cultures following respiratory syncytial virus infection. **Virology**, v. 257, n. 1, p. 198–207, 1999.

OGRA, P. L. Respiratory syncytial virus: the virus, the disease and the immune response. **Paediatric respiratory reviews**, v. 5 Suppl A, p. S119-26, 2004.

OLSZEWSKA, W.; OPENSHAW, P. Emerging drugs for respiratory syncytial virus infection. v. 14, n. 2, p. 207–217, 2009.

OPENSHAW, P. J.; TREGONING, J. S. Immune responses and disease enhancement during respiratory syncytial virus infection. **Clinical microbiology reviews**, v. 18, n. 3, p. 541–555, 2005.

PETER, M. E.; KRAMMER, P. H. Mechanisms of CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis. **Current Opinion in Immunology**, v. 10, n. 5, p. 545–551, 1998.

PICHLMAIR, A. et al. RIG-I-Mediated Antiviral Responses to Single-Stranded RNA Bearing 5'-Phosphates. **Science**, v. 314, n. 5801, p. 997–1001, 2006.

QIAO, J.; LI, A.; JIN, X. TSLP from RSV-stimulated rat airway epithelial cells activates myeloid dendritic cells. **Immunology and cell biology**, v. 89, n. 2, p. 231–8, 2011.

ROBINSON, R. F. Impact of respiratory syncytial virus in the United States. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 65, n. 23_Supplement_8, p. S3–S6, 2008.

RUBIO-MOSCARDO, F. et al. Characterization of 8p21.3 chromosomal deletions in B-cell lymphoma: TRAIL-R1 and TRAIL-R2 as candidate dosage-dependent tumor suppressor genes. **Blood**, v. 106, n. 9, p. 3214–22, 2005.

RUDD, B. D. et al. Differential Role for TLR3 in Respiratory Syncytial Virus-Induced Chemokine Expression Differential Role for TLR3 in Respiratory Syncytial Virus-Induced Chemokine Expression. **Society**, v. 79, n. 6, p. 3350–3357, 2005.

SAELENS, X. et al. Toxic proteins released from mitochondria in cell death. **Oncogene**, v. 23, n. 16, p. 2861–2874, 2004.

SCHIMMER, A. D. Inhibitor of Apoptosis Proteins: Translating Basic Knowledge into Clinical Practice. **Cancer Research**, v. 64, n. 20, p. 7183–7190, 2004.

SEITZ, H. et al. Comparable virus inactivation by bovine or vegetable derived Tween 80 during solvent/detergent treatment. **Biologicals**, v. 30, n. 3, p. 197–205, 2002.

SHA, Q. et al. Activation of airway epithelial cells by toll-like receptor agonists. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology**, v. 31, n. 3, p. 358–364, 2004.

SPANN, K. M. et al. Suppression of the induction of alpha, beta, and lambda interferons by the NS1 and NS2 proteins of human respiratory syncytial virus in human epithelial cells and macrophages [corrected]. **Journal of virology**, v. 78, n. 8, p. 4363–9, 2004.

STEIN, R. T. Early-life viral bronchiolitis in the causal pathway of childhood asthma: is the evidence there yet? **Am J Respir Crit Care Med**, v. 178, n. 11, p. 1097–1098, 2008.

SULIMAN, A et al. Intracellular mechanisms of TRAIL: apoptosis through mitochondrial-dependent and -independent pathways. **Oncogene**, v. 20, p. 2122–2133, 2001.

VAN DIEPEN, A. et al. Quantitative proteome profiling of respiratory virus-infected lung epithelial cells. **Journal of Proteomics**, v. 73, n. 9, p. 1680–1693, 2010.

VAN LOO, G. et al. The serine protease Omi/HtrA2 is released from mitochondria during apoptosis. Omi interacts with caspase-inhibitor XIAP and induces enhanced caspase activity. **Cell death and differentiation**, v. 9, n. 1, p. 20–26, 2002.

VILLAGE, E. G. Palivizumab, a humanized respiratory syncytial virus monoclonal antibody, reduces hospitalization from respiratory syncytial virus infection in high-risk infants. The IMPact-RSV Study Group. **Pediatrics**, v. 102, n. 3 Pt 1, p. 531–537, 1998.

VILLENAVE, R. et al. In vitro modeling of respiratory syncytial virus infection of pediatric bronchial epithelium, the primary target of infection in vivo.

Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 109, n. 13, p. 5040–5045, 2012.

WANG, G. et al. The effect of caffeine on cisplatin-induced apoptosis of lung cancer cells. **Experimental Hematology & Oncology**, v. 4, n. 1, p. 5, 2015.

WARIS, G.; AHSAN, H. Reactive oxygen species: role in the development of cancer and various chronic conditions. **Journal of Carcinogenesis**, v. 8, p. 1–8, 2006.

WARIS, M. E. et al. Respiratory syncytial virus infection in BALB/c mice previously immunized with formalin-inactivated virus induces enhanced pulmonary inflammatory response with a predominant Th2-like cytokine pattern. **Journal of virology**, v. 70, n. 5, p. 2852–60, 1996.

WELLIVER, T. P. et al. Severe human lower respiratory tract illness caused by respiratory syncytial virus and influenza virus is characterized by the absence of pulmonary cytotoxic lymphocyte responses. **The Journal of infectious diseases**, v. 195, n. 8, p. 1126–36, 2007.

XIE, X. H. et al. Lipopolysaccharide induces IL-6 production in respiratory syncytial virus-infected airway epithelial cells through the toll-like receptor 4 signaling pathway. **Pediatric Research**, v. 65, n. 2, p. 156–162, 2009.

ZEISS, C. J. The apoptosis-necrosis continuum: insights from genetically altered mice. **Veterinary pathology**, v. 40, p. 481–495, 2003.



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Pró-Reitoria de Graduação
Av. Ipiranga, 6681 - Prédio 1 - 3º. andar
Porto Alegre - RS - Brasil
Fone: (51) 3320-3500 - Fax: (51) 3339-1564
E-mail: prograd@pucrs.br
Site: www.pucrs.br