

**Universidade Federal do Rio de Janeiro**



**Influência do colesterol no ciclo de infecção e na  
manutenção da estrutura dos arbovírus Mayaro e  
Dengue**

**Ivanildo Pedro de Sousa Junior**

**\*2009\***

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

# Influência do colesterol no ciclo de infecção e na manutenção da estrutura dos arbovírus Mayaro e Dengue

**Ivanildo Pedro de Sousa Junior**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Título de Doutor em Química Biológica.

Orientação: Andre Marco de Oliveira Gomes

Co-Orientação: Jerson Lima da Silva

Rio de Janeiro

\*Junho/2009\*

Influência do colesterol no ciclo de infecção e na manutenção da estrutura dos arbovírus Mayaro e Dengue

**Ivanildo Pedro de Sousa Junior**

Orientação: Andre Marco de Oliveira Gomes

Co-Orientação: Jerson Lima da Silva

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Título de Doutor em Química Biológica.

Banca Examinadora:

.....  
Dra. Ana Paula Canedo Valente

Profa. Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica – UFRJ  
(presidente da banca)

.....  
Dra. Geórgia Correa Atella

(revisora e suplente interno)  
Profa. Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica - UFRJ

.....  
Dr. Claudio Antonio Bonjardim

Prof. Associado do Departamento de Microbiologia- UFMG

.....  
Dra. Narcisa Leal Cunha-e-Silva

Profa. Associada do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho - UFRJ

.....  
Dra. Clarissa Rosa de Almeida Damaso

Profa. Adjunto do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho - UFRJ

.....  
Dr. Davis Fernandes Ferreira

Prof. Adjunto do Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes - UFRJ  
(suplente externo)

.....  
Dr. Andre Marco de Oliveira Gomes

Prof. Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica - UFRJ  
(orientador)

.....  
Dr. Jerson Lima da Silva

Profa. Titular do Instituto de Bioquímica Médica - UFRJ  
(co-orientador)

Rio de Janeiro

\*Junho/2009\*

## FICHA CATALOGRÁFICA

Sousa Jr, Ivanildo Pedro de

Influência do colesterol no ciclo de infecção e na manutenção da estrutura dos arbovírus Mayaro e Dengue/Ivanildo Pedro de Sousa Junior – Rio de Janeiro: UFRJ/IBqM, 2009

XX, 148 f., il., 31 cm

Orientador: Andre Marco de Oliveira Gomes

Co-Orientador: Jerson Lima da Silva

Tese (Doutorado) – UFRJ / Instituto de Bioquímica Médica/  
Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, 2009.

Referências Bibliográficas: f. 119-148

1. Arbovírus; 2. colesterol; 3. Dengue; 4. Mayaro; 5. membrana;  
I. Gomes, Andre Marco de Oliveira. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Bioquímica Médica, Programa de Pós-Graduação em Química Biológica. III. Título.

Esta tese foi desenvolvida no Laboratório de Termodinâmica de Proteínas e Estruturas Virais Gregorio Weber, do Instituto de Bioquímica Médica, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a orientação do Professor Andre Marco de Oliveira Gomes e co-orientação do Professor Jerson Lima da Silva, sob a vigência dos auxílios do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Programa Nacional de Excelência (PRONEX), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES).  
IMBEBB, FUJB

## Agradecimentos

A Deus, por tudo que me ofereceu até hoje e pelo privilégio de ter a minha grande família e o meu fantástico filho!

E por falar nele... difícil falar do Pedro sem poder abrir um sorriso, sem se emocionar. Agradeço muito a você toda a descoberta de um pai, em como ser pai e acima de tudo por me tornar menos pedra. Outro dia, perguntaram: o que é o sublime? A melhor definição para esta pergunta se resume no simples sorriso, no simples jeitinho do meu “Pedro da boléia”. Ah! E como adoro ver você sorrindo, seu sorriso faz de tudo, até eu esquecer, inclusive, que tenho que continuar agradecendo a outras pessoas que também gostam muito de você. Sei que criamos os nossos filhos para o mundo, quando criança os seguramos com as mãos, quando adultos os seguramos com os nossos corações. Muito obrigado a você, meu filho!

Obviamente, minha felicidade não estaria completa se não fosse a minha querida Ygarinha! Juntos estamos construindo a nossa família! Agradeço muito a você por me ajudar a enfrentar os meus problemas e estar sempre ao meu lado, me fazendo sentir mais seguro! Por compartilhar nossas felicidades com o nosso filho e por inúmeras vezes sacrificar as suas vontades em detrimento das minhas. Muito obrigado, meu amor!

Ao grande mestre, ou melhor, Doutor, e acima de tudo ao grande exemplo de pessoa Andre! Não existe melhor legado que possa ser deixado senão servir de exemplo para os outros! Acredito que você faz esse papel muito bem, e, não por acaso, escolhemos você como padrinho do Pedro. Muito

obrigado pela compreensão, pelo aprendizado e ensinamentos e pelas conversas!

Ao Professor Jerson, pela oportunidade de fazer parte deste grande conglomerado que se transformou o seu laboratório e acima de tudo por acreditar que sempre dá para fazer mais!

À grande mãe Andréa, por toda ajuda e apoio e por tentar manter e fazer do laboratório uma extensão da nossa família. Por sempre tentar fazer o impossível para ajudar aqueles que entram em sua sala, e olha que não são poucos. Pelo seu carinho e amor absolutamente perceptíveis pelo Pedro, o meu muito obrigado!

À professora Débora, por sua incrível simplicidade, humildade e acima de tudo espírito de luta!

Apesar de não ter sido seu aluno, nunca ter assistido uma única aula sua, agradeço muito o exemplo de luta com o qual muitas vezes me inspirei. Esteja onde estiver, professora Vera Koatz, pela sua garra e vontade de vencer, mesmo quando parecia impossível, pode ter certeza que a senhora construiu um admirador.

Ao meu grande aluno Carlos, pelas ajudas inesgotáveis e por ser muitas vezes meus braços, pés e mãos no laboratório. Onde muitas vezes o papel orientador/aluno se invertia e pelo qual nutro um orgulho especial! Valeu!

Às minhas alunas Vivian e Thaís pelo grande empenho e dedicação.

Ao grande parceiro e amigo Theo, que tem aprendido como um mestre a lição de sua orientadora: Ajudar sempre os outros sem titubear e sem esperar nada em troca. Pelas conversas, brincadeiras e discussões, além de compartilhar algumas preocupações.

Ao mais novo papai da praça, ou melhor, ao pai do Gabriel, Daniel, por sua simplicidade e companheirismo. Por mostrar que as coisas podem ser sempre mais engraçadas do que são (principalmente com seu visual).

Às amigas Shana, Nathalia, Cristiane Latgé e ao grande lutador Samir, por sempre tentarem fazer do laboratório um lugar mais harmonioso e por tentarem manter as coisas em seu devido lugar.

À Tuane e à Mariana, pelas ajudas em momentos oportunos e pelas inúmeras conversas e brincadeiras.

À Mônica pelas ajudas, dicas e por estar sempre disposta a ajudar.

À Ana Paula e à Patrícia, por estarem sempre dispostas a ajudar e pelas conversas e brincadeiras.

Ao Rafael e à Wal, pelas longas conversas, sugestões e apoio em momentos difíceis.

Ao Emerson e à D. Silvia, pela ajuda com os tampões, reagentes, meios... e por sempre tentarem nos ajudar no que fosse preciso.

À Roberta, pela ajuda com a parte burocrática.

A todos os membros do LTPV/LAPA, pela ajuda e companheirismo.

Aos meus pais e irmãos, pessoas que sempre estão dispostas a me ajudar, independente do motivo. Em especial à minha mãe, por ser um grande exemplo de mãe e de avó, capaz de sacrificar o seu dia-a-dia para sempre ajudar seus filhos e netos, pessoa do qual dificilmente se houve uma palavra negativa e que sempre lutou não pela sua felicidade, mas pela dos seus filhos. Nada disso seria possível se não fosse o apoio incondicional do meu pai. Acredito que eles devam estar um pouco mais felizes agora com a nossa vitória! Dedico esta tese a vocês, papai e mamãe!

Aos meus avós e, em especial, à minha avó Maria, pelo seu carinho fraternal e pelo grande exemplo de luta.

Aos meus sogros, pela ajuda em todos os momentos que precisamos.

Aos meus colaboradores, Davis Ferreira, Geórgia Atella e Luciane Gaspar por disporem de um tempo já escasso para me ajudar em seus laboratórios no que fosse preciso e no fornecimento de amostras. Muito obrigado!

Aos membros que aceitaram fazer parte desta banca, os professores Claudio Bonjardim, Narcisa Cunha, Clarissa Damaso, Davis Ferreira e Geórgia Atella, o meu muito obrigado.

A todos, o meu muito obrigado!

## **Abreviações e Siglas**

ADN – ácido desoxirribonucléico

AFM – microscopia de força atômica

ARN – ácido ribonucléico

ATCC – American Type Cell Culture

C – proteína capsídica

CDV – canine distemper virus

CHIKV - vírus Chikungunia

Chol - colesterol

CMC – concentração micelar crítica

DEN - Dengue

DENV - vírus da Dengue

DMEM – meio Eagle modificado por Dullbecco

E – proteína de envelope

EEEV - vírus da encefalite equina oriental

FMDV – vírus da febre aftosa (“foot and mouth disease virus”)

FPPS – farnesil difosfato sintase

GAPDH – gliceraldeído 3-P desidrogenase

GP – polarização generalizada

GPI - glicosilfosfatidilinositol

HA – hemaglutinina

HBV – vírus da hepatite B

HHV6 - vírus da herpes humana  
HIV – vírus da imunodeficiência humana  
HMGCR - 3-hidroxi-metilglutaril-CoA redutase  
HS – heparan sulfato  
HSV – vírus herpes simplex (“Simplex Human Virus)  
JE - encefalite japonesa  
JEV - Vírus da Encefalite Japonesa  
LDL – lipoproteína de baixa densidade  
Lc – fase lamelar cristalina  
L $\alpha$  - fase líquido-cristalina  
M – proteína de membrana  
M $\beta$ CD – metil- $\beta$ -ciclodextrina  
NsP1 – proteína não estrutural 1  
NsP2 – proteína não estrutural 2  
NsP3 – proteína não estrutural 3  
NsP4 – proteína não estrutural 4  
PC - fosfatidilcolina  
PE - fosfatidiletanolamina  
POPE - Palmitoil-Oleoil-FosfatidilEtanolamina  
prM - precursor de membrana  
PRV - vírus da pseudorraiva  
RE – retículo endoplasmático  
RRV - vírus do rio Ross

SDS - dodecil sulfato de sódio

SLE - Encefalite de St. Louis

SM – única molécula (single molecule)

SPM - esfingomiéline

SIV – Vírus da Imunodeficiência de Símios

SV40 – vírus de símios 40 (“Simian Virus 40”)

TBE - Encefalite causada por carrapato

TBEV - Vírus da Encefalite Causada por Carrapato

TGN - rede Golgi-trans

TLC – cromatografia em camada fina

TMV - Vírus do Mosaico do Tabaco

VAP – proteína de fixação viral

VEEV - vírus da encefalite equina venezuelana

VSV – Vírus da Estomatite Vesicular

YF - Febre Amarela

YFV - Vírus da Febre Amarela

WEEV - vírus da encefalite equina ocidental

WHO – Organização Mundial de Saúde

WNE - Encefalite do oeste do Nilo

WNV - Vírus do Oeste do Nilo

## Resumo

Influência do colesterol no ciclo de infecção e na manutenção da estrutura dos arbovírus Mayaro e Dengue

**Ivanildo Pedro de Sousa Junior**

Orientador: Andre Marco de Oliveira Gomes

Co-Orientador: Jerson Lima da Silva

Resumo da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, Instituto de Bioquímica Médica, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Título de Doutor em Química Biológica.

Alfavírus e flavivírus são vírus envelopados que entram na célula hospedeira por endocitose mediada por receptor. Os lipídios contribuem para o processo de fusão viral e replicação pela sua estrutura química distinta, composição e partição em microdomínios específicos na membrana plasmática. Assim, nós avaliamos a necessidade por lipídios específicos para o processo de fusão viral utilizando modelo lipossomal (DPX/ANTS) que nos permite avaliar a mistura de conteúdo aquoso. O vírus da Dengue sorotipo 2 (DENV-2) fundiu eficientemente com lipossomos compostos de fosfolipídios e colesterol livres de receptores sugerindo que a interação inicial com o receptor não seja crucial para a fusão. De outro modo, a ausência de colesterol neste sistema bloqueou a mistura de conteúdo aquoso, enquanto a ausência de esfingomielina não mostrou o mesmo efeito. Além disso, nós examinamos o papel do colesterol presente no envelope vírus Mayaro e Dengue através da depleção pela metil- $\beta$ -ciclodextrina. O pré-tratamento do vírion com esta droga depletou eficientemente o colesterol do envelope e reduziu a infecciosidade de ambos os vírus. A microscopia eletrônica de contrastação negativa e as análises das imagens obtidas pela microscopia de força atômica revelaram que a retirada do colesterol do envelope viral afeta a morfologia viral, principalmente pela permeabilização do envelope viral, sugerindo que este lipídio tem um papel importante na manutenção da integridade da partícula viral. Análise da fluorescência do Laurdan nos permitiu investigar os efeitos do tratamento com metil- $\beta$ -ciclodextrina e da infecção sobre o empacotamento lipídico no envelope viral e na membrana celular. Além disso, parece que a infecção com estes arbovírus podem modular a síntese de colesterol. Juntos, nossos resultados sugerem que o colesterol presente no envelope do vírus do Dengue e do vírus Mayaro está relacionado a manutenção do alto grau de organização nesta membrana, sendo um componente estrutural crítico para a integridade da partícula viral e infecciosidade e que a infecção por estes vírus pode mudar as propriedades da membrana celular.

**Palavras-chave:** Flavivírus, alfavírus, colesterol, Laurdan, membrana, Dengue, Mayaro, metil- $\beta$ -ciclodextrina.

Rio de Janeiro

\*Junho/2009\*

## Abstract

Influence of the cholesterol in the infection cycle and maintenance of the structure of the Mayaro and Dengue arboviruses

**Ivanildo Pedro de Sousa Junior**

Orientador: Andre Marco de Oliveira Gomes

Co-Orientador: Jerson Lima da Silva

*Abstract* da Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, Instituto de Bioquímica Médica, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Título de Doutor em Química Biológica.

Alphaviruses and flaviviruses are enveloped viruses that enter host cells through receptor-mediated endocytosis. Lipids contribute to the viral fusion process and replacation by their distinct chemical structure, composition and partitioning into specific microdomains in the plasma membrane. In this way, we evaluated the requirement for specific lipids to viral fusion using a liposomal model system (ANTS/DPX) that allows the investigation of aqueous content mixing. Dengue virus serotype 2 fused efficiently with receptor-free liposomes consisting of phospholipids and cholesterol, suggesting that receptor interaction is not crucial for fusion. On the other hand, absence of cholesterol in this model blocked aqueous content mixing, while lack of sphingomyelin showed no effect. Furthermore, we have examined the role of Mayaro and Dengue virus envelope cholesterol, via methyl- $\beta$ -cyclodextrin depletion. The pretreatment of virions with methyl- $\beta$ -cyclodextrin efficiently depleted envelope cholesterol and significantly reduced the both virus infectivity. Negative-staining electron microscopy and atomic force microscopy analysis revealed that envelope cholesterol depletion markedly affected the virus morphology, by means of permeabilization of the viral membrane, suggesting that this lipid plays a role in the maintenance of virus particle integrity. Analysis of laurdan fluorescence allowed us to investigate the effect of treatment with methyl- $\beta$ -cyclodextrin and the infection on the lipid packing of virus envelope and cellular membrane. Moreover, seems that infection with these arbovirus can modulate the cholesterol synthesis. Altogether, Our results suggest that the cholesterol present in Mayaro and Dengue virus envelope is related to the maintenance of a high organization degree in this membrane, being a critical structural component for virus particle integrity and infectivity and that the infection for these viruses can change the membrane properties.

**Key-word:** *Flavivirus, alphavirus, cholesterol, Laurdan, membrane, Dengue, Mayaro, methyl- $\beta$ -cyclodextrin.*

Rio de Janeiro

\*Junho/2009\*

## Sumário

<b>1 INTRODUÇÃO GERAL.....</b>	<b>1</b>
1.1 Interação inicial vírus-célula.....	5
1.2 Mecanismos de entrada viral nas células hospedeiras.....	9
1.3 Qual o melhor caminho para estudar a dinâmica do processo viral dentro da célula?.....	12
1.4 O envolvimento do colesterol durante o ciclo replicativo viral.....	15
1.4.1 Fases lipídicas da membrana.....	18
1.4.2 O efeito do colesterol sobre a organização lipídica da membrana.....	22
1.5 Os Arbovírus: alfavírus e flavivírus.....	24
1.5.1 Os alfavírus.....	24
1.5.2 Estrutura, biossíntese e ciclo replicativo dos alfavírus.....	27
1.5.3 O vírus Mayaro.....	35
1.5.4 O envolvimento de colesterol no ciclo de infecção dos alfavírus em suas células hospedeiras.....	37
1.5.5 Os Flavivírus.....	38
1.5.6 Estrutura, biossíntese e ciclo replicativo dos flavivírus.....	40
1.5.7 O vírus da dengue.....	44
1.5.8 O envolvimento de colesterol no ciclo de infecção dos flavivírus em suas células hospedeiras.....	45
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>47</b>
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>48</b>
3.1 Cultura de células e vírus.....	48
3.2 Propagação e Purificação do vírus Mayaro.....	49
3.3 Propagação e Purificação do vírus da Dengue.....	50
3.4 Depleção de colesterol.....	51
3.5 Avaliação do conteúdo de colesterol.....	52
3.6 Determinação do título das amostras virais.....	52
3.7 Microscopia eletrônica de contração negativa.....	53
3.8 Microscopia de força atômica.....	54
3.9 Análise do extravasamento de ARN das amostras virais tratadas com M $\beta$ CD.....	55
3.10 Análise do conteúdo de ARN viral das células tratadas com M $\beta$ CD.....	55
3.11 Análise da fase lipídica do envelope viral e das células infectadas.....	59
3.12 Efeito da infecção viral sobre a síntese de colesterol <i>de novo</i> .....	64
3.13 Ensaio de extravasamento de conteúdo aquoso.....	65

<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>68</b>
4.1 Tratamento do vírus Mayaro com M $\beta$ CD retira o colesterol do envelope viral e reduz a infecciosidade.....	69
4.2 Avaliação do conteúdo de colesterol do vírus Mayaro tratado com M $\beta$ CD.....	70
4.3 A depleção de colesterol do envelope viral afeta a sua estrutura.....	71
4.4 A depleção de colesterol no envelope viral promove a formação de aberturas por onde o ARN viral é liberado.....	80
4.5 A depleção de colesterol do envelope do Vírus Mayaro promove a desorganização da membrana viral.....	81
4.6 A infecção pelo vírus Mayaro promove um aumento na organização da membrana celular.....	83
5 O vírus da dengue funde eficientemente com membranas artificiais contendo colesterol.....	88
5.1 A depleção de colesterol da célula hospedeira afeta a infecção pelo vírus da dengue.....	91
5.2 A retirada do colesterol do envelope do vírus da dengue afeta a sua infecciosidade e organização lipídica.....	93
5.3 A diminuição do conteúdo de colesterol das células Vero bloqueia a liberação do ARN viral.....	96
5.4 A infecção pelo vírus da dengue afeta o metabolismo do colesterol....	98
<b>6 DISCUSSÃO.....</b>	<b>100</b>
<b>7 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>119</b>
<b>8 ANEXOS.....</b>	<b>149</b>

## Índice de Tabelas

<b>I. Dimensões da partícula do vírus Mayaro através de microscopia de força atômica.....</b>	<b>76</b>
---	-----------

## Índice de Figuras

1. Morfologia e genoma viral.....	3
2. Fases lipídicas:.....	21
3. Estrutura do colesterol e sua inserção na membranas.....	23
4. Reconstrução tridimensional da estrutura do vírus Sindbis por micrografias crioelétrônicas.....	28
5. Ciclo de infecção dos alfavírus.....	33
6. Ciclo replicativo dos flavivírus.....	41
7. Respectivos valores de GP e suas fases de membrana correspondentes .....	61
8. Efeito da depleção de colesterol do envelope viral sobre a infecciosidade do vírus Mayaro.....	70
9. Determinação do conteúdo relativo de colesterol do vírus tratado com M $\beta$ CD.....	71
10. Efeito do tratamento com M $\beta$ CD sobre a morfologia viral (BHK21) avaliado por microscopia eletrônica.....	73
11. Efeito do tratamento com M $\beta$ CD sobre a morfologia viral (C6/36) avaliado por microscopia eletrônica.....	75
12. Efeito do tratamento com M $\beta$ CD avaliado por microscopia de força atômica.....	78
13. Determinação do volume da partícula viral em função do tratamento com M $\beta$ CD.....	79
14. Avaliação do extravasamento do RNA viral após tratamento com M $\beta$ CD.....	81
15. Efeito da depleção de colesterol sobre a organização do envelope viral.....	83
16. Efeito da infecção com o Vírus Mayaro sobre a organização lipídica das células infectadas.....	86
17. Fusão do vírus da Dengue-2 com lipossomos (DPX/ANTS).....	90
18. Depleção de colesterol de células Vero.....	92
19. Efeito da depleção de colesterol celular na infecção viral.....	92

<b>20. Avaliação do conteúdo de colesterol presente no envelope do vírus da dengue e o efeito de sua depleção sobre a infecciosidade viral.....</b>	<b>94</b>
<b>21. Efeito da depleção de colesterol do envelope viral do vírus da DENV.....</b>	<b>95</b>
<b>22. A depleção de colesterol afeta a liberação do RNA viral.....</b>	<b>97</b>
<b>23. Efeito da infecção sobre o biossíntese de colesterol.....</b>	<b>99</b>

## 1. INTRODUÇÃO GERAL

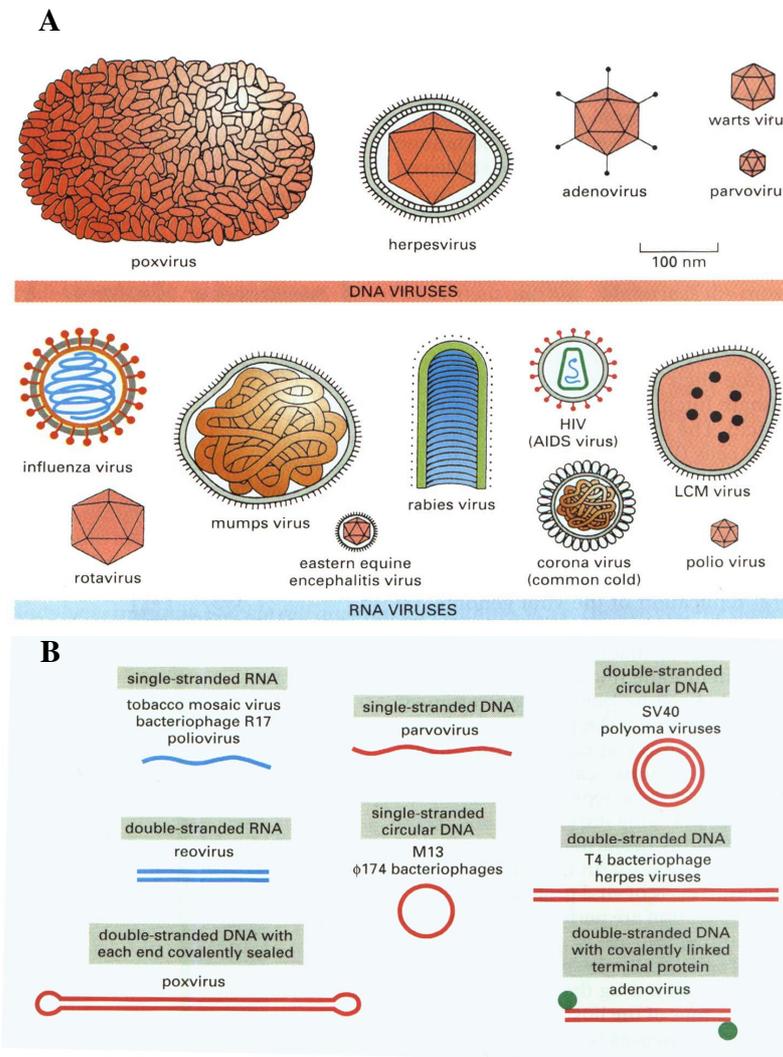
A existência dos vírus foi inferida inicialmente pelas doenças por eles causadas (Bos, 2000). Embora manifestações como raiva, poliomielite paralítica, sarampo e varíola tenham sido relatados na antiguidade, vírus como agentes infecciosos foram definidos apenas nos últimos 100 anos (Bos, 2000). A sua descoberta foi inicialmente possível pela revolução na Microbiologia conduzida por Louis Pasteur e a refinação dos conceitos por Robert Koch e Joseph Lister na última metade do século XIX. Estes e outros cientistas descobriram que organismos microscópicos produziam doenças e a presença do micróbio seria definida por vários critérios. No entanto, um subconjunto de doenças escapou dos critérios estabelecidos para os testes e uma nova série de organismos foi descoberta: **os vírus** (Oldstone & Levine, 2000).

Embora várias teorias sobre a origem dos vírus tenham sido propostas, os estudos de genoma comparativo sugerem uma origem ancestral dos vírus em um longo período de coevolução com as células (Holland & Domingo, 1998). Os mesmos eventos evolutivos tais como mutações e recombinações que contribuem para nosso estabelecimento como espécie também são responsáveis por causarem doenças e pela evolução dos vírus ao longo dos anos (Domingo, 2003). A descoberta recente de um vírus que infecta

arqueobactérias e a resolução da estrutura deste vírus (Rice e cols., 2004) sugerem que alguns vírus possam ter de fato um ancestral comum que precede a divisão dentro dos três domínios da vida (eubactéria, arqueobactéria e eucariotos) há mais de três bilhões de anos atrás. Além disso, o recente acúmulo de informações acerca das estruturas virais tem feito surgir propostas de uma classificação dos vírus baseada em um ancestral comum unificado (Bamford e cols., 2005). Estudos consistentes entre bacteriófagos (ordem Caudovirales) e o vírus da Herpes (família *Herpesviridae*) e entre bacteriófagos (família *Cystoviridae*) e reovírus (família *Reoviridae*) sugerem uma mesma origem comum para vírus que compartilham a mesma arquitetura capsídica, mas infectam hospedeiros dos diferentes domínios da vida (Krupovič & Bamford, 2008). No entanto, atualmente é considerado que vírus que infectam hospedeiros evolutivamente distantes, por exemplo, bactérias e humanos, possuem origens diferentes (Fauquet e cols., 2005).

Os vírus apresentam uma grande variedade de tamanhos e formas e o seu material genético pode ser DNA ou RNA, ocorrendo em fita simples ou dupla, segmentada ou não (Figuras 1A e 1B). Para muitos tipos de vírus contendo genoma de RNA de fita simples, este pode atuar diretamente como uma molécula de RNA mensageiro durante a infecção. Estas moléculas são

chamadas positivas ou fita senso. As seqüências complementares são negativas ou anti-senso.



**Figura 1: Morfologia e genoma viral (A)** Exemplos de morfologia viral. Como evidenciado, os vírus apresentam uma variedade muito grande de tamanhos e formas. **(B)** Esquema dos vários tipos de genoma viral. Os vírus de pequeno diâmetro contêm apenas poucos genes e podem apresentar DNA ou RNA como genoma. Os vírus maiores apresentam milhares de genes e o genoma é DNA dupla-fita (Extraído do livro *Molecular Biology of the Cell*, 2002).

As partículas virais possuem basicamente dois tipos de proteínas, as estruturais e as não-estruturais. As glicoproteínas, proteínas estruturais, formam espículas ancoradas à membrana, aparecendo como projeções dos envelopes virais. As proteínas não-estruturais estão ligadas à maquinaria de

replicação viral. Em sua maioria, são enzimas envolvidas na transcrição do ácido nucléico viral.

Os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios e são os seres biológicos mais abundantes na face da Terra ( $10^{31}$  -  $10^{32}$  virions na biosfera) (Bergh e cols., 1989), que apresentam um componente genético (ácido nucléico) conjugado a um revestimento protéico, o capsídeo, composto por um número definido de unidades protéicas, mantidas por ligações não-covalentes. Alguns vírus possuem o seu capsídeo envolto por uma membrana lipoprotéica que é adquirida durante a saída do vírus, por brotamento, de algum compartimento membranoso da célula hospedeira (vírus envelopados). Outros deixam a célula infectada como consequência do rompimento (lise) da membrana plasmática (vírus não-envelopados) ou por exocitose (Poranen e cols., 2002).

Durante muitos anos, a Virologia esteve direcionada para o estudo e identificação dos vírus causadores de doenças em animais e plantas. Estes estudos, em geral, baseavam-se na patologia das doenças e determinação dos agentes causadores. Nas últimas décadas, porém, muitos estudos têm buscado a compreensão dos processos de sinalização que levam à replicação viral, bem como a correlação entre vírus, células e a resposta imune do hospedeiro (Ploegh, 1998; Griffin, 2001; Greber, 2002).

Existe uma variedade muito grande de vírus cujas origens e diversidades estão sendo hoje elucidadas (Sharp, 2002). Pelo menos 20 das 60 famílias classificadas infectam humanos. Alguns vírus tornaram-se resistentes às diferentes formas de combate utilizadas; outros, por serem bastante flexíveis quanto à sua replicação, necessitam de intenso estudo para o seu combate, como o HIV.

Assim sendo, acredita-se que no futuro o entendimento das interações vírus-célula e dos mecanismos de entrada viral em diferentes tipos celulares serão de extrema importância para o desenvolvimento de fármacos antivirais, o tratamento de doenças, a produção de vacinas eficazes, bem como o desenvolvimento de vetores para a terapia gênica. Além disso, os vírus atualmente tornaram-se instrumentos úteis para estudos genéticos, de biologia celular, biologia estrutural e bioquímica, permitindo o entendimento de muitos parâmetros básicos do desenvolvimento e da vida.

### **1.1 Interação inicial vírus-célula**

O avanço da infecção viral depende da transferência do vírion ou do material genético do vírus e de proteínas acessórias do citosol ou do núcleo de células infectadas para compartimentos correspondentes de células não

infectadas, ou seja, não havendo liberação da partícula viral para o espaço extracelular (infecção célula-célula). Esta forma de infecção é utilizada por alguns vírus que modulam o metabolismo celular como forma de evasão do sistema imune e facilitar a disseminação da doença (Sattentau, 2008).

Quando a infecção ocorre via partícula viral e não, como em alguns casos, pela fusão direta de uma célula infectada e outra normal, uma sequência de eventos ocorre. Dependendo do vírus, estes eventos incluem a montagem do vírus na célula infectada, a liberação das partículas virais de células infectadas para o espaço extracelular, a fixação do vírus a estruturas presentes na membrana da célula hospedeira, a internalização por endocitose ou fusão direta com a membrana da célula hospedeira, finalizando com a liberação do genoma viral. Assim, os eventos iniciais da infecção viral costumam ser divididos em três estágios: fixação, entrada e liberação do material genético.

A princípio, para causar infecção, o vírus precisa ser capaz de ligar-se à superfície de uma célula hospedeira. Esta ligação é mediada por proteínas de fixação que se localizam na superfície viral e são chamadas de VAPs (virus attachment protein - Proteínas de Fixação Viral) (Klasse e cols., 1998). No entanto, estas VAPs interagem de maneiras diferentes com os receptores da célula hospedeira. Assim, os vírus foram divididos em dois grandes grupos quanto à ligação deles com as moléculas receptoras: aqueles com alta

afinidade a seus receptores (Ex: rinovírus, poliovírus e HIV) e aqueles com baixa afinidade (Ex: polioma, SV40 e influenza) (Dimitrov, 1997). As interações com alta afinidade possuem dupla função: além da fixação, elas também induzem mudanças conformacionais necessárias para os estágios subseqüentes da entrada viral, enquanto a interação com baixa afinidade necessita do pH ácido para induzir a entrada do vírus na célula hospedeira.

Baseado também nestes critérios de afinidade, os vírus desenvolveram uma variedade de estratégias pelas quais eles reconhecem e se ligam às suas células hospedeiras. Eles podem usar proteínas, lipídeos ou carboidratos como receptores. No entanto, não há um modelo claro de utilização de uma determinada molécula na superfície celular por um vírus específico ou família de vírus, visto que alguns vírus, cuja via de entrada depende do baixo pH, podem se ligar a receptores cuja entrada não ocorre por endocitose (Koike e cols., 1992). Recentemente, descobriu-se a dependência de voltagem ( $\Delta X$ ) ou do potencial elétrico da membrana plasmática na internalização do bacteriófago  $\phi 6$  (Poranen e cols., 1999; Poranen e cols., 2002). Os vírus também podem se ligar à célula através de moléculas derivadas da célula hospedeira que são incorporadas no envelope viral, tais como moléculas de adesão (Cantin e cols., 2005).

Evidências recentes sugerem que pequenas modificações no genoma viral podem induzir uma mudança no uso do receptor para a entrada do vírus no mesmo tipo celular, onde um receptor pode ser utilizado por vários vírus e um vírus pode utilizar vários receptores (Baranowski e cols., 2001). Um bom exemplo é o FMDV, onde passagens seriadas em células de mamíferos induziram modificações no genoma viral tornando-o mais flexível à utilização de receptores (Baranowski e cols., 2000). Efeito semelhante também foi observado com o HSV-1 (Jensen & Norrild, 2000). A especificidade de receptores pelos vírus tem várias implicações na patogênese viral e avanço no hospedeiro, além de ser um dos parâmetros que pode definir o tropismo viral, mas não o único (Evans & Almond, 1998).

O processo de entrada dos vírus em sua célula hospedeira geralmente é um evento que necessita de múltiplas ligações ao seu receptor (Seisenberg e cols., 2001), assim sendo, a densidade do receptor pode interferir na infecção viral. Além disso, estudos recentes indicam que os vírus podem diferir no seu processo de entrada na célula hospedeira ainda que utilizem a mesma molécula para a reação de fusão (receptor) (Dimitrov, 2000). Finalmente, a via de entrada dos vírus nas células vai mais além que a “simples” expressão de receptores. Para tal, a conformação do receptor, a sua densidade e a afinidade viral também influenciam neste processo (Doms, 2000).

## **1.2 Mecanismos de entrada viral nas células hospedeiras**

A adsorção do vírus à superfície celular e a interação com receptores específicos inicia uma série de eventos que levam à fusão e à penetração. Para vírus cujo processo de fusão ocorre na superfície celular, a ligação ao receptor promove uma série de rearranjos moleculares que podem levar a fusão da membrana do vírus com a membrana da célula hospedeira. Para vírus nos quais o processo de fusão ocorre intracelularmente, a ligação resulta na captação de partículas virais dentro de vesículas endocíticas.

Os vírus dispõem de muitas estratégias para penetrar na célula hospedeira (Smith & Helenius, 2004). A endocitose mediada por vesículas cobertas de clatrina ocorre na maioria das células e é uma das principais rotas utilizadas por vírus envelopados e não-envelopados (Pérez & Carrasco, 1994; DeTulleo & Kirchhausen, 1998; Sieczkarski & Whittaker, 2002b). A acidificação da vesícula endocítica coberta por clatrina, que possui um diâmetro de aproximadamente 100 nm (Marsh & Helenius, 1989), é promovida por H<sup>+</sup>-ATPases que se localizam na membrana destas organelas. Esta acidificação é importante para promover a mudança conformacional necessária para induzir o processo de fusão de alguns tipos de vírus. O endossomo é o primeiro compartimento ácido da via endocítica mediada por

clatrina (Fuchs e cols., 1987). No endossomo inicial, o pH é aproximadamente 6,2 e diminui para 5,0 no endossomo tardio (Tanasugarn e cols., 1984). Além da acidificação do endossoma e do potencial elétrico transmembrana, fatores adicionais tais como gradiente de pH, atuam no processo de entrada dos vírus nas células (Perez & Carrasco, 1994; Carrasco, 1995).

O processo de entrada dependente do baixo pH oferece várias vantagens. Primeiro, salvo aqueles vírus que passam pelo trato digestivo, apenas uma vez o vírus encontrará um ambiente ácido, que será quando ele estiver dentro de uma célula viável, assegurando que a fusão não ocorra prematuramente. Segundo, lisossomos e endossomos liberam o material transportado, no caso vírus, geralmente próximo ao centro celular, que é o destino imediato de muitos tipos de vírus (esta via também pode ser utilizada por vírus não-envelopados). Terceiro, a acidificação provavelmente é um processo sincrônico. Assim, todas as proteínas de fusão viral, ligadas ou não ao receptor, estão sendo acidificadas ao mesmo tempo, aumentando a probabilidade de um número suficiente de proteínas virais passarem pelas mudanças conformacionais necessárias para a fusão ocorrer (Marsh & Helenius, 1989).

Nos estudos de internalização viral mediada por clatrina, demonstrou-se que o citomegalovírus humano entra em células epiteliais por endocitose, mas

funde diretamente com a membrana plasmática de fibroblastos (Bodaghi e cols., 1999). Tal fato pode sugerir que a via de internalização a ser utilizada pelos vírus poderia ser dependente do tipo celular. Estudos com o vírus Influenza (Sieczkarski & Whittaker, 2002a) e retrovírus (Mothes e cols., 2000) também revelam esta dependência.

Alguns vírus, como os pertencentes ao grupo dos poxvírus, também podem entrar na célula hospedeira por um tipo de endocitose não específica, como a fagocitose. Em geral, a fagocitose está envolvida na captação de partículas de aproximadamente 200 nm (Marsh & Helenius, 1989), tais como leveduras e bactérias. A entrada na célula por macropinocitose, formação de grandes vesículas em determinadas regiões da membrana plasmática, não está bem definida. No entanto, a atividade macropinocítica pode predispor monócitos e células dendríticas (Cameron e cols., 1994) e macrófagos (Marechal e cols., 2001) à infecção por alguns vírus como HIV.

Além dos mecanismos acima citados, diversos vírus utilizam uma via na qual existe a participação de “plataformas lipídicas” e caveolas. O termo “lipid rafts” ou canoas lipídicas foi baseado em estudos bioquímicos com células epiteliais no qual se sugeriu que “rafts” consistiriam de colesterol e esfingolipídios no folheto exoplasmático da bicamada lipídica e colesterol e fosfolipídios com ácidos graxos saturados no folheto endoplasmático

(Fridriksson e cols., 1999). Elas são circundadas por domínios de membrana mais fluidos que são abundantes em ácidos graxos insaturados (Schroeder e cols., 1994). Estes microdomínios de membranas desempenham inúmeros papéis na homeostase celular incluindo: transcitoses, potocitoses endocitoses, exocitoses, internalização de toxinas, bactérias e protozoários, transporte de colesterol, homeostase dos níveis de cálcio e transdução de sinal (Anderson e cols., 1992; Simons & Ikonen, 1997; Brown & London, 1998, 2000; Isshiki & Anderson, 1999; Simons & Toomre, 2000; Zajchowski & Robbins, 2002; Razani e cols., 2002; Mañes e cols., 2003; Salaün e cols., 2004). No caso específico dos vírus, estes se utilizam de microdomínios lipídicos de membrana no processo de entrada, da desmontagem da partícula viral, na replicação e durante o processo de saída da célula (Nayak & Barman, 2002; Chazal & Gerlier, 2003).

### **1.3 Qual o melhor caminho para estudar a dinâmica do processo viral dentro da célula?**

Nos últimos anos o avanço das técnicas de microscopia de fluorescência nos possibilitou realizar análises não apenas qualitativas, mas também quantitativas. A microscopia de fluorescência tem sido usada para visualizar,

localizar e rastrear partículas em uma grande variedade de sistemas biológicos (Goulian & Simon, 2000; Kues e cols., 2001). As técnicas de medidas de uma única molécula (single-molecule) (SM) têm revolucionado as pesquisas biológicas, por fornecer informações nunca obtidas de processos moleculares elementares. Em particular, medidas de fluorescência ao nível de SM passaram por um crescimento expressivo nas últimas duas décadas (Joo e cols., 2008) e diversos campos da pesquisa biológica foram beneficiados, e entre eles, a Virologia. Assim, tornou-se possível a visualização e o rastreamento de partículas virais ou componentes virais conjugados a um marcador fluorescente em células vivas e em tempo real através do microscópio de fluorescência.

A entrada, o tráfego e os mecanismos de saída de vários vírus animais estão sendo elucidados utilizando este método (Brandenburg e cols., 2007). A eficiente fusão e o rápido transporte e difusão do adenovírus dentro da célula viva foi demonstrado através do rastreamento da partícula viral (Seinseberg e cols., 2001). Recentemente, foi demonstrado o mecanismo de endocitose do vírus Influenza cujo envelope estava marcado com múltiplos marcadores fluorescentes (Lakadamyali e cols., 2003, 2006). O rastreamento em tempo real da partícula viral identificou várias vias endocíticas distintas e possibilitou a caracterização quantitativa do processo endossomal. Finalmente, dois

recentes estudos elucidaram um pouco mais a interação do vírus da Dengue com sua célula hospedeira através do rastreamento da partícula conjugada a um marcador fluorescente. Em um deles foi demonstrada a dependência do baixo pH para o processo de fusão viral, além de uma eficiência de fusão relativamente baixa, onde menos de 1/4 das partículas ligadas à superfície da célula demonstraram capacidade fusogênica (van der Schaar e cols., 2007). Recentemente, foi demonstrado que o vírus é internalizado a partir de invaginações cobertas por clatrina pré-existentes na superfície da célula e a fusão ocorreria em endossomos tardios (van der Schaar e cols., 2008).

Apesar do notável avanço, a infecção viral é um processo complexo: os vírus podem explorar numerosas vias das células que infectam, cada via consistindo de inúmeros passos e cada passo tem uma interação específica entre os constituintes viral e celular. Com o surgimento do quinoma humano (conjunto de gens do genoma humano que codificam quinases) descobriu-se um conjunto destas enzimas que regulam a entrada do VSV e do SV40 (Pelkamns e cols., 2005): 92 quinases regulam a entrada do VSV, 80 regulam a entrada do SV40 e 36 estão envolvidas na entrada de ambos. Além disso, muitas das enzimas que estão relacionadas à entrada de ambos têm efeitos opostos na entrada destes vírus. Estendendo esta abordagem a outros vírus e a

um conjunto muito maior de genes relacionados à infecção viral, vislumbra-se o tamanho do problema que temos.

#### **1.4 O envolvimento do colesterol durante o ciclo replicativo viral**

Desde a sua descoberta e isolamento em 1789, no auge da Revolução Francesa, o colesterol tem sido extensivamente estudado. Com seu intrincado e complexo sistema de biossíntese e de metabolismo, inicialmente atraiu a atenção de químicos e sua característica estrutural e física tem fascinado biofísicos. Como um importante componente de membrana em eucariotos superiores, o colesterol ajuda a produzir uma barreira semi-permeável entre compartimentos celulares e ajuda na manutenção da fluidez da membrana. O colesterol também modula as funções de proteínas de membrana, o tráfego intracelular e participa em vários processos de sinalização transmembrana, tais como dos receptores acoplados a proteína G (Cherezov e cols., 2007).

A obtenção de colesterol por parte das células de mamíferos ocorre, principalmente, por duas vias. O colesterol pode ser sintetizado a partir do acetil-CoA pela via do mevalonato (Goldstein & Brown, 1990), que também leva à produção de vários isoprenóides, incluindo lipídios farnesil e geranyl-geranyl que são covalentemente ligados ao C-terminal de algumas proteínas

(Zhang & Casey, 1996). As células também podem adquirir colesterol através da endocitose de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (Goldstein e cols., 1985). O receptor de LDL se liga à lipoproteína e esta é internalizada e degradada em lisossomos e o colesterol presente é liberado dentro da célula. (Goldstein e cols., 1985).

O colesterol se distribui de maneira heterogênea entre as membranas celulares. Na membrana plasmática ele representa 20-25% das moléculas lipídicas. O colesterol também é abundante em compartimentos endocíticos que atuam na reciclagem e em parte do complexo de Golgi (Maxfield & Tabas, 2005). Ao contrário, o retículo endoplasmático apresenta um baixo conteúdo de colesterol (menos de 1% do colesterol celular total) (Ikonen, 2008).

Além disso, o colesterol é importante na patogênese cardíaca, nas doenças cérebro-vasculares, nas diversas formas de demências, diabetes, câncer e em várias doenças monogênicas raras (Ikonen, 2006; Maxfield & Tabas, 2005).

Recentemente um número crescente de estudos tem relacionado o papel e importância do colesterol presente na membrana plasmática ou endossomal ou em ambos e no envelope da partícula viral no sucesso de algumas infecções virais. A infecciosidade do vírus influenza (Sun & Whittaker, 2003) e do vírus

da Herpes humana (HHV6) (Huang e cols., 2006) é afetada pela depleção de colesterol de suas membranas. O vírus Vaccinia, o Varicela-zoster, o vírus da “Pseudorraiva” (PRV) e alguns arenavírus mostraram uma dependência de colesterol da membrana plasmática para sua eficiente internalização na célula hospedeira (Chung e cols., 2005; Hambleton e cols., 2007; Desplanques e cols., 2008; Vela e cols., 2007). A dependência de colesterol tanto na membrana celular quanto na viral foi mostrado para o vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), para o vírus da Herpes simplex (HSV) e para o vírus da Hepatite C (Bender e cols., 2003; Campbell e cols., 2001, 2002; Graham e cols., 2003; Guyader e cols., 2002; Viard e cols., 2002, Aizaki e cols., 2008). Além disso, o vírus do Oeste do Nilo (WNV) necessita de colesterol na membrana alvo para o processo de internalização (Medigeshi e cols., 2008). A presença de colesterol no envelope do vírus da Hepatite B (HBV) não se mostrou necessária para a ligação do vírus à sua célula hospedeira, mas é indispensável para o processo de entrada e pode ser um fator importante no processo de fusão viral (Bremer e cols., 2008). O inverso foi observado com o “Canine Distemper Virus” (CDV), onde o colesterol presente no envelope viral foi necessário para uma infecção eficiente, enquanto não houve alterações na infecciosidade quando foi retirado o colesterol celular (Imhoff e cols., 2007). Algumas vezes, o colesterol presente

na membrana celular diminui a infecciosidade de alguns vírus, como o observado para o vírus da Raiva, onde a diminuição do conteúdo de colesterol celular promoveu um aumento na infecciosidade deste vírus (Hotta e cols., 2008). De uma maneira geral, o colesterol atua em várias etapas do processo infeccioso de inúmeros gêneros virais, destacando-se os eventos iniciais que levam à internalização da partícula, tais como os eventos de fusão (Teissier & Pécheur, 2007).

Devido à importância deste lipídio para algumas famílias e gêneros virais, não é de se surpreender que alguns vírus modulem o metabolismo de colesterol para aumentar as chances de uma infecção mais eficiente. O HIV, por exemplo, aumenta não só a expressão de algumas enzimas da via do mevalonato, como também aumenta a biossíntese de colesterol (Zheng e cols., 2003). Recentemente, demonstrou-se que o WNV é capaz de aumentar a expressão de uma das enzimas da via do mevalonato (Mackenzie e cols., 2007).

#### **1.4.1 Fases lipídicas da membrana**

As membranas das células de mamíferos possuem vários papéis funcionais que precisam ocorrer simultaneamente. A membrana oferece uma

barreira permeável que permite a existência de um gradiente de concentrações de íons e solutos entre os lados da membrana ajudando na manutenção do potencial elétrico transmembrana e na função de várias organelas especializadas. Além disso, a membrana funciona como um suporte para várias proteínas e ainda precisa ser fluida o bastante para permitir a difusão destas proteínas. Ela tem que ser bastante flexível para dobrar, como por exemplo, durante o brotamento de vesículas ou fusão de membranas durante o tráfego intracelular. Muitas membranas biológicas apresentam uma heterogeneidade lateral, formando regiões que atuam como verdadeiras plataformas de sinalização (Simons & Vaz, 2004).

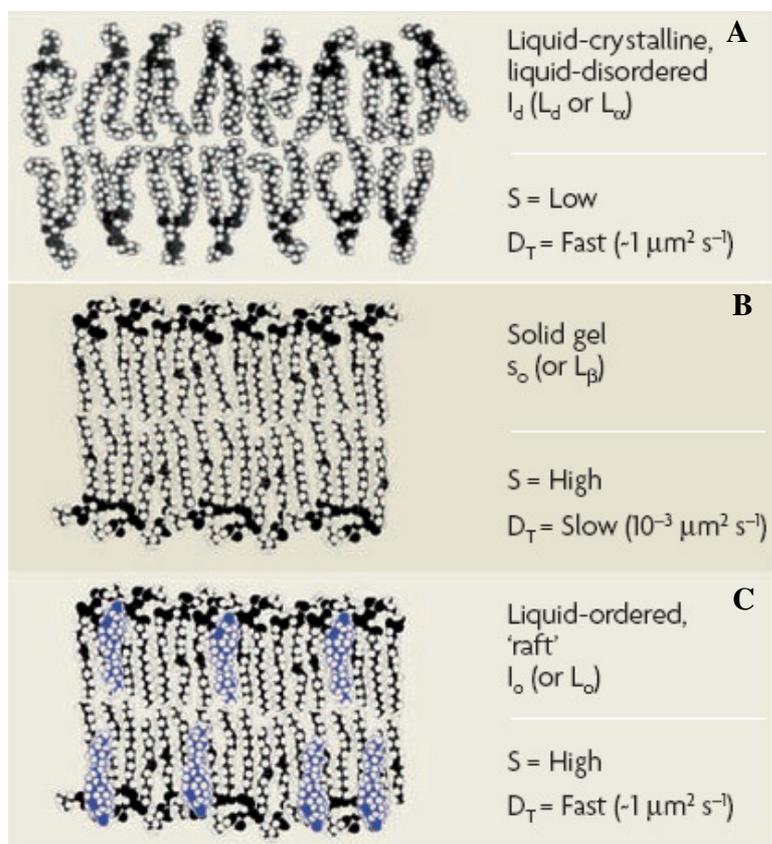
Para melhor controlar estas funções, o papel de outros lipídios e o grau de ordem ou empacotamento da membrana são fundamentais. Assim, as membranas biológicas se apresentam em fases onde a predominância de um ou outro tipo de fase dependerá da estrutura e da composição lipídica da membrana, de interações lipídio-lipídio e lipídio-proteína. Misturas ricas em esfingomiéline, por exemplo tendem a adotar um comportamento de fase sólida ou gel (Figura 2B).

Os esteróis naturalmente não formam fases lipídicas, mas junto com outros lipídios da bicamada podem formar fases líquido-ordenadas (Figura

2C). Esta fase apresenta um grau de organização tão alto quanto da fase sólida, mas uma mobilidade translacional muito maior.

Em fases lipídicas ordenadas ( $L_o$ ), os átomos da cadeia acil estão altamente empacotados e relativamente alongados (Figura 2C). A fase lipídica desordenada ( $L_\beta$ ) é caracterizada pela rápida difusão no plano da membrana e apresenta um grau de ordem muito baixo no centro hidrofóbico da bicamada (Figura 2A). Lipídios com ácidos graxos insaturados aumentam a propensão da bicamada apresentar regiões desordenadas. Os átomos nesta fase não estão firmemente unidos, facilitando a passagem de moléculas de água e outras pequenas moléculas pela bicamada.

Desta forma, membranas altamente ordenadas podem fornecer uma melhor barreira de permeabilidade do que uma membrana mais desordenada, uma vez que moléculas polares podem melhor se intercalar entre os lipídios desordenados. No entanto, lipídios altamente ordenados (fase gel -  $L_\beta$ ) (Figura 2B) não permitiriam a rápida difusão de proteínas de membrana e poderiam dificultar a formação de vesículas. De fato, lipídios na fase gel quase não são observados em membranas de células de mamíferos, que exibem uma dinâmica muito grande de fases líquidas. Nas membranas biológicas há, frequentemente, uma mistura de fases líquido-ordenadas e líquido-desordenadas.



**Figura 2: Fases lipídicas:** Lipídios em um arranjo líquido cristalino ou desordenado (A), em uma fase sólida ou gel (B) e na fase líquido-ordenada semelhante aos microdomínios de membrana ou “rafts” na presença de colesterol (azul) (C).  $S$  – Parâmetro de ordem de segmentos das cadeias acil;  $D_t$  – coeficiente de difusão translacional (Extraído de Van Meer e cols., 2008).

Os diferentes tipos de organização lipídica têm importantes efeitos sobre as proteínas de membrana. Muitas proteínas de membrana preferem se associar com um tipo particular de organização lipídica, levando à separação física delas na bicamada com coexistência de fases lipídicas (Simons & Ikonen, 1997; Sprong e cols., 2001). Para proteínas com lipídios ou âncoras de

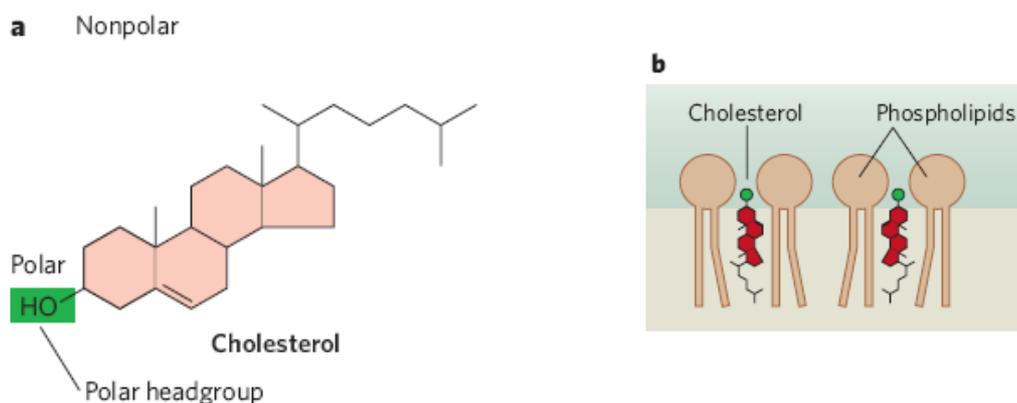
ácidos graxos, esta preferência será primordialmente determinada pela cadeia acil. Por exemplo, proteínas ancoradas a gliocosilfosfatidilinositol (GPI) apresentam uma preferência por domínios ordenados devido à âncora fosfoinosinotídica que apresenta uma cadeia acil saturada (Schroeder e cols., 1998). Do mesmo modo, muitas proteínas miristoiladas ou palmitoiladas associam-se com domínios ordenados no folheto citoplasmático (Resh, 2004). Âncoras de membranas preniladas têm preferências por domínios desordenados devido à insaturação do grupamento isoprenil (Wang e cols., 2001; Melkonian e cols., 1999).

#### **1.4.2 O efeito do colesterol sobre a organização lipídica da membrana**

A estrutura do colesterol é muito diferente de outros lipídios de membrana, consistindo de uma série de anéis fundidos que torna parte da molécula extremamente rígida (Figura 3A). Na extremidade desse anel está um grupo hidroxil e no outro extremo há uma cauda de hidrocarbonetos. Assim, o colesterol, como outros lipídios de membrana, apresenta uma parte hidrofílica e outra hidrofóbica determinando o seu posicionamento na bicamada lipídica. Quando o grupo hidroxil está próximo ao carbonil éster dos fosfolipídios, a parte rígida do colesterol está situada ao lado das cadeias de

ácidos graxos dos fosfolípidios vizinhos, ajudando a ordenar a cauda hidrofóbica (Figura 3B). Desta forma, o colesterol ajuda a aumentar a ordem em membranas através do efeito do seu rígido anel e a sua capacidade de preencher os espaços intersticiais. Não é de surpreender que um dos principais componentes de domínios líquido-ordenados seja o colesterol.

Devido a sua pequena “cabeça-polar” que necessita de uma proteção adicional de lípidios adjacentes (Huang & Feigenson, 1999) e, por vezes, através de complexos unidos por pontes de hidrogênio com lípidios, tais como, esfingomiéline (McConnell & Radhakrishnan, 2003), o colesterol pode interagir preferencialmente com certos lípidios. A parte polar do colesterol é muito menor do que a de outros lípidios, facilitando assim o flip-flop entre os folhetos da membrana.



**Figura 3: Estrutura do colesterol e sua inserção na membrana:** (A) Estrutura planar do colesterol: em verde o grupo hidroxil e em rosa os anéis aromáticos. (B) Associação do colesterol com fosfolípidios da membrana e estabilização da cauda hidrofóbica (Extraído de Maxfield & Tabas, 2005).

## **1.5 Os Arbovírus: Alfavírus e Flavivírus**

Muitas das pandemias que ocorrem hoje são causadas por vírus RNA e muitos destes vírus pertencem a um grupo especial chamado de arbovírus. Estes vírus são chamados de arbovírus, pois seu ciclo de vida envolve tanto hospedeiros vertebrados (geralmente aves e mamíferos selvagens, além de anfíbios, répteis e peixes) quanto invertebrados (mosquitos ou outros insetos hematófagos que servem como vetores). Muitas das infecções causadas por arbovírus são assintomáticas ou com sintomas que se assemelham aos da gripe. No Brasil, existe um número grande de arboviroses que são mantidas em uma grande variedade de ciclos zoonóticos (Figueiredo, 2007). Dentre as inúmeras arboviroses destacaremos as provocadas pelos membros dos gêneros *Alfavírus* e *Flavivírus*.

### **1.5.1 Os alfavírus**

A família *Togaviridae* é dividida em dois gêneros: os *Alfavírus* e os *Rubivirus* (Strauss & Strauss, 1994). O gênero *Alfavírus* possui 27 membros conhecidos, 11 dos quais têm demonstrado causar doenças em humanos e, destes 11, 8 deles podem causar epidemias (White & Fenner, 1994). No

entanto, o número de mortalidades decorrentes de infecção por alfavírus é muito baixa e frequentemente as infecções por alfavírus em humanos permanecem como casos subclínicos. Os alfavírus apresentam uma distribuição mundial, alcançando quase todos os continentes, exceto a Antártida.

Os alfavírus do velho mundo incluindo Sindbis (SINV), o vírus da Floresta de Semliki (SFV), o vírus Chikungunya (CHIKV), o vírus O'nyong-nyong e o vírus do Rio Ross (RRV) são responsáveis por milhares de casos em todo o mundo. Recentemente, uma epidemia de mais de 1 milhão de casos de Chikungunya, incluindo manifestações de febre hemorrágica, ocorreu em alguns países da costa do Oceano Índico. Esta epidemia tem um número significativo de casos de viajantes europeus a ponto do vírus ter se tornado endêmico na Itália (Panning e cols., 2008; Nicoletti e cols., 2008). A fase aguda da doença é caracterizada por febre, dor de cabeça, dor nos olhos, mialgia generalizada, artralgia, diarreia, vômito, dentre outros sintomas (Pinheiro e cols., 1981; Tesh e cols., 1999). Artralgia/artrite podem persistir por mais alguns anos.

Os alfavírus do novo mundo incluem importantes patógenos humanos, tais como: o vírus da Encefalite Equina Ocidental (WEEV), Oriental (EEEV) e Venezuelana (VEEV). A sintomatologia das infecções ocasionadas por estes

vírus é muito semelhante as do velho mundo, mas como o próprio nome sugere, eles podem causar uma encefalite aguda em humanos e animais domésticos. Dos relacionados acima, o EEEV é muito virulento em humanos, causando a mortalidade em 50-70% dos casos sintomáticos. Apesar desta alta mortalidade e do seu possível uso como arma biológica não existem vacinas licenciadas contra qualquer alfavírus.

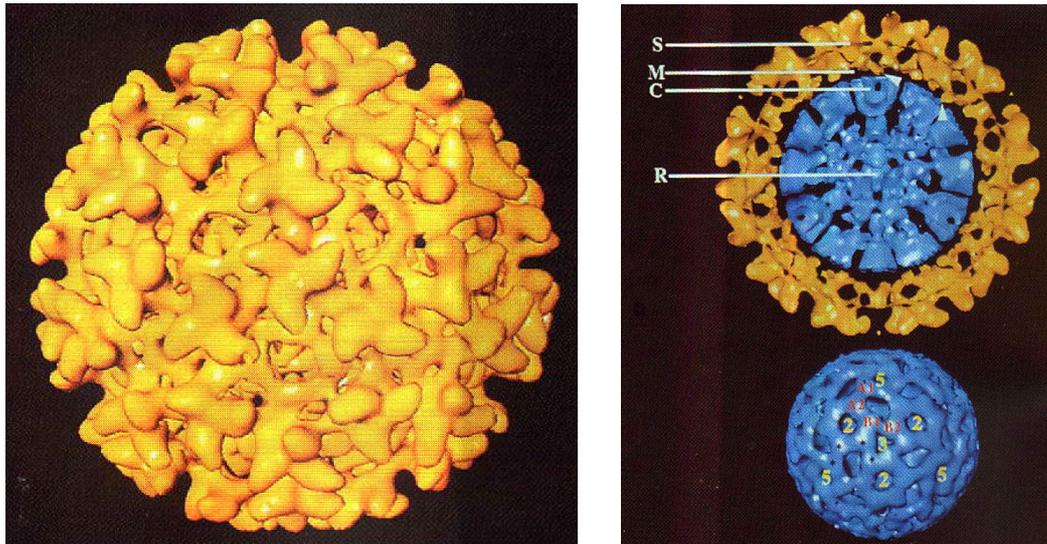
Estudos recentes sugerem algumas diferenças durante a infecção dos alfavírus do novo e do velho mundo. Por exemplo, a inibição do processo transcricional da célula hospedeira é realizada por diferentes proteínas virais. Os alfavírus do novo mundo desenvolveram um mecanismo alternativo de inibição da transcrição que é principalmente determinado pela proteína capsídica, enquanto os do velho mundo desenvolveram outra estratégia de inibição através da proteína não estrutural P2 (nsP2) (Garmashova e cols., 2007).

A interação vírus-hospedeiro pode ser altamente específica e muitas vezes uma única espécie de mosquito é utilizada como o vetor principal. Dentro do seu hospedeiro, os alfavírus se replicam em uma grande variedade de células, incluindo neurônios e células da glia, células musculares lisas e estriadas, células de origem linfóide e células sinoviais, dentre outras, podendo utilizar o mesmo receptor ou não (Strauss & Strauss, 1994).

Recentemente, descobriu-se que o vírus Sindbis pode se replicar no endósteo e periósteo de ossos longos (Heise e cols., 2000).

### **1.5.2 Estrutura, biossíntese e ciclo replicativo dos alfavírus**

Os alfavírus possuem aproximadamente 70 nm de diâmetro (Strauss & Strauss, 1994; Paredes e cols., 1993) e consistem de um capsídeo com simetria icosaédrica que possui cerca de 40 nm de diâmetro, contendo 240 cópias da proteína capsídica C (aproximadamente 30 kDa). O capsídeo é envolto por um envelope lipídico oriundo da membrana plasmática da célula hospedeira (Figura 4). A proteína capsídica dos alfavírus apresenta algumas especializações que auxiliam na manutenção da estrutura viral através de interações com o RNA (Skoging & Liljeström, 1998). Além disso, quando sintetizada, ela funciona como uma protease para clivar a si mesma da poliproteína viral precursora nascente, C-p62-6K-E1 no caso do SFV e C-PE2-6K-E1, no caso do Sindbis.



**Figura 4: Reconstrução tridimensional da estrutura do vírus Sindbis por micrografias crioeletrônicas:** Esquerda: Visão superficial do *virion*, mostrando o arranjo das glicoproteínas virais. Direita: Corte em seção do *virion* mostrando as glicoproteínas em amarelo e o capsídeo em azul. **S**, proteínas da espícula; **M**, bicamada lipídica; **C**, nucleocapsídeo; **R**, RNA (Extraído de Paredes e cols., 1993).

As proteínas de espículas dos alfavírus são inseridas na bicamada lipídica, e juntas elas formam o envelope viral (Strauss & Strauss, 1994). Os vírus contêm 80 espículas, cada uma consistindo de duas ou três subunidades, duas glicoproteínas transmembrana tipo I, E1 e E2 (cada uma com aproximadamente 50 kDa), que estão associadas não-covalentemente, mas estáveis, e em algumas espécies de alfavírus, uma proteína periférica chamada E3 (10 kDa). As glicoproteínas E2 e E3 são sintetizadas como um precursor, chamado p62 em SFV e PE2 em SINV. A clivagem destes precursores é efetuada por proteases da célula hospedeira, sendo que em células de vertebrados o evento caracteriza-se por ser tardio, ou seja, ocorrendo após as

proteínas alcançarem a rede Golgi-trans (TGN), mas antes da chegada à superfície da célula, e em células de invertebrados por ser um evento inicial e contínuo (Naim & Koblet, 1990) ou tardio na produção de partículas (Heidner e cols., 1996).

A glicoproteína E1 contém um domínio hidrofóbico localizado entre o resíduo 75 e 97 (peptídeo de fusão), que é conservado entre os alfavírus e facilita as reações de fusão da membrana celular com a membrana do vírus (Garoff e cols., 1980; Dubuisson & Rice, 1993). E1 e E2 sofrem glicosilações com oligossacarídeos ricos em manose (Sefton, 1977) no lúmen do retículo endoplasmático (Garoff e cols., 1978; Bonatti e cols., 1979), e são então processadas na rede Golgi-trans, onde as cadeias de carboidratos são transformadas e o complexo é transportado para a membrana plasmática (Schlesinger & Schlesinger, 1986). No entanto, o número de cadeias de oligossacarídios pode variar entre os alfavírus.

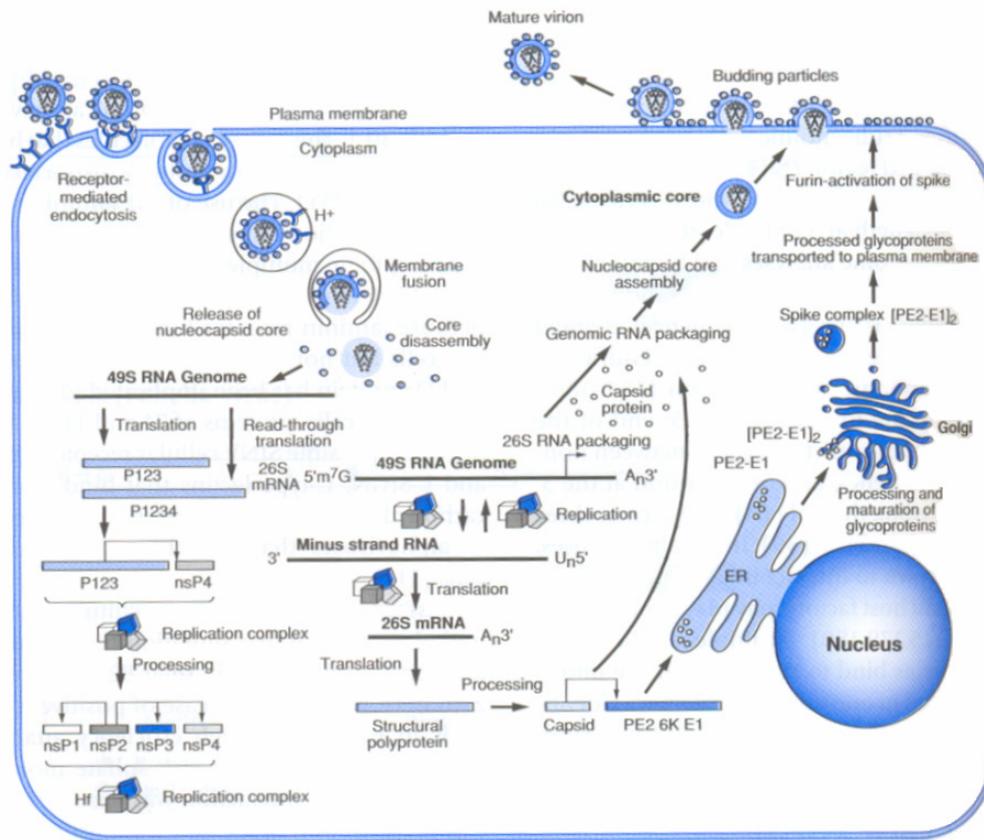
A glicoproteína E2 tem uma função de reconhecimento e ligação aos receptores celulares (Dubuisson & Rice, 1993) e de virulência. E2 participa ainda na estabilização do capsídeo viral através da formação de pontes de enxofre e interações aromáticas (Skoging e cols., 1996) com a proteína capsídica. Além disso, o processo de montagem e brotamento envolve a interação de aminoácidos hidrofóbicos no domínio citoplasmático de E2 com

a superfície do nucleocapsídeo, resultando na liberação do vírus maduro da superfície celular (Owen & Kuhn, 1997). Recentemente, demonstrou-se que mutações no endodomínio da glicoproteína E2 no vírus Sindbis bloquearam a montagem do vírus (Hernandez e cols., 2000).

A glicoproteína E3 está presente somente nas espículas do SFV e RRV (vírus do Rio Ross) e em mutantes atenuados do SINV (Paredes e cols., 1998). Existe também um pequeno peptídeo hidrofóbico localizado entre PE2 e E1, chamado de proteína 6K. Este polipeptídeo auxilia, mas não é essencial, na montagem do vírus, e é incorporado dentro da partícula viral nascente em menores quantidades em relação às glicoproteínas (Strauss & Strauss, 1994). Além disso, esta proteína mostra similaridades com outras viroporinas, proteínas virais formadoras de poros que alteram a permeabilidade da membrana celular (Carrasco, 1995). A remoção completa da sequência responsável pela codificação da proteína 6K do genoma viral não mostrou efeito sobre a replicação, expressão gênica ou transporte de glicoproteínas, mas houve uma redução na liberação do vírus (Liljeström e cols., 1991). No entanto, recentemente demonstrou-se uma diminuição na capacidade fusogênica de SFV cuja proteína 6K foi depletada, e que tal proteína parece ser um componente estrutural necessário para a partícula viral (McInerney e cols., 2004).

Estruturalmente, cada espícula é composta por um trímero de três heterotrímeros (E1/E2/E3)<sub>3</sub> ou heterodímeros (E1/E2)<sub>3</sub>. Assim, para construir 80 espículas são necessárias 240 cópias de cada subunidade (Strauss & Strauss, 1994; Kielian, 1995). Estudos recentes de cristalografia e de criomicroscopia eletrônica mostraram que o enovelamento da glicoproteína E1 de SFV assemelha-se ao verificado para proteína E de flavivírus (Lescar e cols., 2001).

A princípio, os alfavírus são introduzidos na célula através de endocitose mediada por clatrina (Helenius e cols., 1980) (Figura 5). Quando estas vesículas maturam em endossomos, o baixo pH em seu interior induz mudanças conformacionais nas glicoproteínas do envelope. Estas alterações incluem a dissociação do heterodímero original formado pelas glicoproteínas E1-E2 e a conseqüente formação de homotrímeros compostos por E1.



**Figura 5: Ciclo de infecção dos alfavírus:** O início do ciclo é mostrado a partir da esquerda com a fixação do vírion ao receptor celular. Em seguida, ocorre a fusão do envelope viral, a desmontagem do nucleocapsídeo e liberação do RNA viral. As proteínas usadas na replicação são traduzidas e processadas (abaixo esquerda). Estas proteínas capacitam a replicação do RNA genômico (ao centro) e tradução RNA mensageiro subgenômico em proteínas estruturais. A montagem citoplasmática do RNA genômico e do capsídeo produz o nucleocapsídeo que se associa com as glicoproteínas processadas (direita) na membrana plasmática resultando no brotamento da partícula (Extraído de Kuhn e cols., 2007).

Os receptores utilizados pelos alfavírus para entrar na célula hospedeira são bastante variados, e pouco se sabe sobre eles. De um modo geral, os alfavírus utilizam, como receptores, proteínas tais como moléculas de MHC nas células de vertebrados (Helenius e cols., 1978) e um receptor com alta afinidade por laminina, tanto em células de vertebrados (Wang e cols., 1992) quanto em células de mosquitos (Strauss & Strauss, 1994). Recentemente, demonstrou-se que SINV e outros alfavírus utilizam heparan sulfato (HS) como receptor de fixação, refletindo uma consequência da adaptação à cultura de célula. O HS serviria como uma molécula aglutinadora de partículas virais (Klimstra e cols., 1998). Demonstrou-se também que lectinas do tipo C poderiam atuar como receptores de fixação para alfavírus (Klimstra e cols., 2003).

A replicação viral ocorre no citoplasma. O RNA genômico é traduzido em uma poliproteína, p1234, que é clivada autoproteoliticamente, pela ação da nsP2 (proteína viral), gerando as proteínas não-estruturais nsP1, nsP2, nsP3 e nsP4 (Ding & Schlesinger, 1989). Estas proteínas não-estruturais são responsáveis pela replicação do RNA genômico (Schlesinger & Schlesinger, 1996). O domínio estrutural é traduzido como uma poliproteína (C-p62-6K-E1 ou C-PE2-6K-E1) do RNAm subgenômico, o RNAm 26S, que é processado para produzir as proteínas do envelope, a proteína capsídica e dois pequenos

polipeptídeos, E3 e 6K (Strauss & Strauss, 1994). A região amino-terminal desta poliproteína contém uma serina protease que cliva proteoliticamente a proteína capsídica da poliproteína (Skoging & Liljeström, 1998). A clivagem ocorre no citossol da célula hospedeira, expondo uma sequência sinal que permite o transporte da poliproteína para o lúmen do retículo endoplasmático rugoso (RER) (Garoff e cols., 1990). No RER, os carboidratos são covalentemente fixados e a proteína é clivada, originando a p62 ou PE2, 6K e E1 (Liljeström & Garoff, 1991). O enovelamento das proteínas na sua conformação nativa ocorre no RER, e as cadeias laterais de carboidratos de p62 ou PE2 e E1 têm um importante papel neste enovelamento, prevenindo a agregação e aumentando a solubilidade das proteínas (Hsieh e cols., 1983). Quando enoveladas corretamente, p62 ou PE2 e E1, interagem para formar um heterodímero (Barth e cols., 1995) e são transportadas para o complexo de Golgi. Antes da chegada à membrana plasmática, p62 é clivada por uma protease da célula hospedeira (furina) gerando E2 e E3 (Mayne e cols., 1984). A p62 não clivada funciona como um chaperone, protegendo as proteínas do envelope viral de sofrerem uma desestabilização em contato com o lúmen levemente ácido da rede de Golgi *trans* que poderia induzir uma mudança conformacional nas espículas virais. Os heterodímeros p62-E1 ou PE2-E1 são mais estáveis e resistentes ao baixo pH do que o heterodímero E2-E1

(Wahlberg e cols., 1989). Os heterodímeros aparecem na membrana plasmática antes de sofrerem oligomerização a trimeros (Ekström e cols., 1994). Não se sabe onde esta oligomerização ocorre.

### **1.5.3 O vírus Mayaro**

O vírus Mayaro é um arbovírus pertencente ao gênero *Alphavirus* e à família *Togaviridae*. Este vírus foi primeiramente descoberto em Trinidad, em 1954 (Anderson e cols., 1957). Alguns anos depois foi responsável por epidemias no Brasil e na Bolívia (Pinheiro e cols., 1981). As taxas de infecção variam de 10% a 60% e, geralmente, há um excesso de homens em uma proporção de 2:1 sobre mulheres. Embora a taxa de mortalidade seja bastante baixa, a infecção ocasionada pelo Mayaro é um grande problema de saúde pública no meio rural, com o aumento da incidência de casos humanos na bacia Amazônica (Vasconcelos e cols., 2001). A infecção pelo vírus Mayaro em humanos apresenta sintomas como fotofobia, erupções cutâneas, artrite, febre, calafrios, dores de cabeça e mialgia, assim como artralgia dos pulsos, tornozelos, dedos dos pés e em outras articulações. Além disso, a leucopenia é bastante comum. O vírus Mayaro tem sido isolado de mosquitos do gênero

*Haemagogus* em numerosas ocasiões, sendo que em poucos casos foram também obtidos de mosquitos de outro gênero.

Considerando que vírus Mayaro possa ser transmitido pelo mosquito *Aedes*, este vírus poderia se mover pelas cidades através de pássaros e viajantes. Recentemente, descobriu-se que três pescadores estavam com febre do Mayaro no estado de São Paulo em casos importados do Mato Grosso do Sul (Coimbra e cols., 2007).

As análises da sequência de nucleotídeos e da sequência de aminoácidos da proteína E1 revelaram que o vírus Mayaro, apesar de ser um vírus do novo mundo, está evolutivamente relacionado com o vírus Una (também do novo mundo), que juntamente com o Mayaro formam os dois únicos vírus da América do Sul com características antigênicas de vírus do velho mundo (Lavergne e cols., 2006).

Um estudo realizado por Mezencio e Rebello (1993) aponta como sendo três as proteínas estruturais do vírus Mayaro: p1 (54 kDa), p2 (50 kDa) e p3 (34 kDa). Por analogia com outros alfavírus, as proteínas estruturais p1 e p2 correspondem às glicoproteínas de envelope E1 e E2, e a proteína p3, corresponde à nucleoproteína C.

#### **1.5.4 O envolvimento de colesterol no ciclo de infecção dos alfavírus em suas células hospedeiras**

Os alfavírus são dependentes da presença de lipídios específicos na membrana da célula hospedeira para que o processo de fusão possa ocorrer. Dentre estes lipídios, destaca-se o colesterol. A inserção na membrana do peptídeo de fusão do SFV e do SINV é grandemente favorecida pela presença de colesterol na membrana alvo (Ahn e cols., 2002; Kielian & Helenius, 1984; Smit e cols., 1999). Estudos *in vitro* demonstraram que a fusão dependente do baixo pH para ambos os vírus é favorecida pela presença de colesterol na membrana liposomal (Kielian & Helenius, 1984; Smit e cols., 1999). *In vivo*, verificou-se que a fusão e infecção do SFV e SINV era de 3 a 5 ordens de magnitude maior nas células normais em comparação com as células depletadas de colesterol (Phalen & Kielian, 1991; Lu e cols., 1999; Vanshishtha e cols., 1998). Esta dependência de colesterol é reduzida em mutantes srf do SFV, selecionadas para crescimento em células depletadas de colesterol (Vanshishtha e cols., 1998). Vírus propagados em laboratório ou obtidos em campo mostraram a mesma dependência de colesterol para o processo de fusão e de infecção (Umashankar e cols., 2008). Além disso, o ectodomínio de E1 do SFV mostrou associar-se fortemente com domínios de

membrana ricos em colesterol (Ahn e cols., 2002). Nós também demonstramos que o vírus Mayaro pode interagir eficientemente com microdomínios de membrana ricos em colesterol isolados de células vivas (Sousa Jr. e cols., 2009).

### **1.5.5 Os Flavivírus**

A família *Flaviviridae* compreende um conjunto de vírus de grande importância médica responsáveis por causar surtos epidêmicos e mortes em humanos e animais. A família consiste de três gêneros: *Flavivirus*, *Hepacivirus* e *Pestivirus*. Dentre estes, destacamos o gênero *Flavivirus* que possui mais de 70 membros incluindo o vírus da Dengue (DENV), da Encefalite Japonesa (JEV), da Encefalite transmitida por carrapato (TBEV), o vírus do Oeste do Nilo (WNV) e o vírus da Febre Amarela (YFV). Dentro deste gênero, assim como acontece com os alfavírus, os vírus podem ser subdivididos em complexos antigênicos de acordo com critérios sorológicos (Lindenbach & Rice, 2001).

Atualmente, só existem vacinas disponíveis para os flavivírus JEV, YFV e TBEV. No entanto, as doenças epidêmicas causadas por estes vírus continuam sendo um sério problema de saúde pública em muitos países

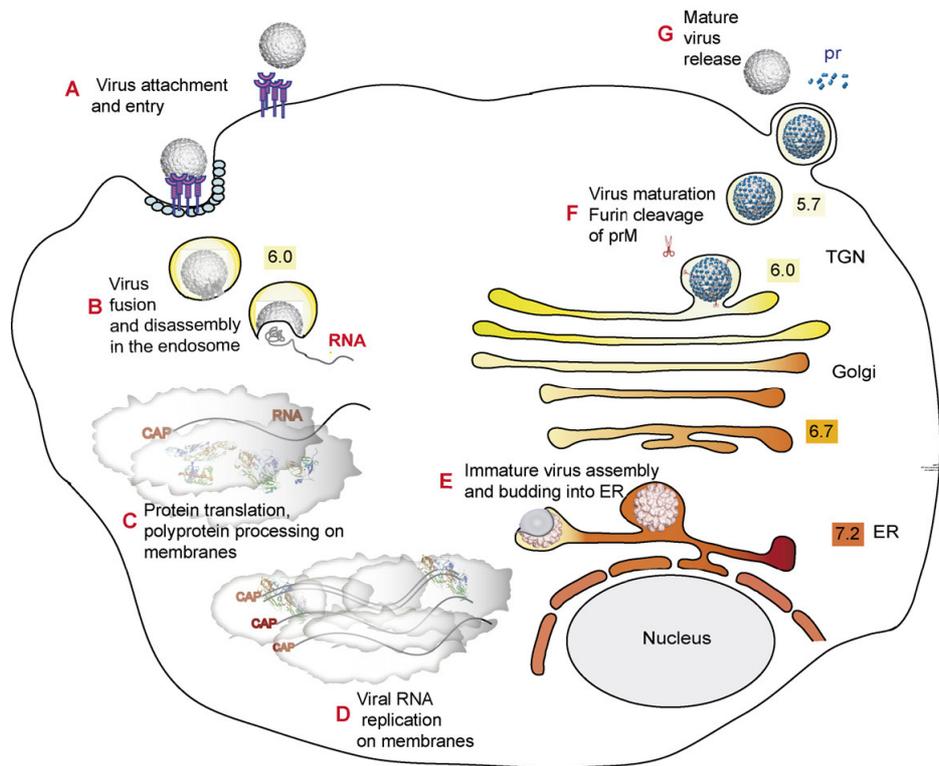
desenvolvidos. Testes estão sendo realizados com algumas “candidatas à vacina” para o WNV (Martín e cols., 2007; Monath e cols., 2006). Drogas que impeçam a replicação destes vírus ainda estão em um estágio muito inicial de desenvolvimento (Ghosh & Basu, 2008; Ray & Shi, 2006). Esforços estão sendo feitos para o desenvolvimento de uma vacina tetravalente contra os quatro sorotipos do vírus da Dengue, principalmente com vírus atenuados, vírus inativados ou com subunidades virais (Whitehead e cols., 2007).

O nome “flavivírus” é derivado da palavra do latim *flavus* que significa amarelo, devido à icterícia provocada pelo vírus da febre amarela. Os sintomas das pessoas acometidas por membros deste gênero vão desde uma leve febre e mal-estar a encefalites fatais e febres hemorrágicas. Além do vírus da Dengue, que tem causado grandes surtos epidêmicos, o WNV já surgiu em regiões temperadas da Europa e da América do Norte com surtos epidêmicos nos Estados Unidos causando centenas de mortes em humanos e milhares de animais (CDC, 2004). Em 2001, foram relatados mais de 50.000 casos de JEV. A organização mundial de saúde estima em 200.000 o número de casos de febre amarela em todo o mundo com 30.000 mortes, aproximadamente. Assim, percebe-se a necessidade de novas abordagens que busquem o melhor entendimento e previnam a patogênese e a replicação viral.

### **1.5.6 Estrutura, biossíntese e ciclo replicativo dos flavivírus**

As partículas dos flavivírus geralmente são regulares e esféricas com um diâmetro de 500 Å. O genoma viral (RNA) é empacotado e protegido pela proteína capsídica (C) envolta por uma bicamada lipídica oriunda da célula hospedeira. Nesta bicamada, encontram-se inseridas as 180 cópias da proteína do envelope (E) (Mukhopadhyay e cols., 2005). A proteína E está inicialmente complexada com uma outra proteína, a proteína precursora da proteína de membrana (prM) durante a montagem da partícula viral no retículo endoplasmático formando partículas imaturas.

Semelhante a outros vírus RNA polaridade positiva, os flavivírus se replicam no citoplasma de suas células hospedeiras (Figura 6). Um receptor específico para o processo de internalização destes vírus ainda não foi identificado. Semelhante aos alfavírus, algumas evidências apontam para a participação de moléculas de heparan sulfato (Kroschewski e cols. 2003) Além disso, destaca-se ainda o papel dos receptores de LDL (Agnello e cols., 1999) e dos retores de manose no processo de internalização (Miller e cols., 2008). O processo de internalização ocorre por endocitose mediada por receptor em vesículas cobertas por clatrina (van der Schaar e cols., 2007; Acosta e cols., 2008).



**Figura 6: Ciclo replicativo dos flavivírus:** (A) Os vírus se ligam a moléculas de fixação e a receptores na superfície da célula e são internalizados por endocitose. (B) No baixo pH do endossoma, as glicoproteínas virais promovem a fusão entre as membranas viral e celular, seguida pela desmontagem da partícula e liberação do RNA viral no citoplasma. (C) O RNA viral é traduzido em uma poliproteína que é processada por proteases virais e celulares. (D) As proteínas não-estruturais virais atuam na replicação do genoma. (E) A montagem do vírus ocorre na membrana do retículo endoplasmático (ER) onde a proteína capsídica e o RNA viral são envoltos pela membrana do retículo e glicoproteínas que formam a partícula imatura. (F) As partículas virais imaturas são transportadas através de vesículas secretórias. No baixo pH da rede Golgi trans (TGN) ocorre a clivagem da proteína prM catalisada por uma furina celular que levará a maturação da partícula. (G) As partículas maduras são liberadas no citoplasma. Os números referem-se ao valor do pH dos respectivos compartimentos (Extraído de Perera e cols., 2008).

Após a internalização, o baixo pH das vesículas endocíticas induz uma mudança conformacional nas glicoproteínas do envelope viral facilitando a exposição de um pequeno peptídeo hidrofóbico (peptídeo de fusão) que promoverá a fusão da membrana viral com a membrana endossomal facilitando a liberação do RNA viral (Bressanelli e cols., 2004; Modis e cols., 2004). Após a liberação deste RNA (~11 kb) no citossol da célula hospedeira, este é rapidamente traduzido como uma única poliproteína que é processada por proteases celulares e virais em três proteínas estruturais (C, prM e E) e sete proteínas não-estruturais (NS1, NS2A/2B, NS3, NS4A/4B e NS5) (Lindenbach & Rice, 2001). As proteínas não-estruturais atuam ativamente na replicação do RNA viral formando complexos de replicação associados com membranas celulares (Mackenzie e cols., 2001). O RNA recém sintetizado e a proteína capsídica são envolvidos pelas proteínas do envelope prM e E para a formação das partículas virais imaturas que brotam a partir do retículo endoplasmático. Estas partículas imaturas são transportadas para a rede de Golgi trans onde elas passam um processo de maturação através da ação de uma serino protease celular, furina, que medeia a clivagem de prM a M resultando na homodimerização da proteína E (Stiasny & Heinz, 2006). O peptídeo clivado da prM (pr) é mantido no vírion e a sua liberação ocorre apenas após o vírion ter sido secretado para fora da célula e exposto ao pH

neutro, protegendo a proteína E de uma fusão prematura (Li e cols., 2008; Yu e cols., 2008). A maturação também é acompanhada por uma reorganização das proteínas do envelope (Mukhopadhyay e cols., 2003; Yu e cols., 2008; Zhang e cols., 2003; Kuhn e cols., 2002). Em seguida, estas partículas brotam da célula por exocitose. Assim como os alfavírus, devido às diferenças no ambiente celular e a natureza não lítica da infecção, a entrada, a replicação e o brotamento da partícula podem ser diferentes nas células de vertebrados e de invertebrados.

A proteína do envelope E em sua forma dimérica madura é o grande componente na superfície do vírion. Nesta forma, ela é a responsável pela fixação da partícula na superfície da célula, pela fusão e entrada da partícula no interior da célula hospedeira (Perera e cols., 2008). Recentes estudos têm mostrado o potencial desta proteína como alvo para ação de agentes anti-virais (Perera e cols., 2008).

### **1.5.7 O vírus da Dengue**

A primeira descrição clínica de uma síndrome parecida com a dengue foi feita em 992 A.C. na China, embora o primeiro caso epidêmico bem documentado tenha ocorrido em 1779-1780 (Gubler, 1997). A etiologia viral foi sugerida há mais de um século atrás (Ashburn & Craig, 1907), mas devido aos avanços técnicos durante a segunda guerra mundial, americanos (Sabin & Schlesinger, 1945) e japoneses (Hotta, 1952) conseguiram isolar o vírus da Dengue.

Os vírus da Dengue (sorotipos 1-4) são os mais importantes patógenos arbovirais humanos. No mundo todo, anualmente, 1 em cada 100 pessoas são infectadas por um destes quatro sorotipos. Estima-se que aconteçam dez milhões de casos de dengue anualmente, incluindo os 500.000 casos de grande ameaça à vida como os associados à febre hemorrágica (DHF) e à síndrome de choque (DSS) (WHO, 2000). Surtos epidêmicos de DHF/DSS surgiram há 50 anos no sudeste asiático (Hammom e cols., 1960), mas só foram observados nas Américas em 1981 (Kouri e cols., 1989) e no sul da Ásia em 1989 (Messer e cols., 2002). Desde a década de 50, a incidência de casos de dengue já aumentou 50 vezes com mais de 100 países afetados (WHO, 2000). A DHF/DSS está entre as 10 principais causas de internação de crianças no

sudeste asiático (WHO, 1997) e o número de casos nas Américas cresce enormemente (PAHO, 1994). Não é de se surpreender que a dengue seja hoje um grande problema de saúde pública com grande impacto político, econômico e social (Gubler & Meltzer, 1999).

### **1.5.8 O envolvimento de colesterol no ciclo de infecção dos flavivírus em suas células hospedeiras**

Muito pouco é conhecido acerca do papel do colesterol no ciclo replicativo dos flavivírus, diferentemente do vasto conhecimento que se tem em relação aos alfavírus. O colesterol promove a interação induzida pelo baixo pH do ectodomínio da proteína de fusão do TBE (Stiasny e cols., 2003). No entanto, em ensaios de mistura de lipídios, a partícula viral não se mostrou dependente de colesterol na membrana alvo nos eventos iniciais da fusão (Corver e cols., 2000; Stiasny e cols., 2003). De outro modo, a fusão do WNV com lipossomos é mais eficiente quando o colesterol está presente na membrana (Gollins & Porterfield, 1986) e o seu processo de internalização parece ser dependente de microdomínios de membrana (Medigeshi e cols., 2008). Além disso, o WNV foi capaz de promover uma reorganização do colesterol presente na membrana plasmática para regiões perinucleares e

induziu alterações no conteúdo de uma das enzimas chaves no metabolismo de colesterol, 3-hidroxi-metilglutaril-CoA redutase (HMGCR) (Mackenzie e cols., 2007). Estudos iniciais demonstraram que o pré-tratamento das células com metil- $\beta$ -ciclodextrina (M $\beta$ CD) inibe a produção do vírus da Dengue (Reyes-Del Vale e cols., 2005). No entanto, a infecção e a fusão do Dengue e do YFV mostraram-se independentes de colesterol e a proteína de fusão do vírus da Dengue (proteína E) não ligou eficientemente ao colesterol, diferentemente da proteína de alfavírus (proteína E1) (Umashankar e cols., 2008). Por fim, recentemente descobriu-se que o conteúdo de colesterol poderia modular a entrada, a liberação do RNA e a replicação de flavivírus em suas células hospedeiras (Lee e cols., 2008).

## 2 OBJETIVOS

O colesterol é um dos principais lipídios de membrana e é um dos principais moduladores de fase das membranas celulares. Além disso, variações na sua concentração estão relacionadas a inúmeros procesos de sinalização intracelular. Os parasitas, de uma maneira geral, atuam muitas vezes modulando a concentração deste lipídio e o utilizam como porta de entrada na célula hospedeira.

Assim, esta tese teve como objetivos principais entender a interação e a importância deste lipídio no ciclo de infecção de dois importantes vírus: Mayaro e Dengue. Entender a sua importância na manutenção da estrutura viral, na organização de fases lipídicas nas células hospedeiras e os efeitos da infecção sobre o seu metabolismo.

Como objetivos específicos:

1. Avaliar o papel do colesterol do envelope na manutenção da estrutura viral;
2. Avaliar a importância do colesterol no ciclo replicativo viral;
3. Avaliar o efeito da infecção na manutenção da ordem de membranas nas células infectadas;
4. O efeito da infecção viral na síntese *de novo* de colesterol.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Cultura de células e vírus**

Células BHK-21 obtidas da ATCC (American Type Cell Culture) e células Vero gentilmente cedidas pelo prof. Moacir Rebelo (Instituto de Microbiologia Professor Paulo e Góes – UFRJ) foram crescidas em monocamadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>, utilizando meio de cultura DMEM (“Dulbecco’s Modified Eagle Medium”, Sigma Chemical Co.) complementado com soro fetal bovino 10% (Cultilab, Campinas, SP, Brasil), vitaminas 0,4%, aminoácidos não essenciais 1% e triptose 3% (Difco, Detroit, MI). As células de mosquito (C6/36) foram matidas a 28°C com o uso de meio de cultura Leibovitz (L-15) (Gibco) complementado com 2 mM de L-glutamina e triptose 3% e com soro fetal bovino 10% (Cultilab). O vírus Mayaro (VR-1277) foi obtido a partir da ATCC (American Type Cell Culture). O vírus da Dengue (44/2), sorotipo 2, foi cedido gentilmente pela doutora Luciane P. Gaspar (Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos – FIOCRUZ).

### **3.2 Propagação e Purificação do vírus Mayaro**

O vírus Mayaro foi propagado em células BHK-21 durante 48 h a 37°C. O vírus foi purificado como descrito anteriormente (Mezencio & Rebello, 1993) com algumas modificações. Após a propagação, o sobrenadante foi coletado e clarificado dos restos celulares a 8000 RPM por 20 minutos a 4°C em um rotor RPR 12-2 (Sorval). Em seguida, o sobrenadante foi colocado sobre um colchão de sacarose 30% e centrifugado em um rotor 45 Ti a 32000 RPM por 1:40 h a 4°C. O precipitado foi ressuspendido em tampão TNE (Tris 10 mM, NaCl 100 mM, EDTA 1 mM) e aplicado em um gradiente descontínuo de sacarose, 5-50%, e centrifugado a 30000 RPM por 1:30 h a 4°C em um rotor SW 41 (Beckman). O gradiente foi coletado em frações de 1 mL e a fração correspondente à viral foi identificada a partir da leitura em um espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm. As frações puras foram mantidas a 4°C até a realização dos experimentos. A concentração de proteína foi determinada pela metodologia descrita por Lowry e colaboradores em 1951. O grau de purificação das amostras foi observado através de um gel de poliacrilamida 12,5%.

### **3.3 Propagação e Purificação do vírus da Dengue**

O vírus da Dengue 2 (DENV-2) foi propagado e purificado conforme previamente descrito por Kuhn e cols., 2002. As células VERO foram crescidas em garrafas tipo “roler” e, após a obtenção de uma monocamada 90% confluenta, as células foram infectadas com uma baixa multiplicidade de infecção (~0.1) e mantidas a 37°C. Após sete dias de infecção, o meio com vírus foi coletado e clarificado por centrifugação a 12.000 g, por 30 minutos a 4°C.

Depois do vírus estar clarificado, adiciona-se PEG (40% de PEG em tampão TNE, pH 7,6, composto de NaCl 0,1 M, EDTA 1 mM e Tris 20 mM), com o objetivo de precipitar proteínas. Após 3 horas, a solução é centrifugada a 10.700 g durante 50 minutos a 4°C. O precipitado ressuspenso em tampão TNE é adicionado a um gradiente de densidade de tartarato de potássio e glicerol (10-40% de tartarato de potássio e 7,5-30% de glicerol) e centrifugado a 130.000 g, durante 2 horas a 4°C. A concentração de proteínas virais foi determinada a partir do ensaio de Lowry (Lowry e cols., 1951).

### 3.4 Depleção de colesterol

A retirada de colesterol foi realizada utilizando uma droga chamada de Metil- $\beta$ -ciclodextrina (M $\beta$ CD). A depleção do colesterol do envelope viral foi realizada através da incubação de 100  $\mu$ g de proteínas virais/mL com as concentrações indicadas de M $\beta$ CD por 30 minutos a 37°C. Após a incubação, a M $\beta$ CD foi removida através da centrifugação utilizando um filtro Microcon (Milipore, Billerica, MA, EUA) de 100 kDa. Nos experimentos onde as células foram incubadas com M $\beta$ CD, estas foram lavadas 3 vezes com tampão fosfato para a retirada da M $\beta$ CD residual. A toxicidade da M $\beta$ CD para células Vero foi avaliada por meio de ensaio de redução de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazolil-2,5difeniltetrazólio). O MTT é reduzido por células viáveis, por meio da atividade das desidrogenases mitocondriais, em um composto denominado Formazan, que pode ser quantificado por medidas espectrofotométricas. Assim, monocamadas celulares em placas de 96 poços foram incubadas com diferentes concentrações de M $\beta$ CD a 37°C por 30 minutos, sendo subsequentemente adicionado ao meio MTT a uma concentração final de ~250  $\mu$ g/mL. Após 4 horas de incubação a 37°C, os cristais de Formazan

gerados foram solubilizados em uma solução de lise (DMF 50% e SDS 20%, pH 4,8) e a viabilidade celular determinada analisando-se a absorbância das amostras em 570 nm.

### **3.5 Avaliação do conteúdo de colesterol**

O conteúdo de colesterol foi avaliado utilizando o kit comercial Amplex Red (Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) de acordo com as instruções do fabricante. Para medição do conteúdo de colesterol do envelope viral, o vírus (100 µg/mL) foi concentrado utilizando um filtro Microcon (Milipore) de 100 kDa, ressuspendido no tampão de reação Amplex Red e analisado em um leitor de placas SpectraMax M5 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA) ajustado para o modo fluorescência, utilizando o comprimento de onda de excitação de 544 nm e de emissão de 590 nm.

### **3.6 Determinação do título das amostras virais**

O título viral foi determinado através de um ensaio de plaque utilizando células Vero. Monocamadas confluentes de células Vero crescidas em placas de 6 poços foram infectadas com diluições seriadas do vírus Mayaro e

incubadas por 60 minutos a 37°C em atmosfera de CO<sub>2</sub>. Após este período, os vírus não adsorvidos foram removidos e um meio semi sólido foi adicionado (carboximetilcelulose 1,6%, em DMEM). Em seguida, as placas foram mantidas a 37°C em atmosfera de CO<sub>2</sub> por 48 h. Após este período, retirou-se o meio semi-sólido e as células foram fixadas com 1% de cristal violeta para a contagem dos plaques. A determinação do título do vírus da Dengue foi realizado de forma semelhante com algumas alterações. Após a semi confluência das células Vero, o ensaio de plaque foi realizado com diluições seriadas do vírus. Após a retirada dos vírus não adsorvidos, as placas foram mantidas a 37°C em atmosfera de CO<sub>2</sub> por 7 dias. Em seguida, procedeu-se a fixação e contagem dos plaques.

### **3.7 Microscopia eletrônica de contrastação negativa**

As amostras virais foram preparadas para a microscopia eletrônica de contrastação negativa colocando-as sobre uma grade previamente revestida (300 mesh). Após 1 minuto de contato da amostra com a grade, esta era contrastada durante 2 segundos com 2% de acetato de uranila. Após o período de secagem, as grades foram visualizadas em microscópio eletrônico Morgani operado em 100 kV. Em seguida, realizamos o processamento digital das

imagens adquiridas com o Adobe Photoshop (Adobe Systems Inc., Mountain View, Calif.).

### **3.8 Microscopia de força atômica**

As amostras virais foram preparadas para a microscopia de força atômica colocando-as sobre uma superfície de mica, deixando-as adsorverem por 5 minutos e fixando-as com 0,5% glutaraldeído por 20 minutos. Após o período de secagem sob atmosfera de nitrogênio, a superfície da mica foi analisada em um microscópio de força atômica MFP-3D Asylum microscope (Santa Barbara, California, USA), utilizando um cantilever AC240TS (Olympus, Tokyo, Japão) em modo de contato intermitente com uma constante nominal de 2N/m. Imagens foram adquiridas em ar com 512 x 512 pixels de resolução com uma taxa de leitura de 0,60 Hz. O processamento das imagens foi realizado pelo aplanamento da imagem (line-wise flatten only). Nós assumimos que a partícula viral visualizada com esta técnica tinha a forma de uma elipsóide. Portanto, o volume da partícula foi determinado através do volume da elipse,  $V = 4(\pi abc)/3$ , onde a, b e c são os semi-eixos da elipsóide.

### **3.9 Análise do extravasamento de RNA das amostras virais tratadas com M $\beta$ CD**

Vírus Mayaro purificado (100  $\mu$ g/mL) foi tratado com 25 mM de M $\beta$ CD como descrito anteriormente ou mantido em condições semelhantes, mas sem o tratamento com a droga. Em seguida, as amostras virais foram centrifugadas com sistema Microcon para PCR, ressuspendidas em tampão TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7,5) e incubadas durante 5 minutos a 4°C com Ribogreen (Molecular Probes) de acordo com as instruções do fabricante. Decorrido este tempo, as amostras foram analisadas no espectrofluorímetro utilizando o comprimento de onda de excitação de 480 nm e a emissão foi adquirida de 500 nm a 600 nm.

### **3.10 Análise do conteúdo de RNA viral das células tratadas com M $\beta$ CD**

A quantificação do RNA viral foi realizada utilizando-se a técnica de RT-PCR em tempo real. Os ensaios foram realizados utilizando-se 10<sup>6</sup> células aderidas em placa de 6 poços e infectadas com 10<sup>6</sup> partículas virais infecciosas (MOI: 1). Realizamos a extração do RNA total das células. As amostras foram homogeneizadas em 500  $\mu$ L de Trizol (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, EUA). As amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 12.000 g, a 4°C, o

sobrenadante foi retirado e passado para um novo tubo. Esse tubo foi deixado à temperatura ambiente por 5 minutos, e posteriormente 100 µL de clorofórmio foram acrescentados aos sobrenadantes. Após 3 minutos à temperatura ambiente, as amostras foram novamente centrifugadas por 15 minutos a 12.000 g, a 4°C. A fase aquosa (superior) foi retirada, o mesmo volume de isopropanol foi acrescentado à mesma e as amostras foram incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, os tubos foram centrifugados por mais 15 minutos a 12.000 g, a 4°C, o isopropanol foi então desprezado e, aos precipitados que surgiram, foram acrescentados entre 20-40 µL de água. O RNA total, aproximadamente 1 µg, foi então tratado com DNase I (Invitrogen Co.) por 15 minutos em temperatura ambiente, da seguinte forma: 1 µg do RNA; 1 µL da DNase I (1 U/µL); 1 µL do tampão DNase I (10X); 7 µL H<sub>2</sub>O DEPC (volume final de 9 µL). Após os 30 minutos, foi acrescentado 2 µL de EDTA (25 mM) e as amostras incubadas a 65 °C por 10 minutos para desnaturar a DNase I.

Para a síntese da primeira fita de cDNA, foram utilizados 11 µL do produto obtido previamente, acrescentando 1 µL de dNTPs 10 mM e 1 µL de iniciadores senso e anti-senso específicos para o RNA da GAPDH e do Dengue, sendo 0,5 µg/µL de cada iniciador. As amostras foram então incubadas por 5 minutos a 65°C, incubadas em gelo por 1 minuto e uma

mistura de reação contendo 2  $\mu\text{L}$  do tampão da enzima 10X, 4  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  25 mM e 2  $\mu\text{L}$  de DTT 0,1 M foi adicionada em cada tubo. As amostras foram novamente incubadas, dessa vez a 42 °C por 2 minutos. Nessa etapa, 1  $\mu\text{L}$  da enzima SuperScript II<sup>®</sup> Transcriptase Reversa foi adicionada e, as amostras incubadas a 42 °C por 50 minutos e depois a 70 °C por 15 minutos. Ao final dos 15 minutos, foram então colocadas no gelo por 1 minuto e 1  $\mu\text{L}$  da enzima RNase H (2U/ $\mu\text{L}$ ) foi adicionado, quando incubou-se a 37 °C por 30 minutos. Esse protocolo é o sugerido pelo fabricante do kit SuperScriptII<sup>®</sup> First-Strand Synthesis System (Invitrogen Corporation). No final da reação, as amostras foram guardadas no freezer (- 20 °C).

Com o cDNA sintetizado, foram montadas as reações de PCR (reação de polimerase em cadeia) com o protocolo sugerido no kit (SuperScriptII<sup>®</sup> First-Strand Synthesis System , Invitrogen): 2,5  $\mu\text{L}$  de tampão da enzima TAQ 10X, 0,5  $\mu\text{L}$  de dNTP 10 mM, 0,5  $\mu\text{L}$  de TAQ (5 U/ $\mu\text{L}$ ), 2  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  25 mM, 2  $\mu\text{L}$  de cDNA, 1  $\mu\text{L}$  do iniciador e 1  $\mu\text{L}$  do iniciador anti-senso. Como controle positivo interno, foram montadas reações com um par de iniciadores de GAPDH e, como negativo, reações que não continham o cDNA. Os iniciadores usados no PCR semi-quantitativo foram desenhados com base nas seqüências de GAPDH (5'-CATCCTGCACCACCAACTGCTTAG-3',5'-GCCTGCTTCACCACCTTCTTGATG-3') e do vírus da Dengue (DI 5'-

TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG-3', TS2 5'-  
CGCCACAAGGGCCATGAACAG-3'). O programa utilizado para a reação de PCR seguiu as seguintes condições: 94 °C por 2 minutos; 40 ciclos a 94 °C por 30 segundos (desnaturação); 60 °C (pareamento) por 30 segundos; 68 °C por 30 segundos (alongamento) e para finalizar 68 °C por 2 min, sendo tudo realizado no termociclador GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems).

Ao final do PCR, um gel de agarose 2% contendo brometo de etídeo (2 mg/mL) foi corrido em tampão TAE 1X (TRIS-acetato 40 mM, EDTA 1 mM), utilizando-se 10 µL dos produtos de PCR e 2 µL de tampão de amostra (glicerol 50%, EDTA 1 mM, azul de bromofenol 0,25% (p/v) e xilenocianol 0,25% (p/v)). O padrão utilizado foi o Ladder 100 bp (Invitrogen).

O PCR em tempo real foi feito utilizando as primeiras fitas testadas conforme descrito, da seguinte forma: 12,5 µL de SYBR green PCR Master Mix (Applied Biosystems); 5 µL de cDNA diluído 100 X; 0,4 µL do iniciador senso; 0,4 µL do iniciador anti-senso e 6,7 µL de água, num total de 25 µL finais de reação. Triplicatas do controle negativo, o qual não continha cDNA, do controle interno com oligonucleotídeos iniciadores de GAPDH e do vírus da Dengue foram feitas. O programa seguido foi 95°C por 10 min; 45 ciclos a

95°C por 15 seg.; 60°C por 1 min, sendo o mesmo realizado no termociclador 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems).

A expressão relativa do DENV é calculada usando o GAPDH como normalizador. Os valores obtidos foram utilizados para construção de gráficos utilizando o programa Prism 4.0.

### **3.11 Análise da fase lipídica do envelope viral e das células infectadas**

O nível de empacotamento do envelope viral e das células infectadas foi avaliado através da fluorescência do Laurdan (2-dimetilamino-6-lauroil naftaleno) (Molecular Probes). O Laurdan é um marcador comumente usado para estudar a fluidez de membranas devido ao seu grande momento de dipolo no estado excitado, resultando na sua capacidade de nos revelar o grau de penetração da água dentro da bicamada lipídica (Sanchez & Gratton, 2005). Outros estudos já demonstraram a correlação entre o grau de penetração da água na bicamada com o empacotamento lipídico e a fluidez da membrana (Parasassi e cols., 1991; Parasassi & Gratton, 1995; Bagatolli e cols., 2003). Esta sonda lipofílica se insere paralelamente às caudas hidrofóbicas dos fosfolipídios em membranas, exibindo um desvio no seu espectro de emissão para o azul com o aumento da condensação das mesmas, causado por uma

alteração do momento dipolar da sonda como consequência da exclusão de moléculas de água da bicamada lipídica (Gaus e cols., 2006). Desta forma, variações no conteúdo de água da membrana promovem mudanças no espectro de emissão do Laurdan.

Assim, as amostras virais (100 µg/mL) foram incubadas com 20 µM de Laurdan por 20 minutos a 4°C e analisadas no espectrofluorímetro modelo ISSPC (ISS Inc., Champaign, IL). As amostras foram excitadas em 360 nm e a emissão de fluorescência foi adquirida de 380 nm a 600 nm. O ensaio foi realizado a 37°C sob agitação constante. O valor de polarização generalizada (GP) foi calculado em função da intensidade emissão de fluorescência em 440nm e 490nm, baseado na equação abaixo:

$$GP_{\text{corr}} = (I_{(440)} - G \times I_{(490)}) / (I_{(440)} + G \times I_{(490)}),$$

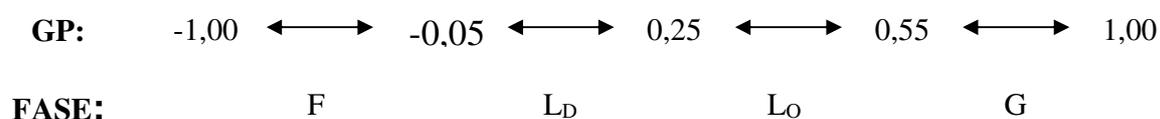
onde,

$$G = (GP_{\text{theo}} + GP_{\text{theo}} \times GP_{\text{exp}} - 1 - GP_{\text{exp}}) / (GP_{\text{theo}} \times GP_{\text{exp}} - GP_{\text{theo}} + GP_{\text{exp}} - 1),$$

onde, o  $GP_{\text{theo}}$  corresponde ao valor de GP conhecido em uma solução padrão de Laurdan em DMSO a 22°C (0,207) e  $GP_{\text{exp}}$  corresponde ao valor de GP determinado experimentalmente (Gaus e cols., 2006).

A quantificação da organização da membrana é expressa por valores de polarização generalizada (GP) definidos como razões de intensidades de dois canais de emissão. Os valores de GP variam de -1 (membranas mais fluidas) a

+1 (membranas mais condensadas). O Laurdan se distribui igualmente em membranas fluidas ou condensadas e não se associa com ácidos graxos ou grupos polares de fosfolipídios específicos (Bagatolli e cols., 2003); os valores de GP refletem, portanto, a estrutura geral da membrana e não uma composição lipídica ou protéica específica (Harris e cols., 2002). Os limites de valores de GP para diferentes fases lipídicas já foram estimados utilizando-se lipossomos com composições similares àquelas da membrana e já foram ratificados em experimentos utilizando células de mamíferos (Gaus e cols., 2003). Em tais lipossomos, valores de GP menores que  $-0,05$  e maiores que  $0,55$  são representativos de membranas nas fases fluida e gel, respectivamente, enquanto que valores entre  $-0,05$  e  $0,25$  e entre  $0,25$  e  $0,55$  correspondem a domínios líquido-desordenados (não-rafts) e domínios líquido-ordenados (rafts), respectivamente (Dietrich e cols., 2001). A figura 7 resume melhor estes valores com as suas respectivas fases de membrana:



**Figura 7: Respective valores de GP e suas fases de membrana correspondentes:** F - fase fluida, L<sub>D</sub> - fase líquido-desordenada, L<sub>O</sub> - fase líquido-ordenada e G - fase gel.

Os experimentos utilizando células infectadas foram realizados no microscópio ZEISS LSM 510 META (ZEISS, Alemanha). Células Vero foram crescidas em lamínulas de vidro até atingirem a semi confluência. As células vivas foram lavadas e marcadas com 20  $\mu$ M de Laurdan por 20 minutos a 37°C. Para a aquisição das imagens de fluorescência do Laurdan usamos excitação com dois fótons (two-photon excitation) em 780 nm com o laser de titânio-safira (Mai Tai, Spectra Physics). As imagens das células vivas marcadas e infectadas foram adquiridas com objetiva de imersão em óleo de aumento de 40x. As intensidades das imagens de Laurdan foram capturadas simultaneamente em dois canais utilizando o detector META com a emissão variando de 400-460 nm e 470-530 para os dois canais, respectivamente. A sensibilidade relativa dos dois canais foi determinada com 20  $\mu$ M de Laurdan em DMSO para cada experimento, a partir do qual foi calculado o fator G. Devido ao efeito da temperatura sobre a mudança de fase da membrana, as imagens foram capturadas com controle da temperatura em 37°C.

As análises das imagens foram feitas convertendo-as para 8 bits, usando o programa IMAGE J. O valor de GP foi calculado para cada pixel utilizando as imagens de intensidade do Laurdan nos dois canais ( $I_{400-460}$  e  $I_{470-530}$ ) com o auxílio do programa SimFcs, cedido gentilmente pelo professor Enrico Gratton (University of California at Irvine). As imagens de GP (imagens de 8

bits) foram pseudocoloridas utilizando este mesmo programa. Os valores de “background” foram definidos como valores abaixo de 7% da intensidade máxima (Gaus e cols., 2003).

A excitação por dois fótons é um processo não linear no qual um cromóforo absorve simultaneamente dois fótons incidentes. A energia do par de fótons deveria ser igual à energia necessária para a excitação. Assim, cada fóton fornecerá metade da energia. A probabilidade para este processo ocorrer é muito baixa de acordo com o princípio da incerteza de Eisenberg (Sanchez & Gratton, 2005). Para aumentar a probabilidade de absorção por dois fótons, nós podemos aumentar a densidade de excitação ou o fluxo de fótons que chega até a amostra. Isto é conseguido através de uma fonte de laser pulsátil com intervalos de femto a picosegundos. Além disso, é preciso concentrar os fótons através de uma objetiva de alta abertura numérica que condensará a luz e a densidade máxima de fótons ocorrerá no seu volume focal onde encontraremos uma intensidade alta o bastante para a excitação por dois fótons ocorrer. Algumas das grandes vantagens da excitação por dois fótons são o reduzido dano fotoquímico da amostra que otimiza o tempo de observação e a diminuição do *bleaching*. Outra grande vantagem se deve ao fato que o comprimento de onda de excitação e de emissão são bem diferentes, afastados, resultando em uma baixa marcação de fundo (*background*).

### **3.12 Efeito da infecção viral sobre a síntese de colesterol *de novo***

Células Vero confluentes foram incubadas com o vírus da Dengue (MOI=1) por 90 minutos ou deixadas em condições semelhantes (controle sem vírus). Decorrido este tempo, a monocamada de células foi lavada a fim de retirar as partículas não aderidas e adicionou-se meio contendo 200  $\mu\text{Ci}$  de  $^3\text{H}$ -acetato (Perkin-Elmer, Waltham, MA). Após 72 horas de infecção coletamos as células para extração dos lipídios. A extração lipídica foi realizada de acordo com o método descrito por Bligh e Dyer, 1959 por 2 horas em tubo contendo 5 mL de uma solução de clorofórmio-metanol-água (2:1:0,8) sob agitação com intervalos de 10 minutos. A mistura foi centrifugada a 1500 g por 15 minutos. O sobrenadante foi coletado e o precipitado foi submetido a uma segunda extração lipídica durante 1 hora. Os sobrenadantes resultantes das duas extrações foram misturados com 5 mL de água e 5 mL de clorofórmio. A mistura foi agitada vigorosamente e centrifugada nas mesmas condições. Após a centrifugação, a fase orgânica foi removida e seca em atmosfera de nitrogênio. O conteúdo de lipídios totais foi determinado gravimetricamente. Os lipídios extraídos foram analisados em uma cromatografia em camada fina (TLC) unidimensional em uma placa de sílica (Merck, Darmstadt, Alemanha) utilizando um coquetel de solventes para

lipídios neutros (hexano-éter etílico-ácido acético, 60:40:1) (Kawooya & Law, 1988). Em seguida identificamos as bandas correspondentes ao colesterol e ao colesterol esterificado com o auxílio de padrões lipídicos (Sigma Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA) que correram em paralelo. Após a identificação dos lipídios por vapor de iodo, realizamos a determinação da radioatividade através da exposição da TLC a uma tela de captura de radiações ionizantes e subsequente quantificação da radioatividade no STORM (GE Healthcare).

### **3.13 Ensaio de extravasamento de conteúdo aquoso**

Filmes lipídicos foram preparados dissolvendo fosfolipídios selecionados em diferentes proporções em clorofórmio, seguido de sua evaporação através de um fluxo de nitrogênio e vácuo durante toda a noite. Vesículas multilamelares são então obtidas após ressuspender este filme lipídico no tampão Tris 10 mM/ NaCl 100 mM, pH 7,4, e passadas em um extrusor para a obtenção de vesículas unilamelares.

Lipossomos marcados com as sondas fluorescentes DPX/ANTS (Molecular Probes) foram preparados visando à análise de extravasamento (leakage) de conteúdo aquoso, resultado da lise, fusão ou permeabilidade fisiológica. O ANTS é uma sonda normalmente utilizada em combinação com

o supressor colisional catiônico DPX em ensaios de permeabilidade e fusão de membranas. A fusão dos vírus com os lipossomos resulta na separação espacial das sondas DPX e ANTS, e o DPX deixa, então, de exercer seu papel de supressor colisional, permitindo a fluorescência da sonda ANTS. As vesículas marcadas foram obtidas após separação do material não encapsulado por gel filtração em uma coluna GPC300 (SynChropack, Micra Scientific, Inc).

Todos os experimentos foram realizados a 37°C sob agitação constante e com uma concentração de vírus de 100 µg/mL. Os lipossomos eram compostos de diferentes proporções de fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), esfingomiéline (SPM) e colesterol (CHO) (Avanti Polar Lipids). As medições foram feitas a partir de 0,7 mL de amostra em tampão HNE (Hepes 50 mM, NaCl 150 mM e EDTA 0,1 mM, pH 7,5) com uma concentração final de fosfolipídios de 1 mM. A interação vírus-lipossomos foi induzida a partir da adição de um pequeno volume pré-titulado de MES 0,1 M e ácido acético 0,2 M.

Os espectros de fluorescência foram obtidos a partir da excitação a 353 nm e leitura da emissão do ANTS em 523 nm. A ausência de extravasamento foi obtida a partir da fluorescência das vesículas no tempo zero (0%) e o 100% de extravasamento foi obtido após a adição de 1% (v/v) do detergente Triton

X-100. A porcentagem de permeabilização pode ser calculada a partir da equação a seguir:

$$\% \text{ Extravasamento} = [(F-F_0)(F_t-F_0)] \times 100$$

onde F é a intensidade de fluorescência após a adição do vírus, F<sub>0</sub> é a fluorescência inicial da suspensão de lipossomo e F<sub>t</sub> é a fluorescência após a adição de Triton X-100.

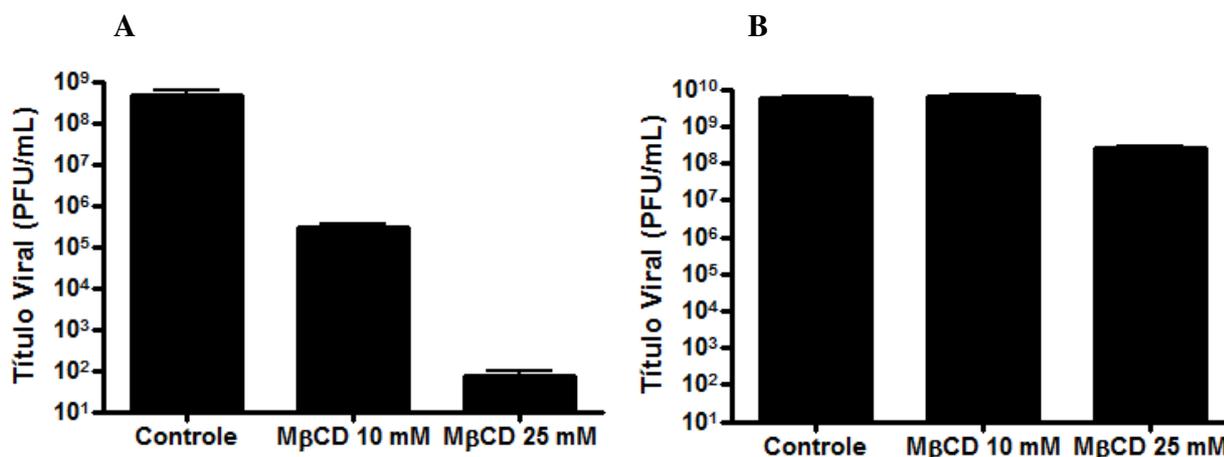
## **4 RESULTADOS**

### **PARTE I**

**A infecção pelo vírus Mayaro altera a organização lipídica da membrana e o colesterol presente em seu envelope é essencial para a manutenção de sua atividade biológica e estrutural**

#### **4.1 Tratamento do vírus Mayaro com M $\beta$ CD retira o colesterol do envelope viral e reduz a infecciosidade**

Antes de avaliarmos o papel do colesterol presente no envelope na infecção do vírus Mayaro, nós tratamos as amostras virais purificadas com diferentes concentrações de M $\beta$ CD por 30 minutos para a remoção do colesterol. Para evitarmos o efeito da M $\beta$ CD sobre a membrana celular, após o tratamento nós removemos a ciclodextrina como descrito em “material e métodos” antes de colocarmos o vírus em contato com as células. Este procedimento não modifica o título viral. Como verificado na figura 8A, a exposição à M $\beta$ CD resultou em uma inibição dose dependente na infecciosidade do vírus Mayaro obtido a partir de BHK-21. A adição de 10 mM promoveu uma diminuição de 3 logs no título viral. No entanto, quando o vírus foi exposto a uma concentração maior de M $\beta$ CD, 25 mM, a queda na infecciosidade foi ainda mais pronunciada (7 logs), inibindo quase que completamente a infecção viral (Figura 8A). Quando realizamos este ensaio com vírus obtidos a partir de células de invertebrados, só conseguimos verificar algum efeito sobre a infecciosidade com 25 mM de M $\beta$ CD, onde percebemos apenas uma queda de 1 unidade logarítmica (Figura 8B).

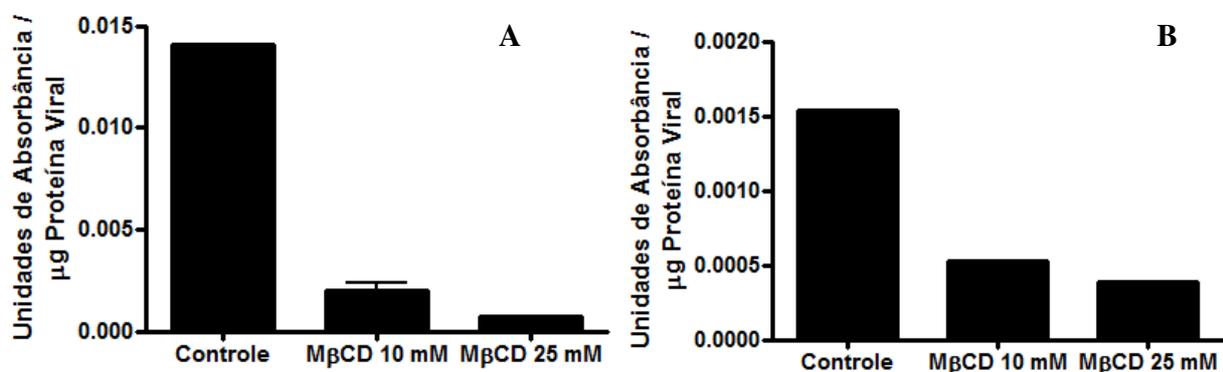


**Figura 8: Efeito da depleção de colesterol do envelope viral sobre a infecciosidade do vírus Mayaro.** Vírus Mayaro purificado a partir de BHK-21 (A) e C6/36 (B) foi tratado com 10 mM ou 25 mM de MβCD. Após o tratamento, o vírus foi submetido a uma centrifugação para a retirada da ciclodextrina antes de adicioná-los às células. O título viral foi determinado através de um ensaio de plaque utilizando células Vero e expresso na forma de unidades formadoras de plaque (UFP) por unidade de volume.

#### 4.2 Avaliação do conteúdo de colesterol do vírus Mayaro tratado com MβCD

Em seguida, nós avaliamos a retirada relativa de colesterol do envelope viral mediada pelo tratamento com MβCD. O vírus Mayaro purificado foi tratado com as mesmas concentrações de MβCD utilizadas nos ensaios de infecciosidade por 30 minutos e o conteúdo de colesterol foi determinado com o auxílio de um kit de dosagem de colesterol. Após o tratamento, o vírus Mayaro mostrou uma queda significativa de maneira dose-dependente no conteúdo de colesterol com 85% de diminuição obtido quando utilizamos 10 mM de MβCD e 95% com 25 mM de MβCD (Figura 9A). Avaliamos também

o conteúdo de colesterol dos vírus crescidos a partir de células de mosquitos (C6/36). Por não sintetizar colesterol, este é obtido apenas da dieta, refletindo a baixa concentração deste lipídio nas células de insetos. Esta baixa concentração acaba também se refletindo no conteúdo de colesterol do vírus Mayaro propagado e purificado a partir destas células (Figura 9B)

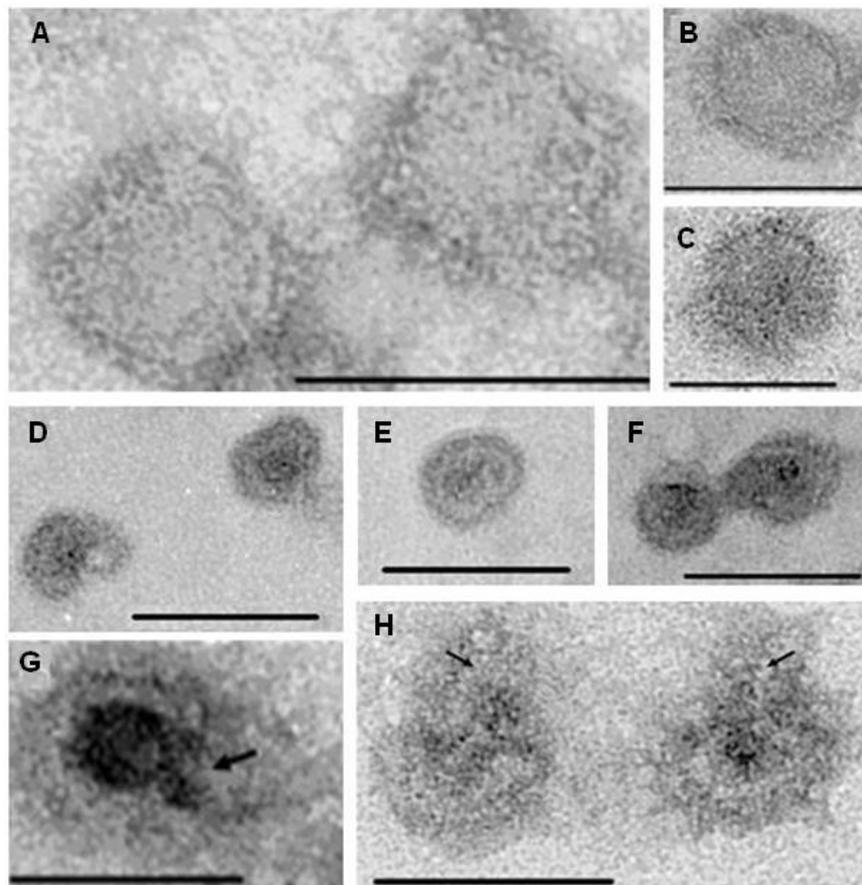


**Figura 9: Determinação do conteúdo relativo de colesterol do vírus tratado com M $\beta$ CD.** O Vírus Mayaro obtido de BHK-21 (A) ou C6/36 (B) foi pré tratado com 10 ou 25 mM de M $\beta$ CD. Os vírus foram submetidos a uma centrifugação para a retirada da M $\beta$ CD e o conteúdo de colesterol foi avaliado utilizando um kit de dosagem. O conteúdo de colesterol é refletido por unidades de absorbância.

#### 4.3 A depleção de colesterol do envelope viral afeta a sua estrutura

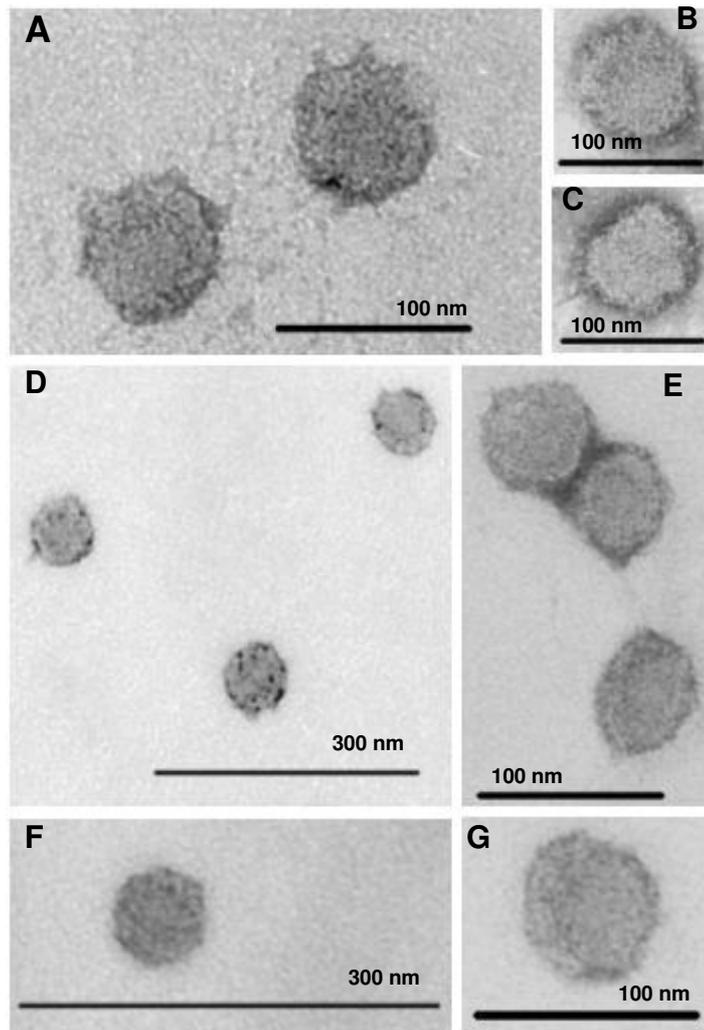
A fim de avaliarmos os efeitos da depleção do colesterol sobre a estrutura viral e tentar explicar a acentuada inibição da infecciosidade promovida pelo tratamento das partículas virais com a M $\beta$ CD, o vírus Mayaro obtido de células de vertebrados ou de invertebrados foi tratado com M $\beta$ CD e

analisado através da microscopia eletrônica de contrastação negativa (Figuras 10 e 11). Como podemos observar, a retirada do colesterol promoveu uma alteração morfológica da partícula viral, caracterizada pela desestabilização do envelope viral tratado com 10 mM de M $\beta$ CD (Figuras 10D, 10E e 10F) e uma forte permeabilização da membrana viral nos vírus tratados com 25 mM de M $\beta$ CD (Figuras 10G e 10H), melhor observado na figura 10G pela formação de uma grande abertura nesta estrutura. Além disso, as partículas virais expostas a 25 mM de M $\beta$ CD parecem estar vazias, como representado pela ausência do seu respectivo nucleocapsídeo em seu interior (Figura 10G). Corroborando esta idéia, próximo às partículas permeabilizadas, algumas micrografias obtidas com os vírus tratados nesta concentração mostravam a presença de estruturas semelhantes ao nucleocapsídeo, mas desprovidas do envelope viral. Nós observamos também, a partir destas aberturas, a projeção de algumas estruturas (possivelmente RNA) dos vírus cujo tratamento com M $\beta$ CD não leva a liberação dos nucleocapsídeos virais.



**Figura 10: Efeito do tratamento com M $\beta$ CD sobre a morfologia viral (BHK21) avaliado por microscopia eletrônica.** Vírus Mayaro purificado obtido de células BHK-21 foi pré-tratado com 10 (D, E e F) ou 25 mM (G e H) de M $\beta$ CD ou mantido em condições semelhantes, mas sem o tratamento com a droga (A, B e C) preparados para a contrastação negativa e analisados por microscopia eletrônica de transmissão. A seta no painel G indica o ponto de abertura no envelope viral, enquanto a seta no painel H indica o ponto de possível liberação do RNA viral das partículas permeabilizadas. As barras são de 100 nm.

Diferentemente ao observado para os vírus obtidos a partir das células de vertebrados, as imagens realizadas com vírus purificados a partir de C6/36 não revelaram grandes alterações na partícula viral, inclusive com concentrações (25 mM de M $\beta$ CD) que provocaram uma grande alteração morfológica no vírus Mayaro obtido de BHK-21 (Figura 11).



**Figura 11: Efeito do tratamento com M $\beta$ CD sobre a morfologia viral (C6/36) avaliado por microscopia eletrônica.** Vírus Mayaro purificado obtido de células C6/36 foi pré-tratado com 10 (D e F) ou 25 mM (E e G) de M $\beta$ CD ou mantido em condições semelhantes, mas sem o tratamento com a droga (A, B e C) preparados para a contrastação negativa e analisados por microscopia eletrônica de transmissão.

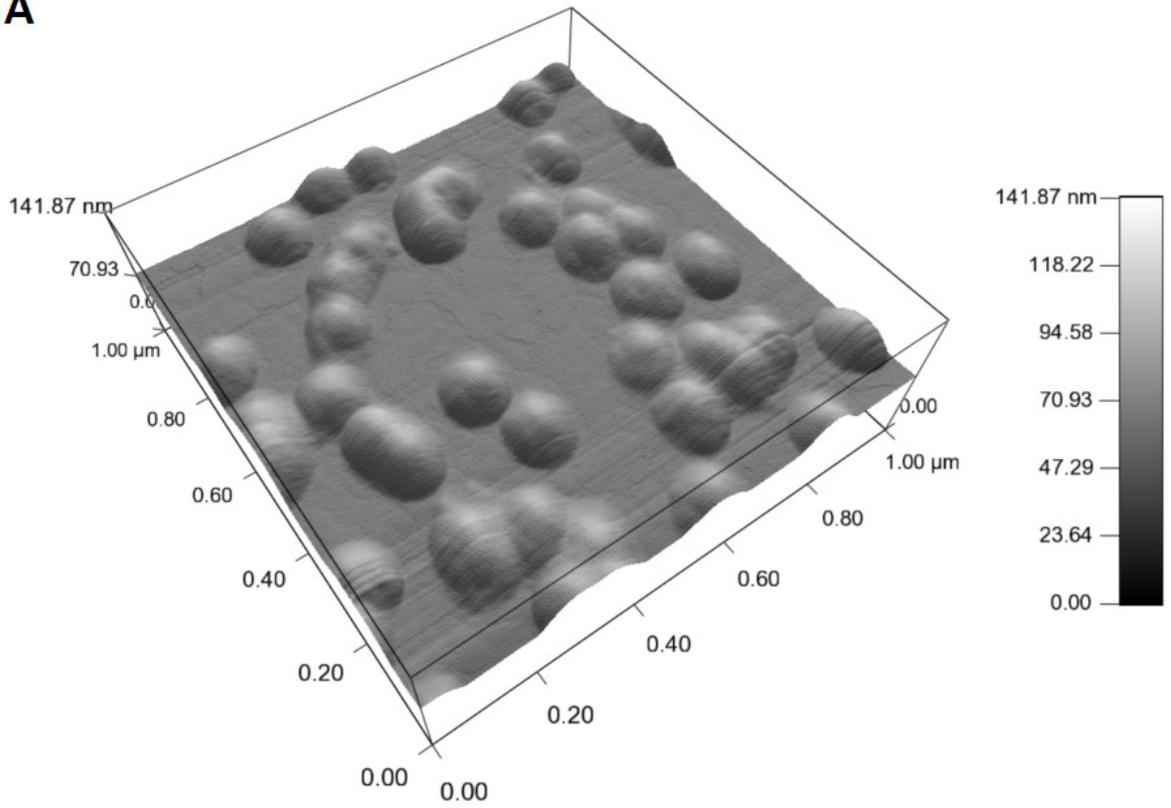
Os efeitos da depleção do colesterol sobre a integridade viral também foram avaliados pela microscopia de força atômica (AFM) (Figura 12). Uma vez que é descrito na literatura que o vírus Mayaro apresenta uma simetria icosaédrica e um diâmetro de 70 nm (Mezencio & Rebello, 1993), as partículas visualizadas com esta técnica apresentaram um achatamento estranho, visto que a sua altura está reduzida, enquanto o seu comprimento e a sua largura estão aumentados (Figura 12A e Tabela 1). A forma adquirida pela partícula remete a uma elipsóide, mas este fato parece ser devido a um artefato inerente ao processo de imobilização da partícula vira na superfície de mica (Moloney e cols., 2002).

**Tabela 1: Dimensões da partícula do vírus Mayaro através de microscopia de força atômica.**

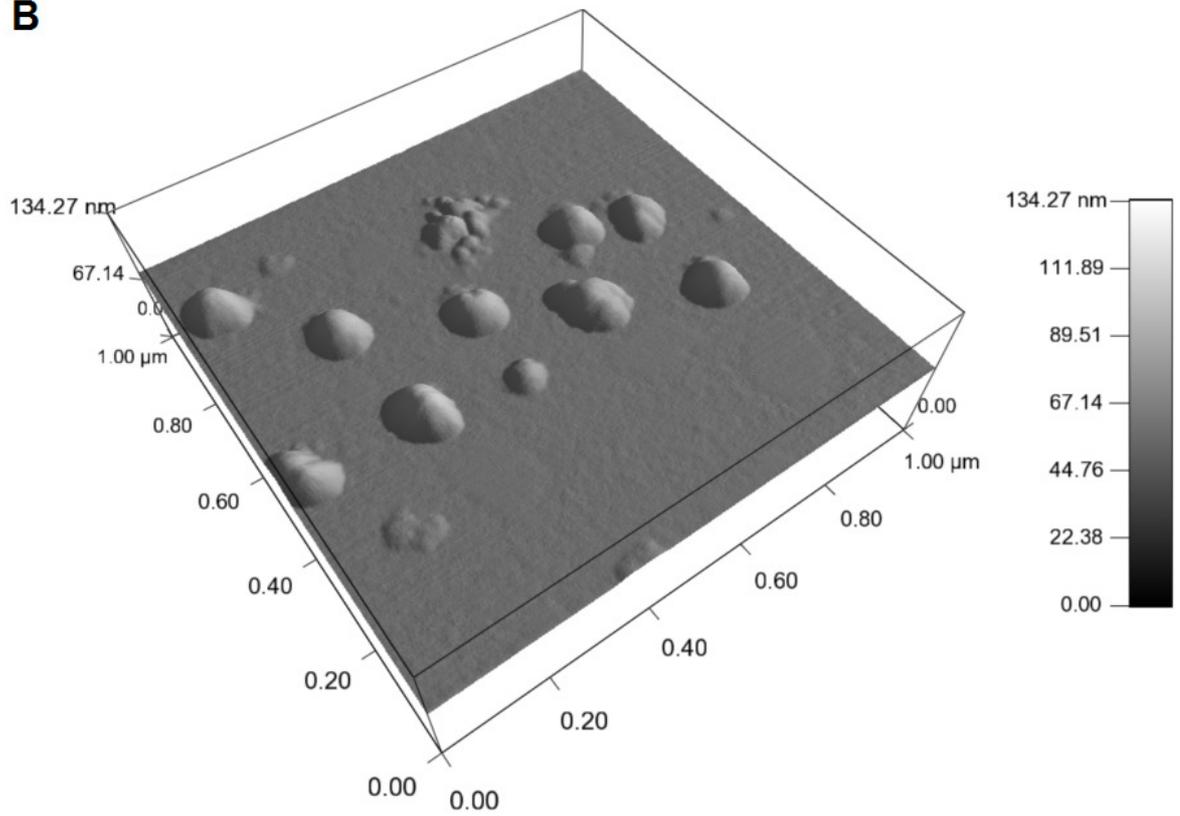
<i>Amostras virais</i>	<i>Comprimento (nm)</i>	<i>Largura (nm)</i>	<i>Altura (nm)</i>
Controle	122.33 ± 2.72	100.25 ± 2.63	20.75 ± 0.67
10 mM MβCD	126.11 ± 9.04	101.56 ± 4.40	19.44 ± 1.41
25 mM MβCD	95.22 ± 8.20	75.56 ± 7.28	18.89 ± 1.04

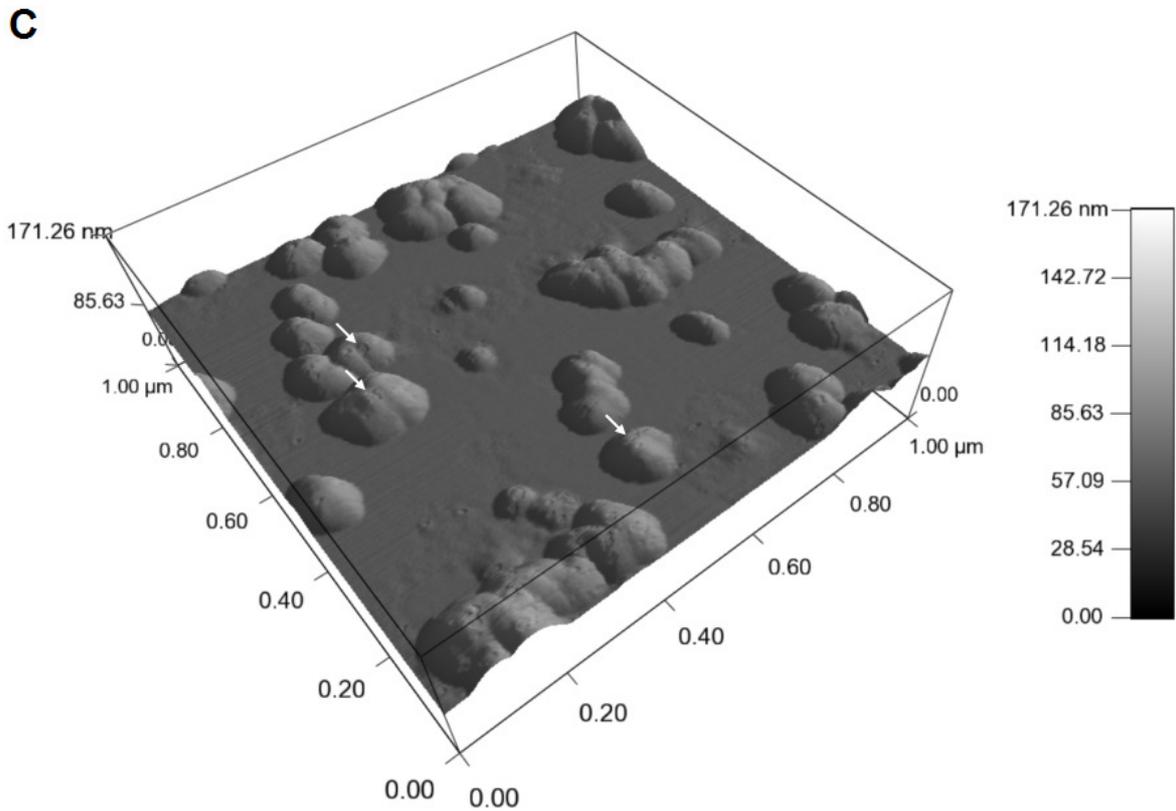
No entanto, houve uma correlação entre as informações obtidas com a microscopia eletrônica e as de força atômica, como evidenciado pela desestabilização do envelope viral após o tratamento com 10 mM de MβCD (Figura 12B) e a forte permeabilização da membrana viral com 25 mM MβCD, representado pela formação de verdadeiros buracos na estrutura viral (Figura 12C).

**A**



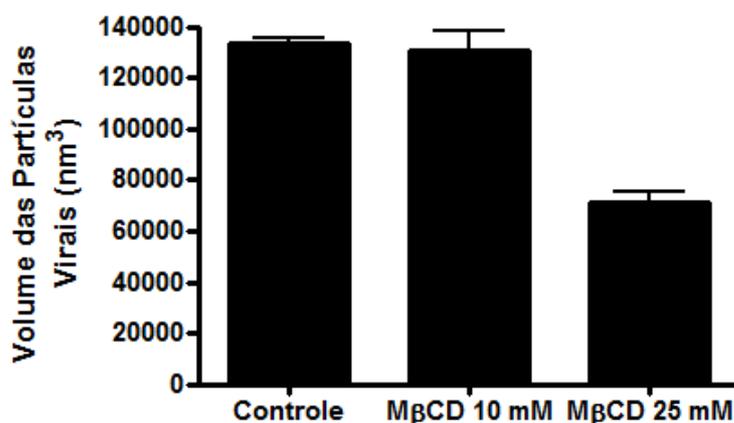
**B**





**Figura 12: Efeito do tratamento com MβCD avaliado por microscopia de força atômica.** O vírus Mayaro purificado foi pré-tratado com 10 (B) ou 25 mM (C) de MβCD ou mantido em condições semelhantes às partículas tratadas, mas sem o tratamento (A). Em seguida, o vírus foi adsorvido em uma superfície de mica e analisado em um microscópio de força atômica operando no modo de contato intermitente. A seta em C indica os “buracos” no envelope viral.

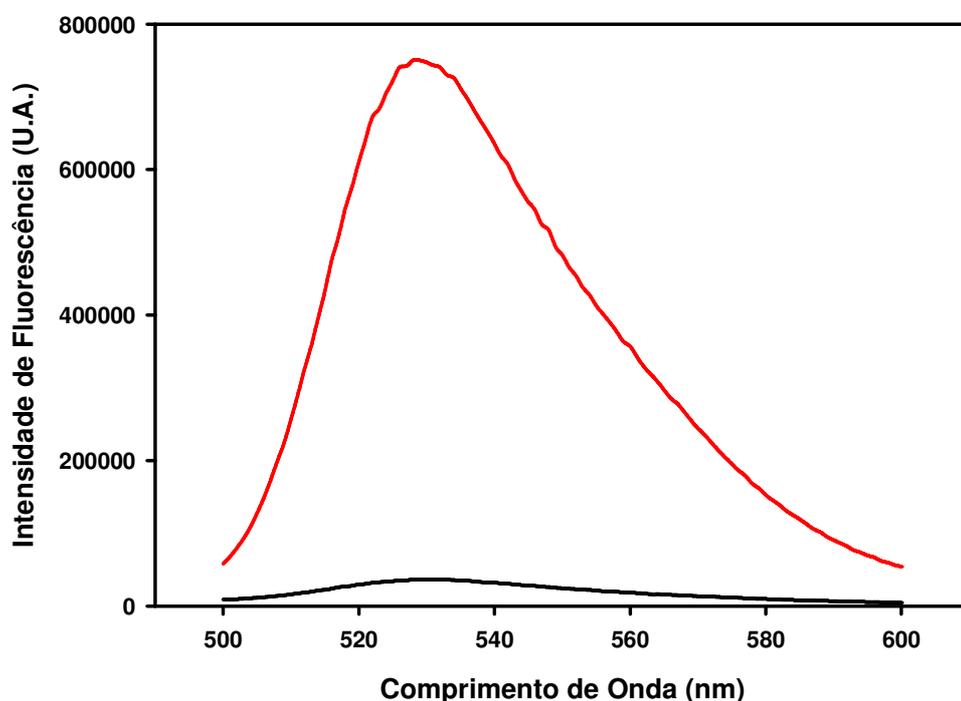
Além disso, o tratamento com a M $\beta$ CD levou a mudanças nas dimensões da partícula viral (Tabela 1), resultando na diminuição do volume desta partícula (Figura 13), como avaliado pelas medidas obtidas a partir das imagens de microscopia de força atômica. A diminuição deste volume que foi mais pronunciada com o tratamento de 25 mM de M $\beta$ CD e a presença de materiais amorfos ao redor da partícula viral sugere que esta diminuição possa ser resultado do extravasamento de componentes internos da partícula (Figura 12C).



**Figura 13: Determinação do volume da partícula viral em função do tratamento com M $\beta$ CD.** O volume das partículas virais foi determinado usando as dimensões das imagens obtidas da microscopia de força atômica mostradas na tabela 1. Os volumes foram calculados para uma elipsóide, como descrito em “material e métodos”.

#### **4.4 A depleção de colesterol no envelope viral promove a formação de aberturas por onde o RNA viral é liberado**

A fim de verificarmos se o material amorfo ao redor das partículas virais visualizados nas imagens de AFM era RNA viral e se os “buracos” formados no envelope viral após o tratamento com 25 mM de M $\beta$ CD poderia ser um ponto de saída deste RNA, realizamos um ensaio com a sonda fluorescente RiboGreen. Esta sonda apresenta uma alta sensibilidade para a detecção de RNA em solução. Desta forma, após o tratamento com 25 mM de M $\beta$ CD do vírus Mayaro, realizamos o ensaio de ligação com o RiboGreen. Para a nossa surpresa, o tratamento com esta concentração de M $\beta$ CD promoveu um grande extravasamento de RNA viral para o meio exterior (Figura 14). Assim, as aberturas formadas na membrana viral após o tratamento com M $\beta$ CD parecem ser suficientes para a saída do material genético viral.

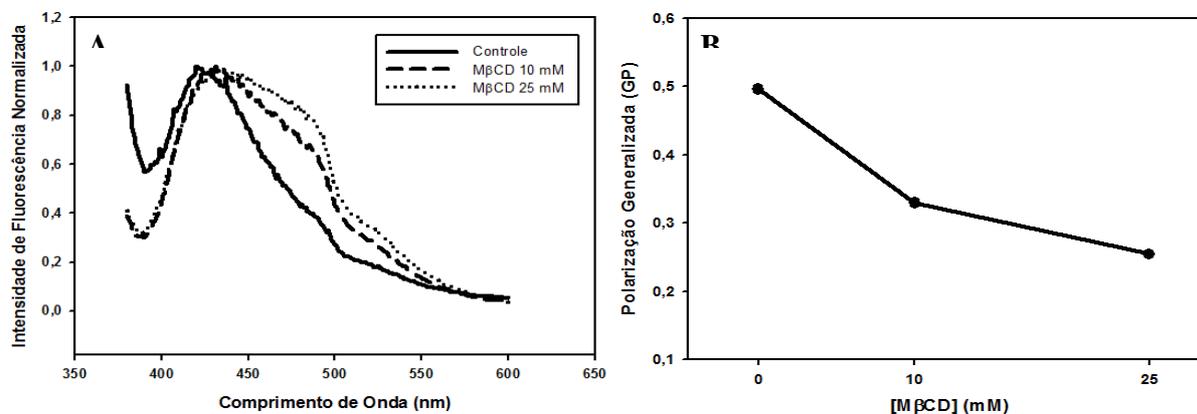


**Figura 14: Avaliação do RNA viral após tratamento com M $\beta$ CD.** Vírus Mayaro purificado foi tratado com 25 mM de M $\beta$ CD. Após o tratamento, a partícula viral foi centrifugada e incubada com o Ribogreen por 5 minutos a 4°C e analisada no espectrofluorímetro. As amostras foram excitadas em 480 nm e a emissão foi adquirida de 500 nm a 600 nm. A concentração de vírus utilizada foi de 100  $\mu$ g/mL. (—) Vírus Mayaro controle mantido em condições semelhantes ao vírus tratado, mas sem a presença da droga. (—) Vírus Mayaro tratado com 25 mM de M $\beta$ CD.

#### 4.5 A depleção de colesterol do envelope do Vírus Mayaro promove a desorganização da membrana viral

Em virtude do alto conteúdo de colesterol no envelope do vírus Mayaro, nós avaliamos a possibilidade da existência de domínios altamente ordenados nesta membrana, bem como o efeito da depleção do colesterol a partir do envelope sobre o grau de organização do mesmo. Para isto, utilizamos a sonda

Laurdan que nos fornece parâmetros acerca das mudanças nas propriedades de fase de membrana pela sua sensibilidade à polaridade do meio onde se encontra, neste caso, o envelope viral. Assim, conforme mostrado na figura 15, a depleção de colesterol do envelope viral pela incubação com 10 ou 25 mM de M $\beta$ CD promove um desvio de ~10 e ~15 nm, respectivamente, no espectro de emissão do Laurdan para o vermelho, indicando que o colesterol presente no envelope do Vírus Mayaro está relacionado a um certo grau de ordem em tal estrutura (Figura 15A). Interessantemente, a análise dos valores de polarização generalizada (Figura 15B) reporta a presença de uma fase altamente ordenada no envelope da partícula que não sofreu tratamento (GP = 0,49), que apresenta uma queda significativa do grau de ordem em função do tratamento com M $\beta$ CD (GP = 0,33 e GP = 0,25 com 10 mM e 25 mM de concentração de M $\beta$ CD, respectivamente), sugerindo que o colesterol pode estar associado à formação de domínios de membrana semelhante às rafts no envelope do vírus Mayaro.

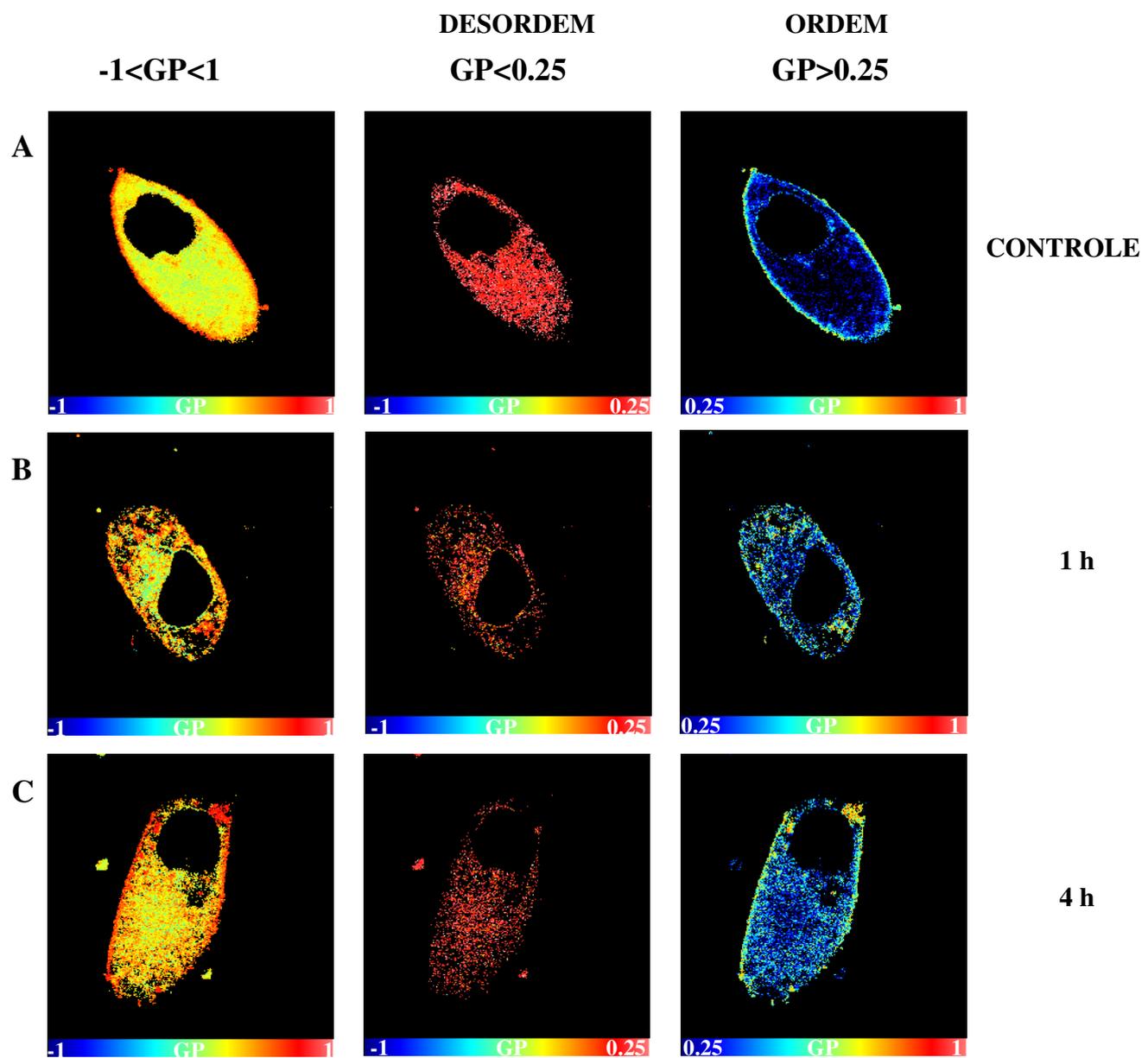


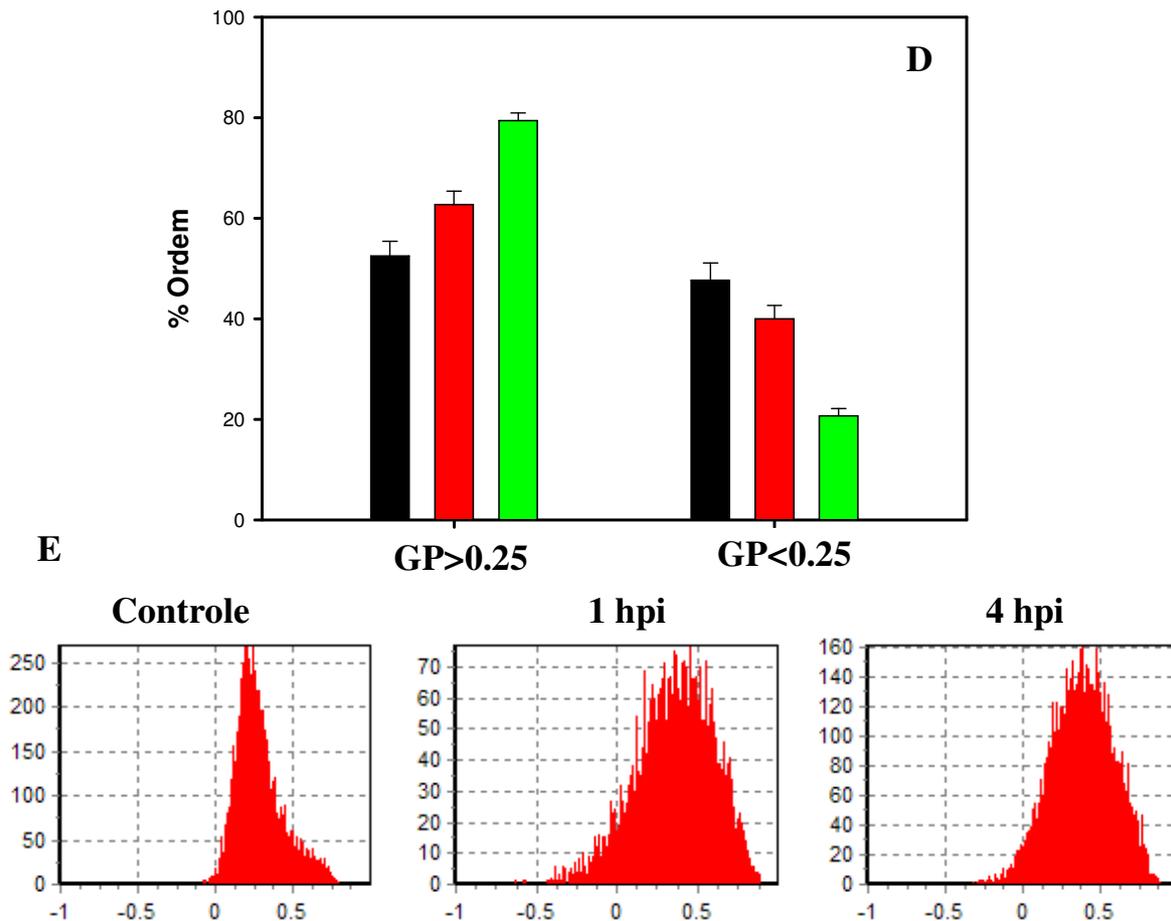
**Figura 15: Efeito da depleção de colesterol sobre a organização do envelope viral. (A)** O vírus Mayaro purificado foi tratado com 10 ou 25 mM de MβCD a 37°C por 30 minutos ou foi submetido às mesmas condições das amostras virais tratadas, mas sem a presença da mesma. Após o tratamento, a ciclodextrina foi removida por centrifugação em um filtro *Microcon*, conforme descrito em “material e métodos”. Este mesmo procedimento também foi realizado com a amostra controle. As amostras virais foram então incubadas com 20 μM de Laurdan a 4°C por 1 h, sendo posteriormente submetidas a análises espectrofluorimétricas, a 37°C. A excitação das amostras ocorreu em 360 nm e a emissão foi captada de 380 a 600 nm. A concentração final de vírus foi de 100 μg/mL. **(B)** Gráfico dos valores de GP calculados a partir dos valores de intensidade referentes à emissão de fluorescência em 440 nm e 490 nm.

#### 4.6 A infecção pelo vírus Mayaro promove um aumento na organização da membrana celular

Devido à grande importância do colesterol durante o ciclo replicativo dos alfavírus (Ahn e cols., 2002; Kielian & Helenius, 1984; Smit e cols., 1999; Phalen & Kielian, 1991; Lu e cols., 1999; Vanshishtha e cols., 1998; Umashankar e cols., 2008), decidimos avaliar o efeito da infecção pelo vírus Mayaro sobre a organização lipídica das células infectadas com o auxílio da

sonda Laurdan. Assim, conforme mostrado na figura 16, imagens de células Vero infectadas com vírus Mayaro após 1 hora mostraram um leve aumento nos valores de GP quando comparadas às células controle (Figuras 16A, 16B e 16D). Decorridas 4 horas após a infecção, percebemos um aumento em regiões ordenadas nestas células (Figuras 16C e 16D) e uma diminuição no grau de desordem. Esta mudança no nível de empacotamento da membrana também pode ser confirmada pela análise dos histogramas das imagens das células marcadas com Laurdan, que apresentam uma distribuição Gaussiana (Figura 16E). Nestes histogramas, percebemos um desvio para regiões cujo valor de GP são maiores, portanto, mais organizadas nas imagens de células infectadas quando comparamos com as que não foram infectadas com o vírus Mayaro. Também é possível observar um alargamento da distribuição de pixels dos histogramas. Estes resultados sugerem um aumento no grau de empacotamento das células infectadas com o vírus Mayaro.





**Figura 16: Efeito da infecção com o Vírus Mayaro sobre a organização lipídica das células infectadas.** Células Vero foram infectadas com o vírus Mayaro (MOI=10) durante 1 h ou 4 h a 37°C ou mantidas em condições semelhantes, mas sem o passo de infecção (controle). Em seguida, as células vivas foram lavadas e marcadas com 20  $\mu$ M de Laurdan a 37°C por 20 minutos e levadas para visualização por microscopia de fluorescência através da excitação por 2 fótons com temperatura controlada a 37°C. As imagens foram obtidas com excitação em 780 nm e captadas pelo detector META em dois canais. (A), (B), (C) são imagens de GP das células controle, 1 h e 4 h pós-infecção, respectivamente. As imagens revelam a intensidade do Laurdan e a escala de cores nos fornece a distribuição dos valores de GP nestas imagens que foram pseudocoloridas com o uso do SimFCS (Dr. Enrico Gratton, Universidade da Califórnia) (D) Gráfico de barras mostrando a distribuição dos valores de GP para diferentes células em experimentos independentes. O controle está mostrado em preto, 1 hora pós-infecção (hpi) em vermelho e 4 hpi em verde. (E) Análise da distribuição dos pixels das imagens das células marcadas com Laurdan com centro de GP em 0,28 (controle), 0,35 (1 hpi) e 0,38 (4 hpi). Outras condições ver material e métodos.

## **PARTE II**

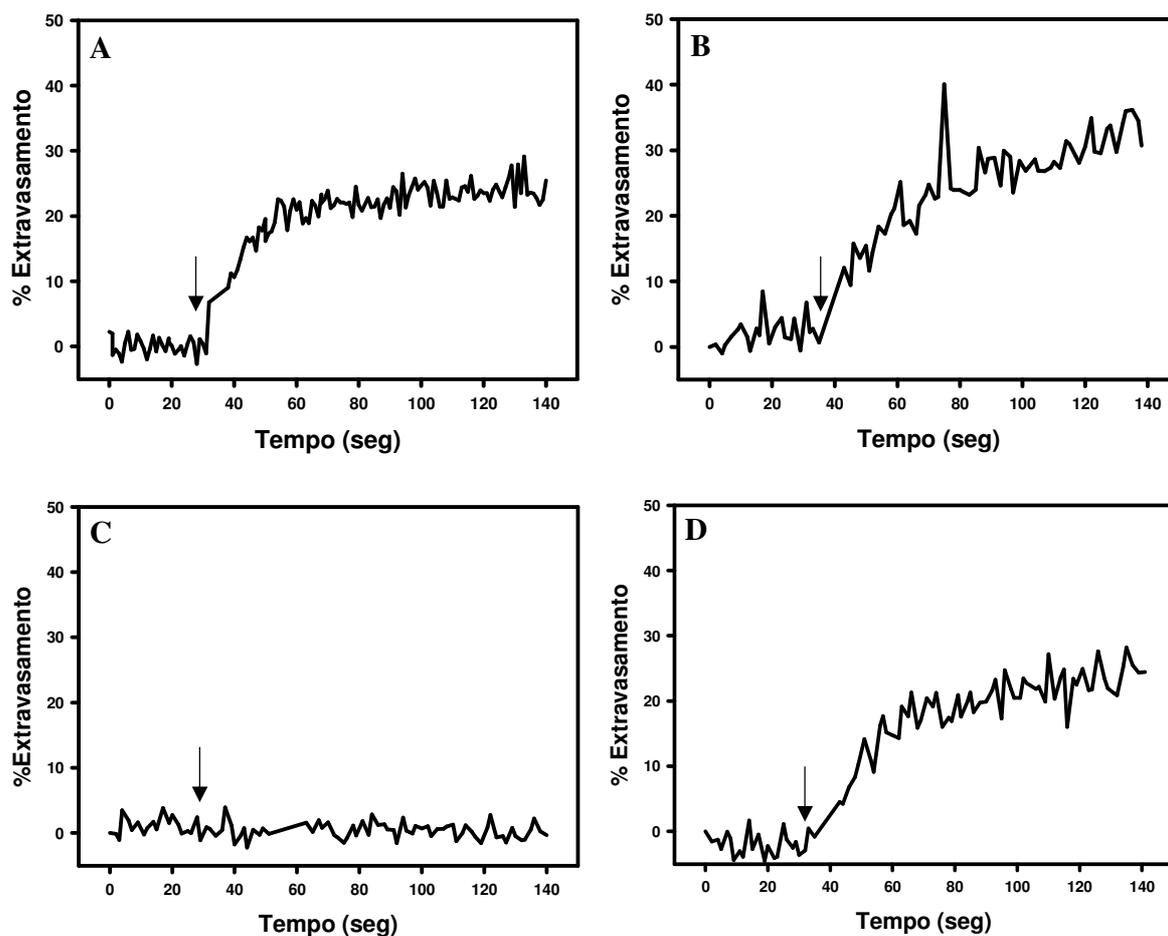
# **O colesterol durante o ciclo replicativo do vírus da Dengue**

#### **4.7 O vírus da Dengue funde eficientemente com membranas artificiais contendo colesterol**

Na tentativa de desvendar a necessidade de colesterol e lipídeos específicos na membrana alvo para o processo de fusão, o vírus da Dengue (DENV) foi purificado, através de uma adaptação do protocolo de purificação estabelecido por Kunh e colaboradores (2002), e medidas espectroscópicas utilizando o modelo lipossomal DPX/ANTS foram realizadas. O DPX atua como supressor da fluorescência do ANTS, e portanto, a fluorescência da sonda ANTS é suprimida pelo DPX quando ambos estão encapsulados a concentração adequada em um mesmo lipossomo. Sendo assim, vesículas lipídicas marcadas com as sondas DPX/ANTS foram preparadas com diferentes proporções e composições lipídicas, e utilizados nas medidas espectroscópicas, onde a fusão do DENV com os lipossomos resultava na perda da supressão da fluorescência da sonda ANTS pelo DPX.

A análise de extravasamento de conteúdo aquoso permitiu verificar que o vírus da Dengue fusionou de maneira eficiente com lipossomos livres de receptores, contendo colesterol e fosfolipídios, indicando que a interação com o receptor não parece ser um mecanismo necessário para a fusão (nos ensaios *in vitro*) (Figura 17). Na presença de diferentes concentrações de colesterol, a

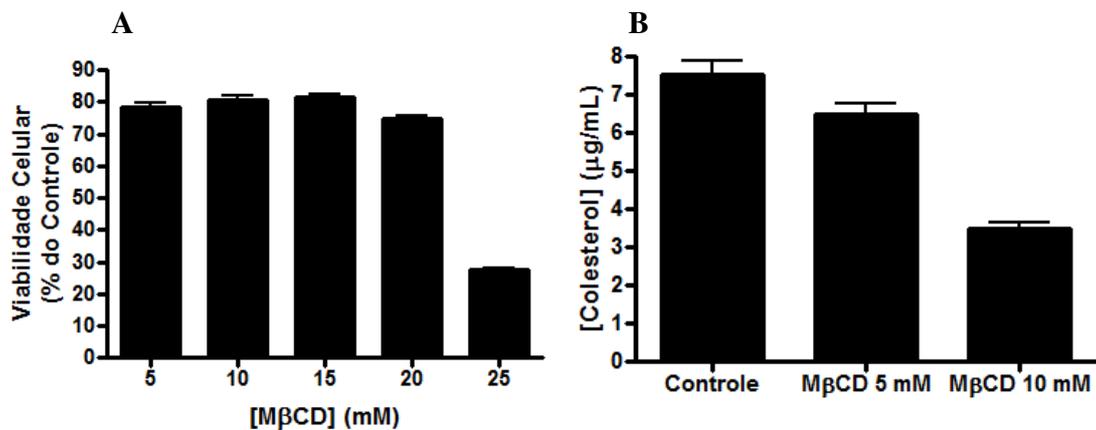
fusão mediada pelo vírus da Dengue mostrou uma eficiência de 30 a 40% (Figuras 17A e 17B). No entanto, quando reduzimos drasticamente o conteúdo deste lipídio não verificamos uma interação significativa (Figura 17C). Interessantemente, quando retiramos a esfingomiéline da membrana alvo não percebemos alterações no processo de fusão (Figura 17D). Estes resultados sugerem um importante papel do colesterol na fusão do vírus da Dengue com membranas artificiais.



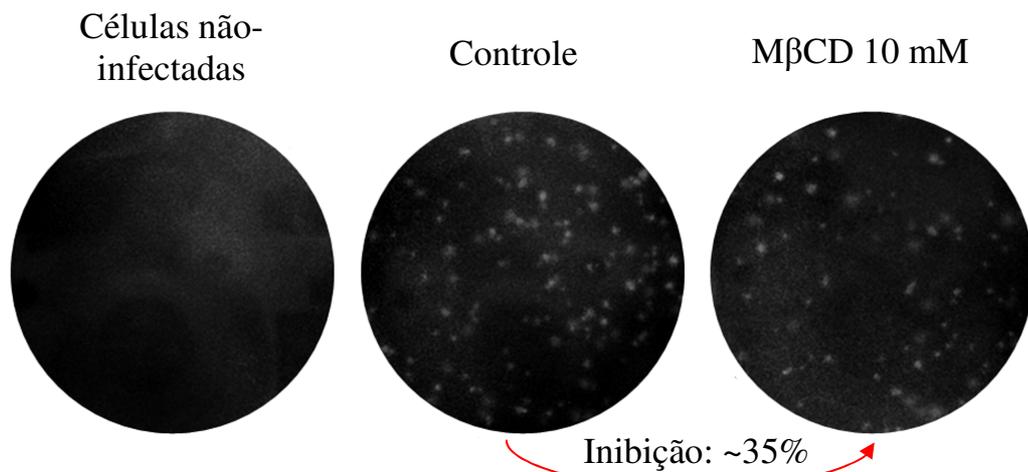
**Figura 17: Fusão do vírus da Dengue-2 com lipossomos (DPX/ANTS).** A fusão do vírus da dengue com diferentes lipossomos foi monitorada através da utilização de vesículas marcadas com as sondas fluorescentes DPX/ANTS. Um pequeno volume pré-titulado de MES 0,1 M e ácido acético 0,2 M foi adicionado em um volume final de 0,7 mL para que o pH final da solução fosse 5,5 a fim de induzir o processo de fusão. A fusão das vesículas resulta na liberação da supressão da sonda ANTS monitorada em 523 nm, com excitação em 353 nm. As medidas foram realizadas a 37°C e sob agitação constante. A concentração viral foi de 100 µg/mL. (A) PC: PE: SPM: CHO (1:1:1:1.5), (B) PC: PE: SPM: CHO (1:1:1:3). (C) PC: PE: SPM: CHO (1:1:1:0.2), (D), PC: PE: CHO (1:1:1.5). As setas indicam o momento da acidificação das veículas.

#### **4.8 A redução do conteúdo de colesterol da célula hospedeira afeta a infecção pelo vírus da Dengue**

Conhecendo a importância do colesterol no processo de fusão do vírus da Dengue com membranas artificiais, decidimos avaliar o seu efeito em células infectadas. Antes de verificarmos a importância do colesterol na infecção pelo vírus da dengue, nós incubamos as células Vero com M $\beta$ CD para a retirada do colesterol e avaliamos a sua citotoxicidade sobre estas células. O efeito da droga foi observado através do ensaio de MTT e a viabilidade celular medida não difere significativamente do controle até a concentração de 15 mM da droga (Figura 18A). Portanto, nós decidimos usar 10 mM da droga em nossos ensaios. Para demonstrarmos a eficiente depleção de colesterol pela M $\beta$ CD, nós medimos o conteúdo de colesterol da célula após o tratamento com a droga. Assim, a incubação com 10 mM de M $\beta$ CD reduziu o conteúdo do colesterol celular em aproximadamente 50% (Figura 18B).



**Figura 18: Depleção de colesterol de células Vero.** (A) Células Vero aderentes foram incubadas com as concentrações indicadas de MβCD a 37°C por 30 min e submetidas à análise de viabilidade por meio do ensaio de redução de MTT. (B) Monocamadas de células Vero foram incubadas com 5 ou 10 mM de MβCD a 37°C por 30 min (MβCD 5 ou 10 mM) ou foram incubadas com DMEM (Controle). As células foram então coletadas, precipitadas e submetidas à determinação do conteúdo de colesterol. A quantidade de células utilizada foi de  $10^6$ .



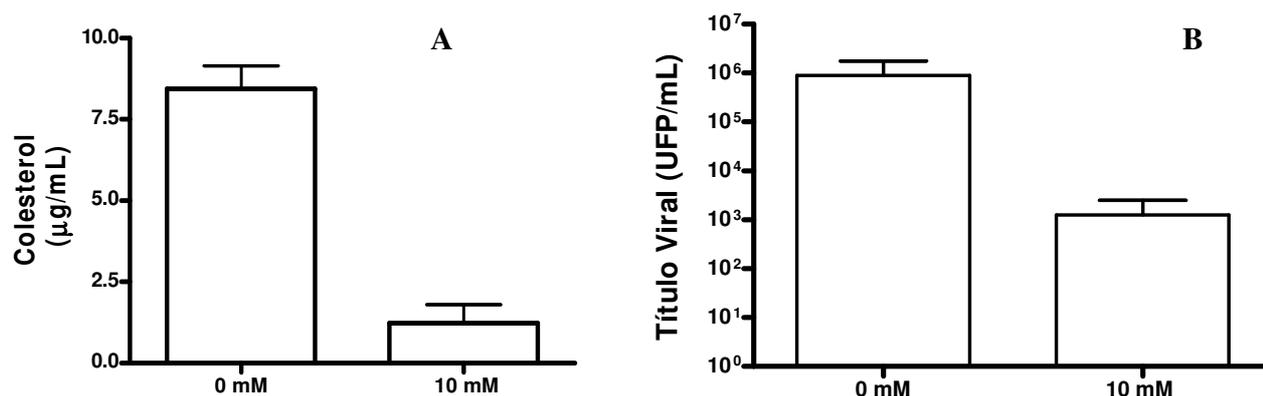
**Figura 19: Efeito da depleção de colesterol celular na infecção viral.** Monocamadas de células Vero aderentes foram tratadas com MβCD 10 mM a 37°C por 30 min ou foram tratadas com DMEM apenas, como controle. Após o tratamento, a ciclodextrina foi removida por sucessivas lavagens com PBS. As células foram então infectadas sob igual MOI com o DENV-2 e coradas com solução de cristal violeta 7 dias após a infecção.

Recentemente, alguns trabalhos mostraram que a entrada e a replicação do vírus da Dengue poderia ser inibida pela depleção de colesterol (Lee e cols., 2008). No entanto, demonstrou-se também que a infecção por este mesmo vírus poderia ser independente de colesterol (Umashankar e cols., 2008). Assim, para investigar se o colesterol é essencial para a entrada do vírus da Dengue em células Vero, nós depletamos colesterol com 10 mM M $\beta$ CD e as infectamos com uma MOI de 1. Como demonstrado na figura 19, a eficiência de infecção do vírus da Dengue nestas células sofreu uma leve queda de aproximadamente 35%. Estes resultados confirmam que a entrada do DENV é dependente do conteúdo de colesterol na membrana destas células.

#### **4.9 A retirada do colesterol do envelope do vírus da Dengue afeta a sua infecciosidade e organização lipídica**

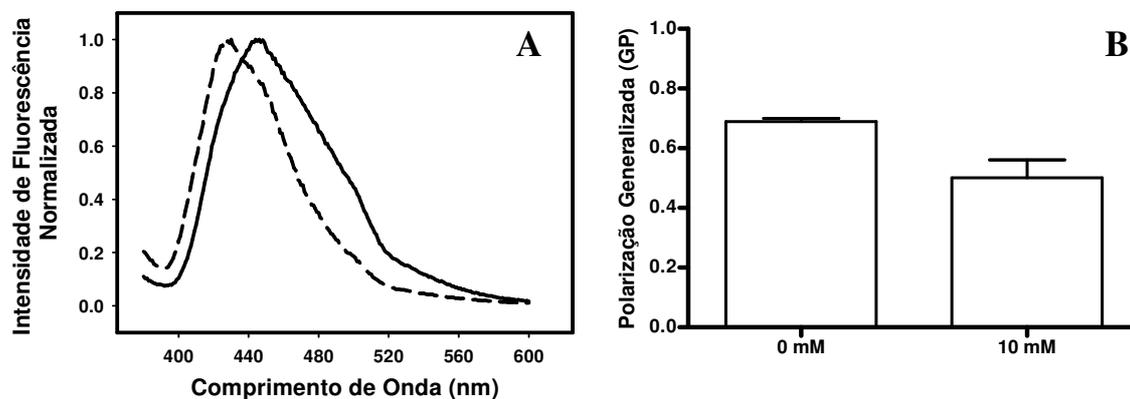
Além de investigar a importância do colesterol celular no ciclo de infecção do vírus da Dengue, nós decidimos também avaliar se o colesterol presente no envelope viral desempenharia um papel crucial na infecciosidade viral. Desta forma, o vírus da Dengue foi tratado com 10 mM de M $\beta$ CD por 30 minutos a 37°C, e verificamos uma significativa depleção do colesterol, com redução de até 80% da concentração na membrana do DENV (Figura

20A). A queda no conteúdo de colesterol também se refletiu na infecciosidade da partícula viral, onde uma diminuição de até 3 logs foi verificada nas amostras tratadas com a M $\beta$ CD (Figura 20B).



**Figura 20: Avaliação do conteúdo de colesterol presente no envelope do vírus da dengue e o efeito de sua depleção sobre a infecciosidade viral. (A)** A concentração do conteúdo de colesterol presente no envelope lipídico viral foi determinada por ensaios enzimáticos utilizando o kit de dosagem Amplex Red. Os vírus foram tratados com 0 ou 10 mM de M $\beta$ CD por 30 minutos a 37°C, quando então a droga foi retirada por centrifugação, e estes ressuspensos em tampão de reação. Os vírus foram então incubados com Amplex Red, a 37°C por 30 minutos. **(B).** O título viral foi determinado por ensaio de plaque e está expresso como unidades formadoras de placa/mL. Os vírus foram tratados com 0 ou 10 mM de M $\beta$ CD por 30 minutos a 37°C e em seguida centrifugados para a retirada da M $\beta$ CD.

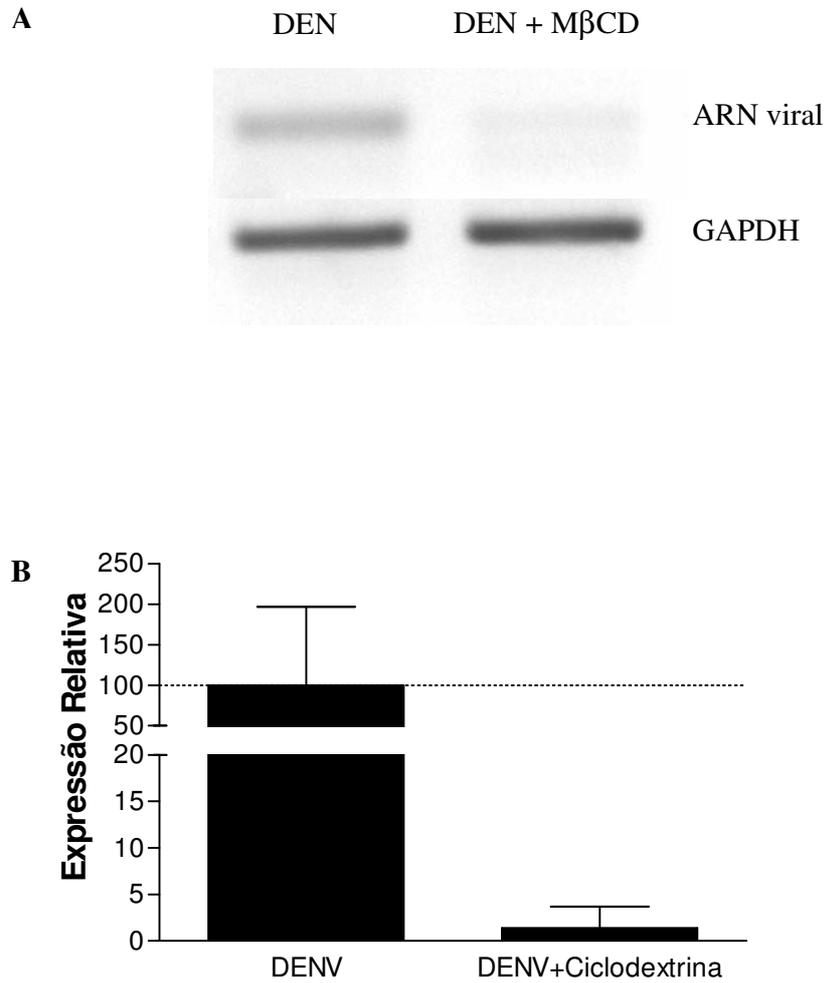
Visando avaliar o efeito da depleção de colesterol na membrana viral, o vírus DENV foi tratado com 10 mM de M $\beta$ CD e teve o grau de fluidez de seu envelope lipídico avaliado utilizando a sonda Laurdan (Figura 21). De fato, a diminuição do conteúdo de colesterol da membrana viral mostrou-se capaz de desestruturá-lo, levando a bicamada a uma conformação mais desordenada, como visualizado pelo desvio no espectro do Laurdan e pelos valores de GP (Figuras 21A e 21B).



**Figura 21: Efeito da depleção de colesterol do envelope viral do vírus da DENV.** O vírus purificado foi tratado com 0 (tracejado) ou 10 mM (cheio) de M $\beta$ CD, por 30 minutos a 37°C, quando então a droga foi removida por centrifugação e o vírus incubado com 20  $\mu$ M de Laurdan por 30 minutos. As amostras foram analisadas em função da fluorescência (A), com excitação em 360 nm e emissão de 380 a 600 nm, e do valor de polarização generalizada (GP) (B). Os experimentos foram realizados a 37°C, e a concentração viral utilizada foi de 100  $\mu$ g/mL.

#### **4.10 A diminuição do conteúdo de colesterol das células Vero bloqueia a liberação do RNA viral**

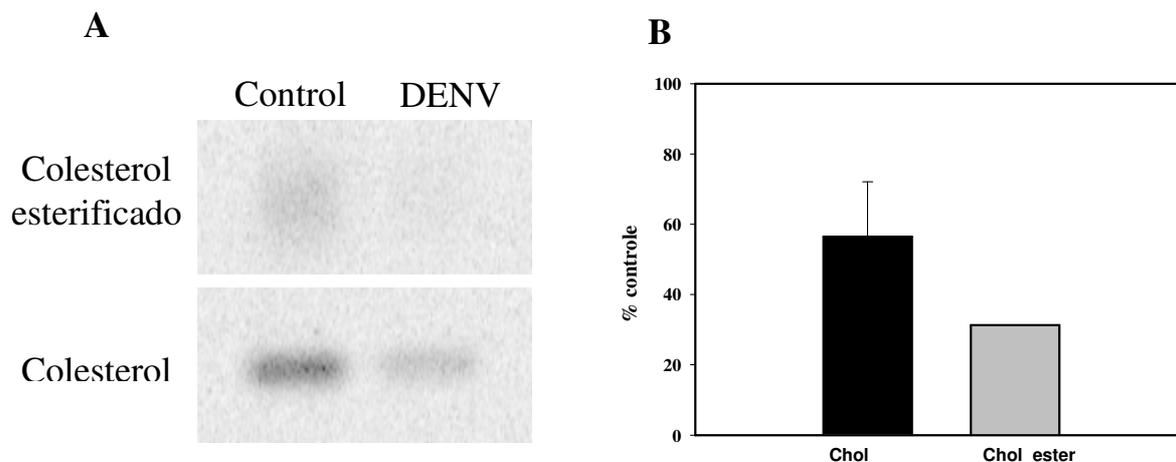
Sabendo que o colesterol é um lipídio importante nos eventos iniciais de internalização do vírus da dengue, decidimos verificar o efeito da depleção de colesterol de células Vero sobre o conteúdo de RNA viral intracelular após 72 h de infecção. Assim o RNA viral intracelular foi coletado e analisado por RT-PCR em tempo real. Nossos resultados mostram que após o tratamento das células com 10 mM de M $\beta$ CD há uma queda de mais de 95% no conteúdo de RNA viral, demonstrando que o colesterol celular parece ser um componente importante não só para a internalização da partícula, mas também para o processo de replicação (Figura 22).



**Figura 22: A depleção de colesterol afeta a liberação do RNA viral.** Células Vero foram tratadas com 10 mM de M $\beta$ CD a 37°C por 30 minutos e incubadas com DEN (MOI=1) por 90 minutos. Após 72 horas de infecção, o RNA total foi isolado e analisado pelo ensaio de RT-PCR para o RNA do DEN e GAPDH como descrito em “material e métodos”. (A) Gel referente ao RNA viral (vírus tratado ou não com M $\beta$ CD) e do GAPDH. (B) Expressão relativa do RNA viral das amostras tratadas ou não com M $\beta$ CD.

#### **4.11 A infecção pelo vírus da Dengue afeta o metabolismo do colesterol**

Os resultados descritos acima revelam e confirmam a importância do colesterol não só no processo de entrada da partícula viral no interior da célula hospedeira e na interação com lipossomos, mas também o seu efeito no processo de replicação. Além disso, o colesterol presente no envelope viral mostrou ser necessário para a infecciosidade da partícula e na manutenção da organização da membrana. Por fim, decidimos analisar o efeito da infecção sobre a síntese de colesterol *de novo* no interior das células. Assim, células Vero marcadas com acetato-<sup>3</sup>H foram infectadas com o vírus da Dengue e após 72 horas de infecção a quantidade de acetato-<sup>3</sup>H incorporado nas novas moléculas de colesterol sintetizadas a partir da infecção foram quantificadas (Figura 23). Concomitantemente, também percebemos uma diminuição no conteúdo do colesterol esterificado. Apesar da importância do colesterol em várias etapas do ciclo replicativo viral, surpreendentemente, o vírus da Dengue após 72 horas de infecção em células Vero induz uma diminuição na biossíntese *de novo* de colesterol.



**Figura 23: Efeito da infecção sobre o biossíntese de colesterol.** Células Vero foram adsorvidas com o vírus da Dengue (MOI=1) e após 90 minutos adicionou-se meio contendo 200  $\mu\text{Ci/mL}$  de  $^3\text{H}$ -acetato. Após 72 horas, os lipídios totais foram isolados e analisados em uma cromatografia de camada fina para lipídios neutros (TLC). A cromatografia foi exposta a uma tela que capta radiação ionizante e analisada em um Storm. **(A)** Imagem ilustrativa da referente à incorporação de trítio no colesterol e no colesterol esterificado. **(B)** Análise densitométrica referente às bandas do colesterol e colesterol esterificado de experimentos independentes.

## 5 DISCUSSÃO

Neste trabalho nós buscamos avaliar a importância do colesterol durante o ciclo replicativo de dois importantes gêneros virais: os flavivírus e os alfavírus, avaliando o papel deste lipídio na manutenção do envelope viral, bem como os efeitos da infecção sobre o metabolismo de colesterol. Nossos resultados mostram uma dependência da presença deste lipídio no envelope viral para a atividade biológica do vírus Mayaro e do vírus da Dengue.

Inúmeros trabalhos descrevem a importância do colesterol e esfingolipídios para o processo de fusão dos SFV e Sindbis (Kielian & Helenius, 1984; Phalen & Kielian, 1991; Smit e cols., 1999; Lu e cols., 1999). Assim como os alfavírus, os flavivírus também mostram uma certa dependência de colesterol para o processo de fusão, mas não tem sido observado o mesmo para a esfingomielina (Corver e cols., 2000; Gollins & Porterfield, 1986; Stiasny e cols., 2003). O colesterol e a esfingomielina promoveriam a ligação à membrana alvo e a trimerização da proteína de fusão presente no envelope viral (E1 – alfavírus, E – flavivírus) através do grupamento 3- $\beta$ -hidroxil destes lipídios (Bron e cols., 1993; Lu e cols., 1999; Smit e cols., 1999; Corver e cols., 2000). No entanto, estes efeitos são muito mais pronunciados para os alfavírus do que para os flavivírus.

Os resultados com o vírus Mayaro mostram que a queda na infecciosidade viral verificada por nós, se deveu, principalmente, à permeabilização do envelope viral promovida pela depleção de colesterol após o tratamento com a ciclodextrina, revelando a importância deste lipídio para a manutenção da integridade da partícula viral.

No entanto, a extensão na queda de infecciosidade se mostrou bastante diferente quando comparamos os vírus obtidos a partir de células de invertebrados, que perderam apenas 15% da sua capacidade de infecção após o tratamento com a mesma concentração de M $\beta$ CD (25 mM) quando comparado às partículas obtidas a partir de células BHK-21, onde verificamos uma queda de quase 80% (Figura 8). É importante salientar que o conteúdo inicial de colesterol já é 10X menor nos vírus provenientes de células de mosquito. O percentual de retirada do colesterol é alto e leva a uma concentração muitas vezes menor do que em células de vertebrados e ainda assim essas partículas são estáveis e com uma pequena redução na infecciosidade, 15%. Apesar de possuírem conteúdos bastante diferentes de colesterol (Figura 9), uma vez que as células de mosquito não sintetizam este lipídio, provavelmente algum outro fator além do colesterol atue na manutenção do envelope viral. Vírus crescidos em células de mosquitos apresentam níveis de fosfolipídios baseados em etanolamina e colina de

71,9% e 15,1%, respectivamente, além do baixo conteúdo de colesterol (Luukkonen e cols., 1976). Já vírus crescidos em células de vertebrados apresentam 23,2% de etanolamina e 58,9% de colina (Luukkonen e cols., 1976). Se este alto conteúdo de etanolamina estiver presente no envelope das partículas produzidas a partir de células de mosquitos, isso poderia conferir uma resistência adicional ao envelope viral, visto que este fosfolipídio é capaz de formar regiões ordenadas e altamente compactadas no plano da membrana (Polozov & Gawrisch, 2004). Além disso, a formação de fase sólido-ordenada está relacionada ao alto conteúdo de PE (fosfatidiletanolamina) e este fosfolipídio apresenta baixa afinidade pelo colesterol (Huster e cols., 1998; Silvius, 2003) e alta temperatura de transição de fase gel-fluida (Niu e cols., 2002). Recentemente, demonstrou-se para o vírus Influenza que com o conteúdo reduzido de colesterol, temperatura ambiente e alta concentração de PE a fase sólido-ordenada poderia ser alcançada e que estas condições seriam importantes para a transmissão viral (Polozov e cols., 2008). Assim, um interessante paralelo pode ser traçado: vírus crescidos a partir de células de invertebrados podem apresentar um alto grau de ordem devido alto conteúdo de PE, baixo conteúdo de colesterol e baixa temperatura (28°C), o que poderia facilitar a transmissão deste vírus pelo artrópode vetor. Experimentos iniciais

obtidos por nós, demonstram a presença de regiões ordenadas no envelope de partículas do vírus Mayaro provenientes de células de invertebrados.

Além disso, interações lipídio-lipídio e lipídio-proteína no plano da membrana não devem ser desprezados. O vírus Sindbis quando se replica em ambiente com alto conteúdo de colesterol é capaz de excluir uma proteína celular chamada de CD-63 (proteína normalmente presente em endossomas tardios) do seu envelope durante o brotamento a partir da membrana plasmática. Partículas que não contêm esta proteína são 26 vezes mais infecciosas do que as que a contêm (Ng e cols., 2008). Nossos resultados não são suficientes para justificar se estes fatores são responsáveis pelo pouco ou nenhum efeito da M $\beta$ CD (25 mM) sobre o envelope lipídico nas partículas obtidas de células de invertebrados (Figura 11). O colesterol presente na membrana viral parece ser um importante componente para a manutenção da integridade da partícula. A desestruturação viral promovida pela depleção de colesterol foi também observada recentemente para o vírus Influenza A (Barman & Nayak, 2007), para o vírus da Imunodeficiência Humana tipo 1 (HIV-1) e para o vírus da Imunodeficiência de Símios (SIV) (Graham e cols., 2003). No caso do HIV e do SIV a concentração de M $\beta$ CD usada pelos autores foi muito maior do que a utilizada por nós para se conseguir um efeito

parecido, revelando um grau de compactação maior do envelope destes vírus ou uma menor estabilidade do envelope do Mayaro.

A análise do conteúdo de colesterol ainda presente na membrana viral após a incubação com concentrações aumentadas de M $\beta$ CD (25 mM) (Figura 9) pode sugerir que o colesterol presente no envelope da partícula viral pode estar em grupos diferentes. Estes dois grupos poderiam representar o colesterol que está fortemente associado com esfingomiéline e proteínas (microdomínios de membrana) (grupo minoritário), portanto com mais dificuldade de remoção e o segundo grupo, o colesterol com fraca associação com outras moléculas, livre no plano da membrana e de mais fácil remoção (grupo majoritário) (Graham e cols., 2003). Esta observação sugere que na membrana do vírus Mayaro existiria microdomínios de membrana semelhantes aos “rafts lipídicos” e regiões sem a presença destes microdomínios, semelhante ao que acontece nas membranas celulares. Curiosamente, o modelo de remoção verificado nos vírus obtidos a partir de células de mosquito, células cujo conteúdo de colesterol é bem inferior, mostra um padrão diferente (Figuras 9A e 9B), assim como o título viral (Figura 8B). A queda na infecciosidade verificada por nós correlaciona muito bem com a permeabilização viral, sugerindo que a infecciosidade da partícula é quase que completamente perdida (decréscimo de 95%) (Figura 8A) após a

depleção do grupo minoritário de colesterol presente na membrana. Além disso, os buracos formados na membrana são pontuais e não destroem a membrana de uma maneira geral (Figura 10G). Semelhante ao proposto para o HIV e SIV (Graham e cols., 2003), o vírus Mayaro poderia carregar em seu envelope verdadeiras “placas de cisão”. Estas placas poderiam representar os “rafts” lipídicos presentes na membrana do vírus que estariam envolvidos na manutenção da estrutura viral e na fusão da partícula com a sua célula hospedeira. Apesar dos nossos resultados não nos permitirem afirmar se estes pontos de permeabilização seriam populados pelo colesterol do grupo minoritário e por conseguinte, os rafts presentes na membrana viral, os resultados de GP apontam a grande organização destas membranas e a redução desta organização (queda de GP) (Figura 16) correlaciona-se diretamente com os efeitos observados na partícula e de perda de infecciosidade. Desta forma, podemos sugerir fortemente a presença de domínios de membrana nestes envelopes virais. É importante salientar que a queda na infecciosidade após a remoção do colesterol é provavelmente devido a uma combinação de fatores: perda de colesterol associado à partícula, inibição da fusão, perda do RNA viral e destruição de algumas partículas. A presença de regiões altamente especializadas em membranas virais também já

foi visto para o HIV e para o vírus do Sarcoma de Rous (Graham e cols., 2003; Craven e cols., 1995).

Os experimentos de microscopia de força atômica nos mostraram alterações nas dimensões e no volume da partícula viral sugerindo que a permeabilização promovida pela depleção do colesterol do envelope viral induziria a formação de buracos que funcionariam como ponto de escape de componentes internos da partícula (Figura 13 e Tabela 1). De fato, nas amostras tratadas com M $\beta$ CD (25 mM) verificou-se uma quantidade de RNA viral livre muito maior que nas partículas íntegras (Figura 14). Nós não sabemos se além do material genético viral, algum outro componente interno da partícula é extravasado.

A presença de um alto conteúdo de colesterol na membrana dos alfavírus pode ser justificada pela necessidade deste lipídio para o eficiente brotamento a partir da membrana plasmática da célula hospedeira (Lu e cols., 1999; Marquardt e cols., 1993). De uma maneira geral, a composição lipídica da membrana viral reflete a da célula hospedeira. Apesar de algumas células apresentarem uma razão molar de colesterol/fosfolipídios próximas a 1 (Van Meer e cols., 2008), a razão nas partículas de alfavírus isoladas de células de vertebrados é, algumas vezes, maior que a verificada na membrana plasmática (Laine e cols., 1973; Renkonen e cols., 1971). Essas observações poderiam

sugerir que o brotamento dos alfavírus poderia ocorrer em regiões de microdomínios de membrana (rafts). Alguns outros vírus que apresentam um alto conteúdo de colesterol em sua membrana (Lenard & Compans, 1974; Nayak & Barman, 2002) selecionam domínios ordenados durante o seu brotamento através da membrana plasmática (Scheiffele e cols., 1999). No entanto, experimentos realizados com o SFV sugerem que as proteínas do seu envelope não se associam com DRM (Detergent-Resistant Microdomains) (Lu & Kielian, 2000), diferentemente do observado para outros vírus, tais como influenza (Nayak & Barman, 2002) e HIV (Zheng e cols., 2003), cujas glicoproteínas de envelope já foram mostradas associar-se com microdomínios lipídicos.

Contudo, as análises espectrais de emissão de fluorescência da sonda Laurdan e os valores de GP obtidos por nós indicam a presença de uma fase líquido-ordenada no envelope do vírus Mayaro (Figura 15), a qual é convertida em líquido-desordenada pela depleção de colesterol da membrana viral, sugerindo que tal lipídio esteja relacionado à manutenção de um elevado grau de ordem nesta estrutura. Estes resultados corroboram a idéia da existência de “placas de cisão” e de grupos de colesterol presentes no envelope viral. A determinação da organização de membrana através da polarização generalizada do Laurdan mostra uma vantagem intrínseca deste

marcador de se distribuir igualmente no plano da membrana, entre as fases fluidas e condensadas, e não se associar especificamente com ácidos graxos ou fosfolipídios (Bagatolli e cols., 2003).

É importante salientar que não devemos excluir a possibilidade de que a alta densidade de proteínas no envelope, característica dos alfavírus, possa contribuir para a existência deste alto grau de organização. De fato, estudos anteriores demonstram que a microviscosidade aumentada dos alfavírus parece ser o resultado da interação das proteínas virais com os lipídios celulares selecionados durante o brotamento (Sefton & Gaffney, 1974; Moore e cols., 1976). Similar ao observado por nós para o vírus Mayaro, o envelope do vírus SFV também é altamente organizado (Scheiffele e cols., 1999), sugerindo que esta possa ser uma característica geral dos membros deste gênero.

Nossos resultados sugerem a incorporação de domínios líquido-ordenados no envelope do vírus Mayaro durante o seu processo de brotamento através da membrana plasmática. De fato, o processo de brotamento dos alfavírus a partir da membrana plasmática é dependente de colesterol (Lu & Kielian, 2000), embora as glicoproteínas de envelope não se associem com DRMs (detergent-resistant microdomains) (microdomínios resistentes a detergentes) purificadas a partir de lipossomos, mas interagem com DRMs

isoladas a partir de células vivas (Sousa Jr e cols., 2009). Além disso, a glicoproteína E2 do envelope dos alfavírus sofre uma modificação pós-traducional onde são inseridos ácidos palmíticos nos resíduos de cisteína de E2 próximos ao C-terminal (Ryan e cols., 1998). Esta palmitoilação é extremamente importante para o endereçamento da proteína para a membrana plasmática e para o processo de brotamento (Ivanova & Schlesinger, 1993). O fato é que a palmitoilação de proteínas é um sinal de endereçamento para regiões altamente ordenadas, rafts, presentes na membrana plasmática. Além disso, a palmitoilação de E2 fornece uma âncora lipídica que pode servir como ponto de ligação para outras cadeias lipídicas saturadas e colesterol quando a E2 está na membrana antes do brotamento aumentando a estabilidade viral como proposto para HA (Polozov e cols., 2008). Assim é provável que o alto grau de ordem verificado no envelope do vírus Mayaro possa ser proveniente destas regiões. Uma possível função para essa estrutura ser tão altamente empacotada seria prover uma rígida estrutura de encapsulamento a fim de proteger o nucleocapsídeo viral do meio extracelular e/ou dar suporte as alterações conformacionais protéicas que ocorrem durante a entrada do vírus na célula hospedeira, além de aumentar a infecciosidade da partícula viral.

Desta forma, sabendo que o envelope do vírus Mayaro é altamente ordenado, nós decidimos avaliar o grau de ordem nas células infectadas com

este vírus. Para isso utilizamos a sonda Laurdan nas células infectadas para monitorarmos possíveis mudanças. O uso desta sonda para monitorar o grau de ordem em membranas biológicas é de grande valia, pois suas propriedades espectroscópicas não são influenciadas pela ligação de moléculas na superfície da célula, tais como lipoproteínas, além de sua fluorescência em água ser desprezível (Bagatolli e cols., 2003; Triccerri e cols., 2002). O número de pixels que apresentam um dado valor de GP é uma indicação da área de superfície de uma célula ocupada por aquela população específica. Estudos anteriores estimam que 35% da superfície da célula é coberta por domínios de rafts (Prior e cols., 2003). Em macrófagos esta área pode variar de 29 a 45% (Gaus e cols., 2003). Em outras células, tais como fibroblastos, onde o conjunto de regiões ricas em rafts é menos visível, a área de superfície das imagens de GP pode ser subestimada. É importante salientar que estes valores referem-se à área total das células, enquanto os nossos remetem apenas a um plano. Assim, decorridos 4 horas de infecção verificamos um aumento na área da superfície das células infectadas que apresentam maior valor de GP, ou seja, grau de empacotamento. O valor percentual médio da área correspondente a regiões altamente ordenadas para a superfície das células controle foi em torno de 52%. Este valor chega a quase 80% após 4 horas de infecção. Esta alteração foi confirmada através da análise dos histogramas

(Figura 16E) onde percebemos o deslocamento da distribuição para regiões de maiores valores de GP, o que corresponde, de fato, a um aumento de regiões ordenadas. Mas o que poderia levar a este aumento de ordem? Duas possibilidades são possíveis: 1) o tráfego de proteínas virais para a membrana celular para o conseqüente brotamento da partícula poderia aumentar a ordem desta estrutura através de interações das proteínas virais com lipídios específicos da membrana, semelhante ao que aconteceria no envelope viral. O fato é que a área de superfície do envelope viral é muito menor e mais compacta do que a membrana plasmática. No entanto, as glicoproteínas recém sintetizadas começam a chegar à membrana plasmática 4 horas após o início da infecção (Rifkin & Quigley, 1974), tempo no qual percebemos as maiores alterações no grau de empacotamento da membrana. 2) o vírus poderia levar a um aumento na biossíntese de colesterol nas células infectadas. De fato, experimentos iniciais nossos apontam para esta possibilidade. Células infectadas com vírus Mayaro parecem ter aumentada a biossíntese de colesterol após 4 horas de infecção. A vantagem para este aumento no conteúdo de colesterol parece estar intimamente ligada ao processo de brotamento da partícula viral e a sua infecciosidade. O alargamento da distribuição de pixels dos histogramas após 1 h e 4 h de infecção sugere um aumento na heterogeneidade da membrana quanto à presença de regiões com

diferentes níveis de organização. Assim, decorridas 1 h de infecção percebemos um desvio dos histogramas para valores altos de GP, mas com uma população mais heterogênea. Após 4 h de infecção a população volta a ficar mais homogênea e com um GP maior que as células controle (Figura 16E). Mesmo sabendo que o colesterol é um dos principais fatores relacionados à ordem de membranas, nós não podemos excluir a possibilidade que outros fatores, tais como proteínas celulares e virais possam agir em conjunto com o colesterol neste aumento do grau de empacotamento da membrana. Experimentos estão sendo realizados a fim de verificarmos o efeito da infecção sobre a via do mevalonato não apenas na síntese e controle do metabolismo de colesterol, mas também na produção de proteínas preniladas.

Recentemente, demonstrou-se que o vírus sindbis que se propaga em um ambiente com alto conteúdo de colesterol é 26 vezes mais infeccioso (Ng e cols., 2008). De uma forma ou de outra, o fato é que há um aumento no grau de ordem da membrana nas células infectadas e isto pode ter profundas implicações nos processo de sinalização intracelular, principalmete nas cascatas de sinalização induzidas por interferon. Esta citocina se liga a uma grande variedade de receptores presentes na membrana e induz a ativação de fatores transcricionais que poderão funcionar como antivirais (Platanias,

2005). Assim, o vírus pode modular a fluidez da membrana como um sistema de evasão imune. A regulação celular na replicação dos alfavírus é completamente desconhecida e mais estudos precisam ser feitos a fim de elucidar um pouco mais como os vírus passam a regular alguns eventos metabólicos celulares.

Por fim, os nossos resultados com o vírus da dengue revelam certa dependência do colesterol, ainda que em menor grau quando comparamos com o vírus Mayaro, para o processo de infecção. Os ensaios de mistura de conteúdo aquoso e de infecciosidade sugerem a necessidade deste lipídio para o processo de fusão (Figuras 17, 18 e 19). Apesar disso, recentemente demonstrou-se que o colesterol pode não ser tão necessário para o processo de internalização (Umashankar e cols., 2008). Nesse estudo os autores utilizaram uma linhagem celular de invertebrados (C6/36), que possui características diferentes das células de vertebrados (Vero) utilizadas em nossas análises. Além disso, já foi demonstrado que para o vírus Sindbis o processo de internalização e de replicação nestas mesmas células pode ser independente de colesterol e do baixo pH (Hernandez e cols., 2001). Portanto, os resultados apresentados por nós revelam a dependência de colesterol no processo de replicação. Este fato também já foi comprovado recentemente em outro estudo (Lee e cols., 2008).

Apesar da grande semelhança estrutural entre as proteínas de fusão dos flavivírus e alfavírus, de possuírem o mesmo mecanismo de ativação e da organização icosaédrica destas proteínas no envelope viral a dependência de esfingomielina para o processo de fusão, característica marcante nos alfavírus, não é compartilhada pelos flavivírus (Figura 17). Experimentos com o vírus TBE também mostram esta independência de esfingomielina (Stiasny e cols., 2003). Estudos com SFV sugeririam uma dependência de características específicas de esfingolípídios e uma concentração muito baixa já seria suficiente para permitir uma fusão eficiente. Desta forma, sugere-se que os esfingolípídios atuariam como um cofator na fusão, possivelmente mediando a mudança conformacional de E1 (Nieva e cols., 1994). No entanto, estudos recentes demonstram que não apenas colesterol, mas também esfingolípídios estariam envolvidos na ligação do SFV à membrana de lipossomos (Waarts e cols., manuscrito em preparação). Desta forma, ao contrário do sugerido anteriormente (Nieva e cols., 1994), o papel do colesterol e dos esfingolípídios na fusão não podem ser separados. Assim, mesmo apresentando uma grande homologia estrutural as proteínas de fusão diferem na necessidade de esfingomielina para tal processo e o papel desempenhado por este lipídio na fusão dos alfavírus parece não ser necessário para os flavivírus.

Como demonstrado anteriormente para outros vírus, o colesterol presente no envelope do vírus dengue também desempenha um papel importante na manutenção da estrutura viral e na infecciosidade. Curiosamente o processo de brotamento do dengue ocorre a partir do retículo endoplasmático (Mackenzie e cols., 2001), cuja composição lipídica difere da verificada na membrana plasmática. A razão colesterol/fosfolipídios na membrana do retículo é de aproximadamente 0,15 enquanto na plasmática aproxima-se de 1 (Van Meer e cols., 2008). No entanto, o grau de infecciosidade é praticamente o mesmo quer o colesterol seja retirado da membrana plasmática da célula (Figuras 19) ou do envelope viral (Figura 20). Outro fato curioso é que mesmo brotando de uma região com uma baixa razão colesterol/fosfolipídios a membrana viral apresenta um alto grau de ordem (Figura 21). Este alto grau de empacotamento diminui apenas após o tratamento com a ciclodextrina, mostrando que no envelope do vírus da Dengue possa existir a presença de domínios ordenados. Recentemente, demonstrou-se que o vírus do oeste do Nilo era capaz de modular o tráfego de colesterol celular para as regiões perinucleares, ou seja, locais onde estão o retículo endoplasmático e ocorre a replicação e a montagem da partícula viral (Mackenzie e cols., 2007). Assim, este baixo conteúdo local de colesterol em

células normais poderia ser aumentado durante a infecção e explicaria o alto grau de empacotamento da membrana do vírus da dengue.

O colesterol se mostrou importante não apenas nos eventos iniciais que levam a internalização da partícula, mas também no processo de infecção (Figura 22). O conteúdo de RNA viral verificado após 72 horas de infecção foi reduzido em 95%, mostrando a importância deste lipídio para o processo de replicação. Nós não podemos excluir a possibilidade da quantidade de partículas interiorizadas sejam menores que as da célula não tratada. Experimentos estão sendo realizados a fim de esclarecermos esta dúvida. O alto conteúdo de colesterol também poderia modificar o processo de liberação do material genético viral (Lee e cols., 2008). Assim, parece que existe um controle rígido no conteúdo de colesterol celular a fim de potencializar a infecção.

No entanto, apesar de toda a importância do colesterol não só para a manutenção do envelope viral, mas também em várias etapas do ciclo infeccioso, surpreendentemente a infecção pelo vírus da dengue induz uma diminuição na síntese *de novo* deste lipídio (Figura 23). Além disso, uma importante proteína da via do mevalonato, 3-hidroxi-metilglutaril-CoA redutase (HMGCR), tem sua expressão aumentada em células infectas com o vírus do Oeste do Nilo (Mackenzie e cols., 2007). Entretanto, o conteúdo de

colesterol nas células infectadas não foi avaliado. Contudo, um recente estudo pode nos ajudar a explicar este estranho paradoxo (Fink e cols., 2007).

Uma das proteínas que são superexpressas durante a infecção pelo vírus da dengue chama-se viperina (*virus inhibitory protein, endoplasmatic reticulum associated, interferon inducible*) (Fink e cols., 2007). Estes mesmos autores mostraram que esta proteína possui uma ação antiviral contra o vírus da dengue impedindo a sua replicação. No entanto, eles não conseguiram demonstrar como a viperina inibiria a replicação do vírus. Um outro estudo mostrou que esta mesma proteína foi capaz de inibir o brotamento do vírus influenza através da ruptura dos microdomínios de membrana pela diminuição da atividade da FPPS (farnesil difosfato sintase), e com consequente aumento da fluidez da mesma (Wang e cols., 2007). Esta enzima participa da via do mevalonato convertendo geranyl-PP a farnesil-PP. O farnesil difosfato formado é precursor de inúmeros metabólitos essenciais, incluindo dolicois, heme-A, ubiquinona, carotenóides, proteínas preniladas e esteróis, dentre eles o colesterol (Bellés e cols., 2005). Assim, nas células infectadas com o vírus da dengue há uma diminuição na síntese de colesterol *de novo* provavelmente devido ao efeito inibitório da viperina sobre a FPPS, diminuindo a quantidade de farnesil difosfato para a síntese de colesterol. De fato, experimentos iniciais revelam que há uma diminuição no grau de empacotamento da membrana nas

células infectadas pelo vírus da Dengue. Assim, seria interessante avaliar este efeito da infecção no hospedeiro vetor, os mosquitos, uma vez que nos insetos o farnesil difosfato serve como intermediário para a síntese de hormônios juvenis (Bellés e cols., 2005). Além disso, iniciaremos testes com bisfosfonatos, classe de drogas usadas em doenças nos ossos e neoplasias, que são inibidores da FPPS.

De uma maneira geral, os resultados apresentados aqui revelam a importância do colesterol na manutenção da estrutura viral, tanto em alfavírus quanto em flavivírus, e no processo replicativo destes vírus. Estas observações têm importância fundamental para o entendimento das interações vírus-célula com potenciais implicações terapêuticas. Os alfavírus e principalmente os flavivírus exploram a maquinaria envolvida na regulação de colesterol celular para seu proveito. Compostos que atenuem os efeitos de enzimas colesterogênicas podem fornecer uma importante ferramenta antiviral contra essas duas famílias de arbovírus

## 6 - REFERÊNCIAS

ACOSTA, E.G., CASTILLA, V. & DAMONTE, E.B. Functional entry of dengue virus into *Aedes albopictus* mosquito cells is dependent on clathrin-mediated endocytosis. *Journal General Virology*, **89**, 474-84. (2008).

AGNELLO, V., ÁBEL, G., ELFAHAL, M., KNIGHT, G.B. & ZHANG, Q.X. Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **96**, 12766-71. (1999).

AHN, A., GIBBONS, D. & KIELIAN, M. The fusion peptide of Semliki Forest Virus associates with sterol-rich membrane domains. *Journal of Virology*, **76**, 3267-3275. (2002).

AIZAKI, H., MORIKAWA, K., FUKASAWA, M., HARA, H., INOUE, Y., TANI, H., SAITO, K., NISHIJIMA, M., HANADA, K., MATSUURA, Y., LAI, M.M.C., MIYAMURA, T., WAKITA, T. & SUZUKI, T. Critical role of virion-associated cholesterol and sphingolipid in hepatitis C virus infection. *Journal of Virology*, **82(12)**, 5715-5724. (2008).

ALBERTS, B., LEWIS, J., JOHNSON, A., RAFF, M., ROBERTS, K. & WALTER, P. *Molecular Biology of the Cell*. Quarta edição. Garland Science. pp. 1423-1463. (2002).

ANDERSON, R.G.W., KAMEN, B.A., ROTHBERG, K.G. & LACEY, S.W. Potocytosis: sequestration and transport of small molecules by caveolae. *Science*, **255**, 410-411. (1992).

ANDERSON, C.R., DOWNS, W.G., WATTLEY, G.H., AHIN, N.W. & REESE, A.A. Mayaro virus: a new human disease agent. II. Isolation from blood of patients in Trinidad. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **6**, 1012-1216. (1957).

ASHBURN, P. & CRAIG, C. Experimental investigations regarding the etiology of dengue fever. *J. Infect. Dis.*, **4**, 440–75. (1907).

BAGATOLLI, L. A., SANCHEZ, S. A., HAZLETT, T. L. & GRATTON, E. Giant vesicles, Laurdan, and two-photon fluorescence microscopy: Evidence of lipid lateral separation in bilayers. *Methods Enzymol.*, **360**, 481-500. (2003).

BAMFORD, D.H., GRIMES, J.M. & STUART D.I. What does structures tell us about virus evolution? *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **15**, 655-63. (2005).

BARANOWSKI, E., RUIZ-JARABO, C.M., SEVILLA, N., ANDREU, D., BECK, E. & DOMINGO, E. Cell recognition by Foot-and-Mouth Disease Virus that lacks the RGD integrin-binding motif: flexibility in Aphthovirus receptor usage. *Journal of Virology*, **74**, 1642-1647. (2000).

BARANOWSKI, E., RUIZ-JARABO, C.M. & DOMINGO, E. Evolution of cell recognition by viruses. *Science*, **292**, 1102-1105. (2001).

BARMAN, S. & NAYAK, D.P. Lipid raft disruption by cholesterol depletion enhances influenza A virus budding from MDCK cells. *Journal of Virology*, **81**, 12169-12178. (2007).

BARTH, B.U., WAHLBERG, J.M. & GAROFF, H. The oligomerization reaction of the Semliki Forest virus membrane protein subunits. *Journal of Cell Biology*, **128**, 283-291. (1995).

BELLÉS, X., MARTÍN, D. & PIULACHS, M.D. The mevalonate pathway and synthesis of juvenile hormone in insects. *Annu. Rev. Entomol.*, **50**, 181-199. (2005).

BENDER, F.C., WHITBECK, J.C., PONCE DE LEON, M., LOU, H., EISENBERG, R.J. & COHEN, G.H. Specific association of glycoprotein B with lipid rafts during herpes simplex virus entry. *Journal of Virology*, **77**, 9542-9552. (2003).

BERG, O., BØSHEIM, K.Y., BRATBAK, G. & HELDAL, M. High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature*, **340**, 467-68, (1989).

BLIGH, E.G. & DYER, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 911-917. (1959).

BODAGHI, B., SLOBBE-VAN DRUNEN, M.E., TOPILKO, A., PERRET, E., VOSSEN, R.C., VAN DAM-MIERAS, M.C., ZIPETO, D., VIRELIZIER, J.L., LEHOANG, P., BRUGGEMAN, C.A & MICHELSON, S. Entry of human cytomegalovirus into retinal pigment epithelial and endothelial cells by endocytosis. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, **40**, 2598-2607. (1999).

BONATTI, S., CANCEDDA, R. & BLOBEL, G. Membrane biogenesis. In vitro cleavage, core glycosylation, and integration into microsomal membranes of Sindbis virus glycoprotein. *The Journal of Cell Biology*, **80**, 219-224. (1979).

BOS, L. 100 years of virology: from vitalism via molecular biology to genetic engineering. *Trends in Microbiology*, **8**, 82-87. (2000).

BRANDENBURG, B. & ZHUANG, X. Virus trafficking – learning from single-virus tracking. *Nat. Rev. Microbiol.*, **5**, 197-208. (2007).

BREMER, C.M., BUNG, C., KOTT, N., HARDT, M. & GLEBE, D. Hepatitis B virus infection is dependent on cholesterol in the viral envelope. *Cellular Microbiology*, 1-12. (2008).

BRESSANELLI, S., STIASNY, K., ALLISON, S.L., STURA, E.A., DUQUERROY, S., LESCAR, J., HEINZ, F.X. & REY, F.A. Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH induced membrane fusion conformation. *EMBO J.*, **23**, 1–11. (2004).

BRON, R., WAHLBERG, J.M., GAROV, H. & WILSCHUT, J. Membrane fusion of Semliki Forest virus in a model system: correlation between fusion kinetics and structural changes in the envelope glycoprotein. *EMBO J.*, **12**, 693–701. (1993)

BROWN, D.A. & LONDON, E. Functions of lipid rafts in biological membranes. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **14**, 111-136. (1998).

CAMERON, P.U., LOWE, M.G., CROWE, S.M., O'DOHERTY, U., POPE, M., GEZELTER, S. & STEINMAN, R.M. Susceptibility of dendritic cells to HIV-1 infection in vitro. *Journal of Leucocyte Biology*, **56**, 257-265. (1994).

CAMPBELL, S.M., CROWE, S.M. & MAK, J. Lipid rafts and HIV-1: from viral entry to assembly of progeny virions. *Journal of Clinical Virology*, **22**, 217-227. (2001).

CAMPBELL, S.M., CROWE, S.M. & MAK, J. Virion-associated cholesterol is critical for the maintenance of HIV-1 structure and infectivity. *AIDS*, **16**, 2253-2261. (2002).

CANTIN, R., METHOT, S. & TREMBLAY, M.J. Plunder and stowaways: incorporation of cellular proteins by enveloped viruses. *Journal of Virology*, **79**, 6577-6587. (2005).

CARRASCO, L. Modification of membrane permeability by animal viruses. *Advanced in Virus Research*, **45**, 61-112. (1995).

CDC. Cases of West Nile human disease. [online], <http://www.cdc.gov/ncidod/dvbid/westnile/qa/cases.htm> (2004).

CHAZAL, N. & GERLIER, D. Virus entry, assembly, budding, and membrane rafts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **67**, 226-237. (2003).

CHEREZOV, V. ROSENBAUM, D.M., HANSON, M.A., RASMUSSEN, S.G., THIAN, F.S., KOBILKA, T.S., CHOI, H.J., KUHN, P., WEIS, W.I., KOBILKA, B.K. & STEVENS RC. High-resolution crystal structure of an engineered human  $\beta$ 2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science*, **318**, 1258–1265. (2007).

CHUNG, C.S., HUANG, C.Y. & CHANG, W. Vaccinia virus penetration requires cholesterol and results in specific viral envelope proteins associated with lipid rafts. *Journal of Virology* **79**, 1623-1634. (2005).

COIMBRA, T.L., SANTOS, C.L., SUZUKI, A., PETRELLA, S.M., BISORDI, I., NAGAMORI, A.H., MARTI, A.T., SANTOS, R.N., FIALHO, D.M., LAVIGNE. S., BUZZAR, M.R. & ROCCO, I.M. Mayaro virus: imported cases of human infection in São Paulo State, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, **49(4)**, 221-224. (2007).

CORVER, J., ORTIZ, A., ALLISON, S.L., SCHALICH, J. HEINZ, F.X. & WILSCHUT, J. Membrane fusion activity of tick-borne encephalitis virus and recombinant subviral particles in a liposomal model system. *Virology*, **269**, 37–46. (2000).

CRAVEN, R.C., LEURE-DUPREE, A.E., WELDON, R.A., JR., & WILLS, J.W. Genetic analysis of the major homology region of the Rous sarcoma virus Gag protein. *Journal of Virology*, **69**, 4213–4227. (1995).

DESPLANQUES, A.S., NAUWYNCK, H. J., VERCAUTEREN, D., GEENS, T. & FAVOREEL, H.W. Plasma membrane cholesterol is required for efficient pseudorabies virus entry. *Virology*, **376**, 339-345. (2008).

DE TULLEO, L. & KIRCHHAUSEN, T. The clathrin endocytic pathway in viral infection. *The EMBO Journal*, **17**, 4585-4593. (1998).

DIETRICH, C., BAGATOLLI, L.A., VOLOVYK, Z.N., THOMPSON, N.L., LEVI, M., JACOBSON, K. & GRATTON, E. Lipid rafts reconstituted in model membranes. *Biophysical Journal*, **80**, 1417-1428. (2001).

DIMITROV, D.S. Cell biology of virus entry. *Cell*, **101**, 697-702. (2000).

DIMITROV, D.S. Virus entry: molecular mechanisms and biomedical applications. *Nature Reviews Microbiology*, **2**, 109-122. (2004).

DING, M. & SCHLESINGER, M.J. Evidence that Sindbis virus NSP2 is an autoprotease which processes the virus nonstructural polyprotein. *Virology*, **171**, 280-284. (1989).

DOMINGO, E. Host - microbe interactions: viruses complexities of virus - cell interactions. *Current Opinion in Microbiology*, **6**, 383–385. (2003).

DOMS, R.W. Beyond receptor expression: The influence of receptor conformation, density, and affinity in HIV-1 infection. *Virology*, **276**, 229-237. (2000).

DURBUISSON, J. & RICE, C.M. Sindbis virus attachment: isolation and characterization of mutants with impaired binding to vertebrate cell. *Journal of Virology*, **67**, 3363-3374. (1993).

EKSTRÖM, M., LILJESTRÖM, P. & GAROFF, H. Membrane protein lateral interactions control Semliki Forest virus budding. *EMBO Journal*, **13**, 1058-1064. (1994).

EVANS, D.J. & ALMOND, J.W. Cell receptors for picornaviruses as determinants of cell tropism and pathogenesis. *Trends in Microbiology*, **6(2)**, 198-202. (1998).

FAUQUET, C.M., MAYO, M.A., MANILOFF, J., DESSELBERG, U. & BALL, L.A. VIIIth reports of the international committee on taxonomy of viruses. Elsevier-Academic, London. (2005)

FIGUEIREDO, L.T.M. Emergent arboviruses in Brazil. *Rev. Soc. Brasil. Med. Trop.*, **40(2)**, 224-229. (2007).

FINK, J., GU, F, LING, L., TOLFVENSTAM, T., OLFAT, F., CHIN, K.C., AW, P., GEORGE, J., KUZNETSOV, V.A., SCHREIBER, M., VASUDEVAN, S.G. & HIBBERD, M.L. Host Gene Expression Profiling of Dengue Virus Infection in Cell Lines and Patients. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **1(2)**, e-86. (2007).

FRIDRIKSSON, E.K., SHIPKOVA, P.A., SHEETS, E.D., HOLOWKA, D., BAIRD, B. & McLAFFERTY, F.W. Quantitative analysis of phospholipids in functionally important membrane domains from RBL-2H3 mast cells using tandem high-resolution mass spectrometry: *Biochemistry*; **38**, 8056-8063. (1999).

FUCHS, R., ELLINGER, A., PEVELKA, M., PETERLIK, M. & MELLMAN, I. Endocytic coated vesicles do not exhibit ATP-dependent acidification *in vitro*. *Journal of Cell Biology*, **105**, 91a. (1987).

GARMASHOVA, N., GORCHAKOV, R., VOLKOVA, E., PAESSLER, S., FROLOVA E. & FROLOV, I. The old world and new world alphaviruses use different virus-specific proteins for induction of transcriptional shutoff. *Journal of Virology*, **81(5)**, 2472-2484. (2007).

GAROFF, H., SIMONS, K. & DOBBERSTEIN, B. Assembly of the Semliki Forest Virus membrane glycoproteins in the membrane of the endoplasmic reticulum *in vitro*. *Journal of Molecular Biology*, **124**, 587-600. (1978).

GAROFF, H., FRISCHAUF, A.M., SIMONS, K., LEHRACH, H. & DELIUS, H. Nucleotide sequences of cDNA coding for Semliki Forest Virus membrane glycoprotein. *Nature*, **288**, 236-241. (1980).

GAROFF, H., HUYLEBROECK, D., ROBINSON, A., TILLMAN, U. & LILJESTRÖM, P. The signal sequence of the p62 protein of Semliki Forest virus is involved in initiation but not in completing chain translocation. *Journal of Cell Biology*, **111**, 867-876. (1990).

GAUS, K., GRATTON, E., KABLE, E.P.W., JONES, A.S., GELISSEN, I., KRITHARIDES, L. & JESSUP, D.W. Visualizing lipid structure and raft domains in living cells with two-photon microscopy. *PNAS*, **23**, 15554-15559. (2003).

GAUS, K., ZECH, T. & HARDER, T. Visualizing membrane microdomains by Laurdan 2-photon microscopy. *Molecular Membrane Biology*, **23**, 41-48. (2006).

GOLDSTEIN, J.L. & BROWN, M.S. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*, **343**, 425–430. (1990).

GOLDSTEIN, J.L., BROWN, M.S., ANDERSON, R.G.W., RUSSELL, D.W. & SCHNEIDER, W.J. Receptor-mediated endocytosis: Concepts emerging from the LDL receptor system. *Annu. Rev. Cell. Biol.*, **1**, 1–39. (1985)

GOLLINS, S.W., & PORTERFIELD J.S. pH-dependent fusion between the flavivirus West Nile and liposomal model membranes. *J. Gen. Virol.*, **67**, 157–166. (1986).

GOULIAN, M. & SIMON, S.M. Tracking single proteins within cells. *Biophysical Journal*, **79**, 2188-2198. (2000).

GHOSH, D. & BASU, A. Present perspectives on flaviviral chemotherapy. *Drug Discov. Today*, **13**, 619-624. (2008).

GRAHAM, D.R., CHERTOVA, E., HILBURN, J.M., ARTHUR, L.O. & HILDRETH, J.E. Cholesterol depletion of human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus with  $\beta$ -cyclodextrin inactivates and permeabilizes the virions: evidence for virion-associated lipid rafts. *Journal of Virology*, **77**, 8237-8248. (2003).

GUYADER, M., KIYOKAWA, E., ABRAMI, L., TURELLI, P. & TRONO, D. Role for human immunodeficiency virus type 1 membrane cholesterol in viral internalization. *Journal of Virology*, **76**, 10356-10364. (2002).

GREBER, U.F. Signalling in viral entry. *Cell. Mol. Life Sci.*, **59**, 608-626. (2002).

GRIFFIN, D.E. Host-microbe interactions: viruses interactions between viruses, cells and host immune response that underlie the pathogenesis of viral diseases. *Current Opinion in Microbiology*, **4**, 433-434. (2001).

GUBLER, D.J. & MELTZER, M. Impact of dengue/dengue hemorrhagic fever on the developing world. *Adv. Virus Res.*, **53**, 35–70. (1999).

GUBLER, D.J. Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem. Wallingford, UK: CAB International. pp. 1-22. (1997).

HAMBLETON, S., STEINBERG, S.P., GERSHON, M.D. & GERSHON, A.A. Cholesterol dependence of varicella-zoster virion entry into target cells. *Journal of Virology*, **81**, 7548-7558. (2007).

HAMMON, W.M., RUDNICK, A. & SATHER, G.E. Viruses associated with epidemic hemorrhagic fevers of the Philippines and Thailand. *Science*, **131**, 1102–3. (1960).

HARRIS, F.M., BEST, K.B. & BELL, J.D. Use the Laurdan fluorescence intensity and polarization to distinguish between changes in membrane fluidity and phospholipid order. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1565**, 123-128. (2002).

HEIDNER, H.W., KNOTT, T.A. & JOHNSTON, R.E. Differential processing of Sindbis virus glycoprotein PE2 in cultured vertebrate and arthropod cells. *Journal of Virology*, **70**, 2069-2073. (1996).

HEISE, M.T., SIMPSON, D.A. & JOHNSTON, R.E. Sindbis-group alphavirus replication in periosteum and endosteum of long bones in adult mice. *Journal of Virology*, **74**, 9294-9299. (2000).

HELENIUS, A., KARTENBECK, J., SIMONS, K. & FRIES, E. On the entry of Semliki forest virus into BHK-21 cells. *Journal of Cell Biology*, **84**, 404-420. (1980).

HELENIUS, A., MORREIN, B., FRIES, E., SIMONS, K., ROBINSON, P., SCHIRRMACHER, V., TERHORST, C. & STROMINGER, J.L. Human (HLA-A and -B) and murine (H2-K and -D) histocompatibility antigens are cell surface receptors for Semliki Forest virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 3846-3850. (1978).

HERNANDEZ, R., LEE, H., NELSON, C. & BROWN, D.T. A single deletion in the membrane-proximal region of the Sindbis virus glycoprotein E2 endodomain blocks virus assembly. *Journal of Virology*, **74**, 4220-4228. (2000).

HERNANDEZ, R., LUO, T. & BROWN, D.T. Exposure to low pH is not required for penetration of mosquito cells by Sindbis virus. *Journal of Virology*, **75**, 2010-2013. (2001).

HOLLAND, J. & DOMINGO, E. Origin and Evolution of Viruses. *Virus Genes*, **16:1**, 13-21. (1998).

HOTTA, S. Experimental studies on dengue. I. Isolation, identification and modification of the virus. *J. Infect. Dis.*, **90**, 1-9. (1952).

HOTTA, K., BAZARTSEREN, B., KAKU, Y., NOGUCHI, A., OKUTAMI, A., INOUE, S. & YAMADA, A. Effect of cellular cholesterol depletion on rabies virus infection. *Virus Research*, **139(1)**, 85-90. (2008).

HSIEH, P., ROSNER, M.R. & ROBBINS, P.W. Host-dependent variation of asparagine-linked oligosaccharides at individual glycosylation sites of Sindbis virus glycoproteins. *Journal of Biological Chemistry*, **258**, 2548-2554. (1983).

HUANG, J. & FEIGENSON, G. W. A microscopic interaction model of maximum solubility of cholesterol in lipid bilayers. *Biophys. J.*, **76**, 2142–2157. (1999).

HUANG, H., LI, Y., SADAOKA, T., TANG, H., YAMAMOTO, T., YAMANISHI, K. & MORI, Y. Human herpesvirus 6 envelope cholesterol is required for virus entry. *Journal of General Virology*, **87**, 277-285. (2006).

HUSTER, D., ARNOLD, K. & GAWRISCH, K. Influence of docosahexaenoic acid and cholesterol on lateral lipid organization in phospholipid mixtures. *Biochemistry*, **37**, 17299–17308. (1998).

IKONEN, E. Mechanisms for cellular cholesterol transport: defects and human disease. *Physiol. Rev.* **86**, 1237–1261. (2006).

IKONEN, E. Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization. *Nat. Mol. Cell Biol.*, **9**, 125-138. (2008).

IMHOFF, H., VON MESSLING, V., HERRLER, G. & HAAS, L. Canine Distemper Virus Infection Requires Cholesterol in the Viral Envelope. *Virology*, **81** (8), 4158-4165. (2008).

ISSHIKI, M. & ANDERSON, R.G.W. Calcium signal transduction from caveolae. *Cell Calcium*, **26**, 201-208. (1999).

IVANOVA, L. & SCHLESINGER, M.J. Site-directed mutations in the Sindbis virus E2 glycoprotein identify palmitoylation sites and affect virus budding. *Journal of Virology*, **67**, 2546–2551. (1993).

JENSEN, H.L. & NORRILD, B. The effects of cell passages on the cell morphology and the outcome of herpes simplex virus type 1 infection. *Journal of Virological Methods*, **84**, 139-152. (2000).

JOO, C., BALCI, H., ISHITSUKA, Y., BURANACHAI, C. & HA, T. Advances in single-molecule fluorescence methods for molecular biology. *Ann. Rev. Biochem.*, **77**, 51-76. (2008).

KAWOOYA, J.K. & LAW, J.H. Role of lipophorin in lipid transport to the insect egg. *Journal of Biological Chemistry*, **263**, 8748-53. (1988).

KIELIAN, M. Membrane fusion and the alphavirus life cycle. *Advances in Virus Research*, **45**, 113-151. (1995).

KIELIAN, M.C. & HELENIUS, A. Role of cholesterol in fusion of Semliki Forest virus with membranes. *Journal of Virology*, **52**, 281-283. (1984).

KLASSE, P.J., BRON, R. & MARSH, M. Mechanisms of enveloped virus entry into animal cells. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **34**, 65-91. (1998).

KLIMSTRA, W.B., RYMAN, K.D. & JOHNSTON, R.E. Adaptation of Sindbis virus to BHK cells selects for use of heparan sulfate as an attachment receptor. *Journal of Virology*, **72**, 7357-7366. (1998).

KLIMSTRA, W.B., NANGLE, E.M., SMITH, M.S., YUROCHKO, A.D. & RYMAN, K.D. DC-SIGN and L-SIGN can act as attachment receptors for alphaviruses and distinguish between mosquito cell- and mammalian cell-derived viruses. *Journal of Virology*, **77**, 12022-12032. (2003).

KOIKE, S., ISE, I., SATO, Y., MITSUI, K., UMEYAMA, H. & NOMOTO, A. Early events of poliovirus infection. *Semin. Virol.*, **3**, 109-115. (1992).

KOURI, G.P., GUZMAN, M.G., BRAVO, J.R. & TRIANA, C. Dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome: lessons from the Cuban epidemic, 1981. *Bull. WHO*, **67**, 375–80. (1989).

KROSCHEWSKI, H., ALLISON, S.L., HEINZ, F.X. MANDL, C.W. Role of heparan sulfate for attachment and of tick-borne encephalitis virus. *Virology*, **308**(1), 92-100. (2003).

KRUPOVIČ, M. & BAMFORD, D.H. Virus evolution: how far does the double  $\beta$ -barrel viral lineage extend? *Nat. Rev. Microbiol.*, **6**, 941-948. (2008).

KUES, T., PETERS, R. & KUBITSCHECK, U. Visualization and tracking of single protein molecules in the cell nucleus. *Biophysical Journal*, **80**, 2954-2967. (2001).

KUHN, R.J., ZHANG, W., ROSSMANN, M.G., PLETNEV, S.V., CORVER, J., LENCHES, E., JONES, C.T., MUKHOPADHYAY, S., CHIPMAN, P.R., STRAUSS, E.G., BAKER, T.S. & STRAUSS, J.H. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell*, **108**, 717–725. (2002).

KUHN, R.J. Togaviridae: the viruses and their replication. *In* Fields virology, Lippincott Williams & Wilkins. Quinta edição, 1001-1022. (2007).

LAINE, R., SÖDERLUND, H. & RENKONEN, O. Chemical composition of Semliki Forest virus. *Intervirology*, **1**, 110-118. (1973).

LAKADAMYALI, M., RUST, M.J., BABCOCK, H.P. & ZHUANG, X.W. Visualizing infection of individual influenza viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **100**, 9280-85. (2003).

LAKADAMYALI, M., RUST, M.J. & ZHUANG, X.W. Ligands for clathrin-mediated endocytosis are differentially sorted into distinct populations of early endosomes. *Cell*, **124**, 997-1009. (2006).

LAVERGNE, A., DE THOISY, B., LACOSTE, V., PASCALIS H., POULIQUEN, J.F., MERCIER, V., TOLOU, H., DUSSART, P., MORVAN, J., TALARMIN, A. & KAZANJI, M. Mayaro virus: Complete nucleotide sequence and phylogenetic relationships with other alphaviruses. *Virus Research*, **117**, 283-290. (2006).

LEE, C.J., LIN, H.R., LIAO, C.L. & LIN, Y.L. Cholesterol effectively blocks entry of flavivirus infection. *Journal of Virology*, **82(13)**, 6470-6480. (2008).

LENARD, J. & COMPANS, R.W. The membrane structure of lipid-containing viruses. *Biochimica et Biophysica Acta*, **344**, 51-74. (1974).

LESCAR J., ROUSSEL, A., WIEN, M.W., NAVASA, J., FULLER, S.D., WENGLER, G. & REY, F.A. The Fusion glycoprotein shell of Semliki Forest virus: an icosahedral assembly primed for fusogenic activation at endosomal pH. *Cell*, **105**, 137-148. (2001).

LI, L., LOK, S.M., YU, I.M., ZHANG, Y., KUHN, R.J., CHEN, J. & ROSSMANN, M.G. The flavivirus precursor membrane-envelope protein complex: structure and maturation. *Science*, **319**, 1830–1834. (2008).

LILJESTRÖM, P., LUSA, S., HUYLEBROECK, H & GAROFF, H. In vitro mutagenesis of a full-length cDNA clone of Semliki Forest virus: the small 6000-molecular-weight membrane protein modulates virus release. *Journal of virology*, **65**, 147-154. (1991).

LILJESTRÖM, P. & GAROFF, H. Internally located cleavable signal sequences direct the formation of Semliki Forest virus membrane proteins from a polyprotein precursor. *Journal of virology*, **65**, 4107-4113. (1991).

LINDENBACH, B.D. & RICE, C.M. Em *Fields Virology* (eds Knipe, D.M. & Howley, P.M.) 991–1041 (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2001).

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.Y., FARR, A.L. & RANDALL, R.J. Protein measurements with the Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry*, **193**, 265-275. (1951).

LU, Y. E., T. CASSESE, & M. KIELIAN. The cholesterol requirement for Sindbis virus entry and exit and characterization of a spike protein region involved in cholesterol dependence. *Journal of virology*, **73**:4272–4278. (1999).

LU, Y.E. & KIELIAN, M. Semliki forest virus budding: assay, mechanisms, and cholesterol requirement. *Journal of Virology*, **74**, 7708-7719. (2000).

LUUKKONEN, A., KAARIAINEN, L. & RENKONEN, O. Phospholipids of Semliki Forest virus grown in cultured mosquito cells. *Biochim. Biophys. Acta.*, **450(2)**, 109-120. (1976).

MACKENZIE, J.M., KHROMYKH, A.A. & WESTAWAY, E.G. Stable expression of noncytopathic Kunjin replicons simulates both ultrastructural and biochemical characteristics observed during replication of Kunjin virus. *Virology*, **279**, 161–172. (2001).

MACKENZIE, J.M., KHROMYKH, A.A. & PARTON, R.G. Cholesterol manipulation by west Nile virus perturbs the cellular immune responses. *Cell Host & Microbes*, **2**, 229-239. (2007).

MAÑES, S., DEL REAL, G. & MARTÍNEZ-A, C. Pathogens: rafts hijackers. *Nature Reviews Immunology*, **3**, 557-568. (2003).

MARECHAL, V., PREVOST, M.C., PETIT, C., PERRET, E., HEARD, J.M. & SCHWARTZ, O. Human immunodeficiency virus type 1 entry into macrophages mediated by macropinocytosis. *Journal of Virology*, **75**, 11166-11177. (2001).

MARQUARDT, M.T., PHALEN, T. & KIELIAN, M. Cholesterol is required in the exit pathway of Semliki Forest virus. *Journal of Cell Biology*, **123**, 57-65. (1993).

MARSH, M. & HELENIUS, A. Virus entry into animal cells. *Adv. in Virus Res.*, **36**, 107-151. (1989).

MARTIN, J.E., PIERSON, T.C., HUBKA, S., RUCKER, S., GORDON, I.J., ENAMA, M.E., ANDREWS, C.A., XU, Q., DAVIS, B.S., NASON, M., FAY, M., KOUP, R.A., ROEDERER, M., BAILER, R.T., GOMEZ, P.L., MASCOLA, J.R., CHANG, G.J., NABEL, G.J. & GRAHAM, B.S. A West Nile virus DNA vaccine induces neutralizing antibody in healthy adults during a phase 1 clinical trial. *J. Infect. Dis.* **196**, 1732–1740. (2007).

MAYNE, J.T., RICE, C.M., STRAUSS, E.G., HUNKAPILLER, M.W. & STRAUSS, J.H. Biochemical studies of the maturation of the small Sindbis virus glycoprotein E3. *Virology*, **134**, 338-357. (1984).

MAXFIELD, F.R. & TABAS, I. Role of cholesterol and lipid organization in disease. *Nature*, **438**, 612–621. (2005).

McCONNELL, H. M. & RADHAKRISHNAN, A. Condensed complexes of cholesterol and phospholipids. *Biochim. Biophys. Acta*, **1610**, 159–173 (2003).

McINERNEY, G.M., SMIT, J.M., LILJESTROM, P. & WILSCHUT, M. Semliki Forest virus produced in the absence of the 6K protein has an altered spike structure as revealed by decreased membrane fusion capacity. *Virology*, **325**, 200-206. (2004).

MEDIGESHI, G.R., HIRSCH, A.J., STREBLOW, D.N., NIKOLICH-ZUGICH, J. & NELSON, J.A. West Nile virus entry requires cholesterol-rich membrane microdomains and is independent of alphavbeta3 integrin *Journal of Virology*, **82(11)**, 5212-9. (2008)

MELKONIAN, K.A., OSTERMEYER, A.G., CHEN, J.Z., ROTH, M.G. & BROWN, D.A. Role of lipid modifications in targeting proteins to detergent-resistant membrane rafts. Many raft proteins are acylated, while few are prenylated. *J. Biol. Chem.*, **274**, 3910–3917. (1999).

MESSER, W.B., VITARANA, U.T., SIVANANTHAN, K., ELVTIGALA, J., PREETHIMALA, L.D., RAMESH, R., WITHANA, N., GUBLER, D.J. & DE SILVA, A.M. Epidemiology of dengue in Sri Lanka before and after the emergence of epidemic dengue hemorrhagic fever. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **66**, 765–73. (2002).

MEZENCIO, J.M.S. & REBELLO, M.A. Mayaro virus proteins. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **88(2)**, 299-304. (1993).

MILLER, J.L. DEWET, B.J.M., MARTINZ-POMARES, M., RADCLIFFE, C.M., DWEK, R.A., RUDD, P.M. & GORDON, S. The mannose receptor mediates dengue virus infection of macrophages. *PLOS pathogens*, **4(2)**, 1-11. (2008).

MODIS, Y., OGATA, S., CLEMENTS, D., HARRISON, S.C. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature*, **427**, 313–319. (2004).

MOLONEY, M., MCDONNELL, L. & O'SHEA, H. Immobilisation of Semliki Forest virus for atomic force microscopy. *Ultramicroscopy*, **91**, 275–279. (2002).

MONATH, T.P., LIU, J., KANESA-THASAN, N., MYERS, G.A., NICHOLS, R., DEARY, A., MCCARTHY, K., JOHNSON, C., ERMAK, T., SHIN, S., ARROYO, J., GUIRAKHOO, F., KENNEDY, J.S., ENNIS, F.A., GREEN, S. & BEDFORD, P. A live, attenuated recombinant West Nile virus vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **103**, 6694–6699. (2006).

MOORE, N.F., BARENHOLZ, Y. & WAGNER, R.R. Microviscosity of togavirus membranes studied by fluorescence depolarization: influence of envelope proteins and the host cell. *Journal of Virology*, **19**, 126-135. (1976).

MOTHES, W., BOERGER, A.L., NARAYAN, S., CUNNINGHAM, J.M. & YOUNG, J.A.T. Retroviral entry mediated by receptor priming and low pH triggering of an enveloped glycoprotein. *Cell*, **103**, 679-689. (2000).

MUKHOPADHYAY, S., KUHN, R.J. & ROSSMANN, M.G. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat. Rev. Microbiol.*, **3**, 13–22. (2005).

MUKHOPADHYAY, S., KIM, B.S., CHIPMAN, P.R., ROSSMANN, M.G. & KUHN, R.J. Structure of West Nile virus. *Science*, **303**, 248. (2003).

NAIM, H.Y. & KOBLET, H. The cleavage of p62, the precursor of E2 and E3, is an early and continuous event in Semliki Forest virus-infected *Aedes albopictus* cells. *Arch. Virol.*, **110**, 221-237. (1990).

NAYAK, D.P. & BARMAN, S. Role of lipid rafts in virus assembly and budding. *Advances in Virus Research*, **58**, 1-28. (2002).

NG, C.G., COPPENS, I., GOVINDARAJAN, D., PISCIOTTA, J., SHULAEV, V. & GRIFFIN, D.E. Effect of host cell lipid metabolism on alphavirus replication, virion morphogenesis, and infectivity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **105(42)**, 16326-31. (2008).

NICOLETTI, L., CICCOCCHI, M., MARCHI, A., FIORENTINI, C., MARTUCCI, P., D'ANCONA, F., CIOFI DEGLI ATTI, M., POMPA, M.G., REZZA, G. & CIUFOLINI MG. Chikungunya and dengue viruses in travelers. *Emerg. Infect. Dis.*, **14**, 177–178. (2008).

NIEVA, J.L., BRON, R., CORVER, J. & WILSCHUT, J. Membrane fusion of Semliki Forest virus requires sphingolipids in the target membrane. *EMBO Journal*, **13**, 2797-2804. (1994).

NIU, S.L. & LITMAN, B.J. Determination of membrane cholesterol partition coefficient using a lipid vesicle-cyclodextrin binary system: effect of phospholipid acyl chain unsaturation and headgroup composition. *Biophys. J.*, **83**, 3408–3415. (2002).

OLDSTONE, M.B. & LEVINE, A.J. Virology in the next millennium. *Cell*, **100**, 139-142. (2000).

OWEN, K.E. & KUHN, R.J. Alphavirus budding is dependent on the interaction between the nucleocapsid and hydrophobic amino acids on the cytoplasmic domain of the E2 envelope glycoprotein. *Virology*, **230**, 187-196. (1997).

PAHO. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever in the Americas: Guidelines for Prevention and Control. Washington, DC: Pan American Health Organization. (1994).

PANNING, M., GRYWNA, K., VAN, E.M., EMMERICH, P. & DROSTEN, C. Chikungunya fever in travelers returning to Europe from the indian ocean region, 2006. *Emerg. Infect. Dis.*, **14**, 416–422. (2008).

PARASASSI, T., STASIO, G., RAVAGNAN, G. R., RUSCH, M. & GRATTON, E. Quantitation of lipid phases in phospholipid vesicles by the generalized polarization of Laurdan fluorescence. *Biophys. J.*, **60**, 179-189. (1991).

PARASASSI, T. & GRATTON, E. Membrane lipid domains and dynamics as detected by Laurdan fluorescence. *J. Fluoresc.*, **8**, 365-373. (1995).

PAREDES, A.M., BROWN, D.T., ROTHNAGEL, R., CHIU, W., SCHOEPP, R.J., JOHNSTON, R.E. & PRASAD, B.V. Three-dimensional structure of a membrane containing virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 9095-9099. (1993).

PAREDES, A.M., HEIDNER, H., THUMAN-COMMIKE, P., PRASAD, B.V., JOHNSTON, R.E. & CHIU, W. Structural localization of the E3 glycoprotein in attenuated Sindbis virus mutants. *Journal of Virology*, **72**, 1534-1541. (1998).

PELKMANS, L., FAVA, E., GRABNER, H., HANNUS, M., HABERMANN, B., KRAUSZ, E. & ZERIAL, M. Genome-wide analysis of human kinases in clathrin- and caveolae/raft-mediated endocytosis. *Nature*, **436**, 78–86. (2005).

PERERA, R., KHALIQ, M. & KUHN, R. J. Closing the door the flaviviruses: entry as a target for antiviral drug design. *Antiviral Research*, **80**, 11-22. (2008).

PÉREZ, L. & CARRASCO, L. Involvement of the vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase in animal virus entry. *Journal of General Virology*, **78**, 2595-2606. (1994).

PHALEN, T. & KIELIAN, M. Cholesterol is required for infection by Semliki Forest virus. *Journal of Cell Biology*, **112**, 615-623. (1991).

PINHEIRO, F.P., FREITAS, R.B., TRAVASSOS, J.F., GABBAY, Y.B., MELLO, W.A. & LEDUC, J.W. An outbreak of Mayaro virus disease in Belterra, Brazil. I. Clinical and Virological Finding. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **30**, 674-681. (1981).

PLATANIAS, L.C. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signaling. *Nat. Rev. Immunol.*, **5**, 375–386. (2005).

PLOEGH, H.L. Viral strategies of immune evasion. *Science*, **280**, 248-253. (1998).

POLOZOV, I.V. & GAWRISCH, K. Domains in Binary SOPC/POPE Lipid Mixtures Studied by Pulsed Field Gradient <sup>1</sup>H MAS NMR. *Biophysical Journal*, **87**, 1741–1751. (2004).

POLOZOV, I.V., BEZRUKOV, L., GAWRISCH, K. & ZIMMERBERG, J. Progressive ordering with decreasing temperature of the phospholipids of influenza virus. *Nature Chemical Biology*, **4**, 248-255. (2008).

PORANEN, M.N., DAUGELAVICIUS, R., OJALA, P.M., HESS, M.W. & BAMFORD, D.H. A novel virus-host cell membrane interaction: Membrane voltage-dependent endocytic-like entry of Bacteriophage  $\phi$ 6 nucleocapsid. *The Journal of Cell Biology*, **147**, 671 681. (1999).

PORANEN, M.N., DAUGELAVICIUS, R. & BAMFORD, D.H. Common principles in viral entry. *Annu. Rev. Microbiol.*, **56**, 521-538. (2002).

PRIOR, I.A., MUNCKE, C., PARTON, R.G. & HANCOCK, J.F. Direct visualization of Ras proteins in spatially distinct cell surface microdomains *Journal Cell Biol.* **160**, 165–170. (2003).

RAZANI, B., WOODMAN, S.E. & LISANTI, M.P. Caveolae: from cell biology to animal physiology. *Pharmacological Reviews*, **54**, 431-467. (2002).

RAY, D., SHI, P.Y. Recent advances in flavivirus antiviral drug discovery and vaccine development. *Recent Patents Anti-Infect. Drug Disc.*, *1*, 45–55. (2006).

RENKONEN, O., KÄÄRIÄINEN, L., SIMONS, K. & GAHMBERG, C.G. The lipid class composition of Semliki Forest Virus and of plasma membranes of the host cells. *Virology*, **46**, 318-326. (1971).

RESH, M.D. Membrane targeting of lipid modified signal transduction proteins. *Subcell. Biochem.*, **37**, 217–232. (2004).

RICE, G., TANG, L., STEDMAN, K., ROBERTO, F., SPUHLER, J., GILLITZER, E., JOHNSON, J.E., DOUGLAS, T. & YOUNG, M. The structure of a thermophilic archaeal virus shows a double-stranded DNA viral capsid type that spans all domains of life. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 7716-7720. (2004).

RIFKIN DB, QUIGLEY JP. Virus-induced modification of cellular membranes related to viral structure. *Annu. Rev. Microbiol.*, **28**, 325-51. (1974).

RYAN, C., IVANOVA, L. & SCHLESINGER, M.J. Effects of site-directed mutations of transmembrane cysteines in sindbis virus E1 and E2 glycoproteins on palmitoylation and virus replication. *Virology*, **249**, 62-69. (1998).

SABIN, A.B. & SCHLESINGER, R.W. Production of immunity to dengue with virus modified by propagation in mice. *Science*, **101**, 640–42. (1945).

SANCHEZ, S. & GRATTON, E. Lipid-protein interactions revealed by two-photon excitation microscopy and fluorescence correlation spectroscopy. *Accounts of Chemical Research*, **38(6)**, 469-477. (2005).

SALAÜN, C., JAMES, D.J. & CHAMBERLAIN, L.H. Lipid rafts and the regulation of exocytosis. *Traffic*, **5**, 255-264. (2004).

SATTENTAU, Q. Avoiding the void: cell-to-cell spread of human viruses. *Nat. Rev. Microbiol.*, **6**, 815-826. (2008).

SCHEIFFELE, P., RIETVELD, A., WILK, T. & SIMONS, K. Influenza viruses select ordered lipid domains during budding from the plasma membrane. *Journal of Biological Chemistry*, **274**, 2038-2044. (1999).

SEFTON, B.M. Immediate glycosylation of Sindbis virus membrane protein. *Cell*, **10**, 659-668. (1977).

SEFTON, B.M. & GAFFNEY, B.J. Effect of the viral proteins on the fluidity of the membrane lipids in Sindbis virus. *Journal of Molecular Biology*, **90**, 343-358. (1974).

SEISENBERGER, G., RIED, M.U., ENDREß, T., BÜNING, H., HALLEK, M. & BRÄUCHLE, C. Real-time single-molecule imaging of the infection pathway of an Adeno-Associated Virus. *Science*, **294**, 1929-1932. (2001).

SHARP, P.M. Origins of human virus diversity. *Cell*, **108**, 305-312. (2002).

SILVIUS, J.R. Role of cholesterol in lipid raft formation: lessons from lipid model systems. *Biochim. Biophys. Acta*, **1610**, 174–183 (2003).

SIMONS, K. & IKONEN, E. Functional rafts in cell membranes. *Nature*, **387**, 569-587. (1997).

SIMONS, K. & TOOMRE, D. Lipid rafts and signal transduction. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **1**, 31-41. (2000).

SIMONS, K. & VAZ, W. L. Model systems, lipid rafts, and cell membranes. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **33**, 269–295. (2004).

SCHLESINGER, M.J. & SCHLESINGER, S. Formation and assembly of alphavirus glycoproteins. Em: *Togaviridae and flaviviridae*. S. Schlesinger & M.J. Schlesinger, eds. (New York: Plenum), pp. 121-148. (1986).

SCHLESINGER, M.J. & SCHLESINGER, S. Togaviridae: The viruses and their replication. Em: *Virology*. Fields, B.N., Knipe, D.M., Howley, P.M., Chanovk, R.M., Melnick, J.L., Monath, T.P., Roizman, B. & Strauss, S.E. eds. Vol. 1, Terceira Edição. Philadelphia, Lippincott-Raven Pub. pp.825-842. (1996).

SCHROEDER, R., LONDON, E. & BROWN, D. Interactions Between Saturated Acyl Chains Confer Detergent Resistance on Lipids and Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anchored Proteins: GPI-Anchored Proteins in Liposomes and Cells Show Similar Behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 12130-12134. (1994).

SCHROEDER, R.J., AHMED, S.N., ZHU, Y., LONDON, E. & BROWN, D.A. Cholesterol and sphingolipid enhance the Triton X-100 insolubility of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins by promoting the formation of detergent-insoluble ordered membrane domains. *J. Biol. Chem.* **273**, 1150–1157. (1998).

SIECZKARSKI, S.B. & WHITTAKER, G.R. Influenza Virus can enter and infect cells in the absence of clathrin-mediated endocytosis. *Journal of Virology*, **76**, 10455-10464. (2002a).

SIECZKARSKI, S.B. & WHITTAKER, G.R. Dissecting virus entry via endocytosis. *Journal of General Virology*, **83**, 1535-1545. (2002b).

SKOGING, U. & LILJESTRÖM, P. Role of the c-terminal tryptophan residue for the structure-function of the alphavirus capsid protein. *Journal of Molecular Biology*, **279**, 865-872. (1998).

SKOGING, U., VIHINEN, M., NILSSON, L. & LILJESTRÖM, P. Aromatic interactions define the binding of the alphavirus spike to its nucleocapsid. *Structure*, **4**, 519-529. (1996).

SMIT, J.M., BITTMAN, R. & WILSCHUT, J. Low-pH-dependent fusion of Sindbis virus with receptor-free cholesterol-and-sphingolipid-containing liposomes. *Journal of Virology*, **73**, 8476-8484. (1999).

SMITH, A.E. & HELENIUS, A. How viruses enter animal cells. *Science*, **304**, 237-242. (2004).

SOUSA JR., I.P., CARVALHO, C.A.M., MENDES, Y.S., SILVA, J.L. & GOMES, A.M.O. Association of the lipid membrane microdomains with Mayaro virus. Submetido para publicação. (2009).

SPRONG, H., VAN DER SLUIJS, P. & VAN MEER, G. How proteins move lipids and lipids move proteins. *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, **2**, 504–513. (2001).

STRAUSS, J.H. & STRAUSS, E.G. The alphaviruses: Gene expression, replication, and evolution. *Microbiological Reviews*, **58**, 491-562. (1994).

STIASNY, K., HEINZ, F.X. Flavivirus membrane fusion. *J. Gen. Virol.*, **87**, 2755–2766. (2006).

STIASNY, K., KOESSL, C. & HEINZ, F.X. Involvement of lipids in different steps of the flavivirus fusion mechanism. *Journal of Virology*, **77**, 7856–7862. (2003).

SUN, X. & WHITTAKER, G.R. Role for influenza virus envelope cholesterol in virus entry and infection. *Journal of Virology*, **77**, 12543-12551. (2003).

TANASUGARN, L., McNEIL, P., REYNOLDS, G.T. & TAYLOR, G.T. Microspectrofluorometry by digital image processing: measurement of cytoplasmic pH. *Journal of Cell Biology*, **98**, 717-724. (1984).

TEISSIER, E. & PÉCHEUR, E.I. Lipids as modulators of membrane fusion mediated by viral fusion proteins. *Eur. Biophys. J.*, **36**, 887-899. (2007).

TESH, R.B., WATTS, D.M., RUSSELL, K.L., DAMODARAN, C., CALAMPA, C., CABEZAS, C., RAMIREZ, G., VASQUEZ, B., HAYES, C.G., ROSSI, C.A., POWERS, A.M., HICE, C.L., CHANDLER, L.J., CROPP, B.C., KARABATSOS, N., ROEHRIG, J.T. & GUBLER, D.J. Mayaro virus disease: an emerging mosquito-borne zoonosis in tropical South America. *Clinical and Infectious Diseases*, **28**, 67-73. (1999).

TRICERRI, M.A., SANCHEZ, S.A., ARNULPHI, C., DURBIN, D.M., GRATTON, E. & JONAS, A. Interaction of apolipoprotein A-I in three different conformations with palmitoyl oleoyl phosphatidylcholine vesicles.. *Journal. Lipid Research*, **43**, 187–197. (2002)

UMASHANKAR, M., SÁNCHEZ-SAN MARTÍN, C., LIAO, M., REILLY, B., GUO, A., TAYLOR, G. & KIELIAN, M. Differential cholesterol binding by class ii fusion proteins determines membrane fusion properties. *Journal of Virology*, **82**(18), 9245-9253. (2008).

VAN DER SCHAAR, H.M., RUST, M.J., WAARTS, B.L., VAN DER ENDE-METSELAAR, H., KUHN, R., WILSCHUT, J., ZHUANG, X.W. & SMIT, J.M. Characterization of the early events in dengue virus cell entry biochemical assays and single-virus tracking. *Journal of Virology*, **81**, 12019-12028. (2007).

VAN DER SCHAAR, H.M., RUST, M.J., CHEN, C., VAN DER ENDE-METSELAAR, H., WILSCHUT, J., ZHUANG, X.W. & SMIT, J.M. Dissecting the cell entry pathway of dengue virus by single-particle tracking in living cells. *PLoS Pathog.*, **4**(12), 1-9. (2008).

VAN MEER, G., VOELKER, D.R. & FEIGENSON, G.W. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat. Mol. Cell Biol.*, **9**, 112-124. (2008).

VASHISHTHA, M., PHALEN, T., MARQUARDT, M.T., RYU, J.S., NG, A.C. & KIELIAN, M. A single point mutation controls the cholesterol dependence of Semliki Forest virus entry and exit. *J. Cell Biol.* **140**:91-99. (1998).

VASCONCELOS, P.F.C., TRAVASSOS, A.P.A., RODRIGUES, S.G., TRAVASSOS DA ROSA, E.S., DÉGALLIER, N. & TRAVASSOS DA ROSA, J.F.S. Inadequate management of natural ecosystem in the Brazilian Amazon region results in the emergence and reemergence of arbovirus. *Caderno de Saúde Pública*, **17**, 155-164. (2001).

VELA, E.M., ZHANG, L., COLPITTS, T.M., DAVEY, R.A. & ARONSON, J.F. Arenavirus Entry occurs through a cholesterol-dependent,

non-caveolar, clathrin-mediated endocytic mechanism. *Virology*, **369**(1), 1-11. (2007).

VIARD, M., PAROLINI, I., SARGIACOMO, M., FECCHI, K., RAMONI, C., ABLAN, S., RUSCETTI, F.W., WANG, J.M. & BLUMENTHAL, R. Role of cholesterol in human immunodeficiency virus type 1 envelope protein-mediated fusion with host cells. *Journal of Virology*, **76**, 11584-11595. (2002).

WAARTS, B.L., ANEKE, O.J.C., SMIT, J.M., CORVER, J., BITTMAN, R. & WILSCHUT, J. Fusion of Semliki Forest Virus in the absence of sphingolipids: implications for the role sphingolipids in alphavirus membrane fusion. *Manuscrito em preparação*.

WAHLBERG, J.M., BOERE, W.A.M. & GAROFF, H. The heterodimeric association between the membrane proteins of Semliki Forest virus changes its sensitivity to low pH during virus maturation. *Journal of Virology*, **63**, 4991-4997. (1989).

WANG, K., KUHN, R.J., STRAUSS, E.G., OU, S. & STRAUSS, J.H. High-affinity laminin receptor is a receptor for Sindbis virus in mammalian cells. *Journal of Virology*, **66**, 4992-5001. (1992).

WANG, X., HINSON, E.R. & CRESSWELL, P. The interferon-inducible protein viperin inhibits influenza virus release by perturbing lipid rafts. *Cell Host Microbe*, **16**, 96-105. 2007.

WANG, T.Y., LEVENTIS, R. & SILVIUS, J.R. Partitioning of lipidated peptide sequences into liquid ordered lipid domains in model and biological membranes. *Biochemistry*, **40**, 13031-13040. (2001).

WHITEHEAD, S.S., BLANEY, J.E., DURBIN A.P. & MURPHY, B.R. Prospects for a dengue virus vaccine. *Nature Reviews in Microbiology*, **5**, 518-528. (2007).

WHO. Strengthening Implementation of the Global Strategy for Dengue Fever/Dengue Haemorrhagic Fever Prevention and Control. Presented at Report of the Informal Consultation, Geneva, Switzerland. (2000).

WHO. Dengue Haemorrhagic Fever: Diagnosis, Treatment, Prevention and Control. Geneva: WHO. 2nd ed. (1997).

YU, I., ZHANG, W., HOLDAWAY, H.A., LI, L., KOSTYUCHENKO, V.A., CHIPMAN, P.R., KUHN, R.J., ROSSMANN, M.G. & CHEN, J., Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. *Science*, **319**, 1834–1837. (2008).

ZAJCHOWSKI, L.D. & OBBINS S.M. Lipid rafts and little caves: compartmentalized signalling in membrane microdomains. *Eur. J. Biochem.*, **269**, 737-752. (2002).

ZHANG, F.L. & CASEY, P.J. Protein prenylation: Molecular mechanisms and functional consequences. *Annu. Rev. Biochem.*, **65**, 241–269. (1996).

ZHANG, W., CHIPMAN, P.R., CORVER, J., JOHNSON, P.R., ZHANG, Y., MUKHOPADHYAY, S., BAKER, T.S., STRAUSS, J.H., ROSSMANN, M.G. & KUHN, R.J. Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. *Nat. Struct. Biol.*, **10**, 907–912. (2003).

ZHENG, Y.H., PLEMENTAS, A., FIELDING, C.J. & PETERLIN, B.M. Nef increase the synthesis of and transports cholesterol to lipid rafts and HIV-1 progeny virions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 8460-8465. (2003).

1 **ENVELOPE CHOLESTEROL AND LATERAL ORGANIZATION IS CRUCIAL FOR**  
2 **THE BIOLOGICAL ACTIVITY AND STRUCTURE OF ALPHAVIRUSES**

3  
4 Ivanildo P. Sousa Jr.<sup>1#</sup>, Carlos A. M. Carvalho<sup>1#</sup>, Davis F. Ferreira<sup>2</sup>, Gilberto Weissmüller<sup>3</sup>,  
5 Gustavo M. Rocha<sup>3</sup>, Jerson L. Silva<sup>1</sup>, and Andre M. O. Gomes<sup>1\*</sup>  
6

7 *Instituto de Bioquímica Médica, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Biologia*  
8 *Estrutural e Bioimagem, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil*  
9 *<sup>1</sup>, Instituto de Microbiologia Professor Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de*  
10 *Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil <sup>2</sup>, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho -*  
11 *Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil <sup>3</sup>*  
12  
13

14 Keywords: Alphavirus, Cholesterol, Mayaro virus, Membrane lateral organization, MβCD  
15

16 Running Title: Cholesterol affects Alphavirus structure and stability  
17

18 \*Corresponding author. Mailing address: Instituto de Bioquímica Médica, Universidade  
19 Federal do Rio de Janeiro: Avenida Carlos Chagas Filho, 373 (CCS/E1-008), Cidade  
20 Universitária, Rio de Janeiro, RJ, 21941-902, Brazil. Phone: +55 21 2562 6756. E-mail:  
21 amog@bioqmed.ufrj.br.  
22

23 # These authors contributed equally to this work.

24 Word count: Abstract: 204 Text:4045

25 **ABSTRACT**

26

27       Alphaviruses are enveloped viruses that enter host cells through receptor-mediated  
28 endocytosis. The subsequent fusion of the viral envelope to the endosomal membrane is  
29 triggered by low pH and requires the presence of both cholesterol and sphingolipids in the  
30 target membrane. In addition, there seems to be a cholesterol requirement for efficient virus  
31 budding from the cellular plasma membrane, which results in a high loading of this lipid on  
32 the viral envelope. In this study, we have examined the role of cholesterol present in the  
33 Mayaro virus envelope on viral structure and viability. The pretreatment of virions with  
34 methyl- $\beta$ -cyclodextrin efficiently depleted envelope cholesterol and significantly reduced  
35 Mayaro virus infectivity. Negative-staining electron microscopy and atomic force microscopy  
36 analysis revealed that envelope cholesterol depletion markedly affected viral morphology by  
37 permeabilization of the viral membrane, suggesting that this lipid plays a role in the  
38 maintenance of viral particle integrity. Analysis of Laurdan fluorescence allowed us to  
39 investigate the effect of treatment with methyl- $\beta$ -cyclodextrin on the lipid-packing of the viral  
40 envelope. Our results demonstrate for the first time a relationship between the cholesterol  
41 present in an alphavirus and the high degree of organization in its envelope, highlighting  
42 cholesterol as a critical structural component for alphavirus particle integrity and infectivity.

## 43 INTRODUCTION

44

45           Viral infection is a complex process that includes many steps and interactions of viral  
46 components with different cellular structures. The entry step is a critical early event of the  
47 infection cycle, and for enveloped viruses, it relies on the fusion of the viral envelope with  
48 either the endosomal or plasma membrane of the cell. Moreover, the lipid composition of both  
49 the viral envelope and host cell membrane plays an important role in viral infection.

50           Mayaro virus (MAYV) is a member of the genus *Alphavirus* in the family  
51 *Togaviridae*. MAYV is widespread in South America in an endemic manner, and its infection  
52 results in a dengue-like acute febrile illness (31, 42). Although most cases of infected humans  
53 are generally sporadic, the possibility of MAYV to infect and be transmitted by *Aedes aegypti*  
54 seems to point to a rise in this disease, which is considered one of the major emerging  
55 diseases in the neotropics (43).

56           Alphaviruses are enveloped arboviruses that enter host cells by receptor-mediated  
57 endocytosis (39). The process of genome release occurs after fusion between the viral  
58 envelope and the endosomal membrane, a reaction that shows a strong dependence on  
59 cholesterol in the target membrane, as exemplified by Sindbis virus (SINV) and Semliki  
60 Forest virus (SFV), prototypes of the genus, when infecting mammalian cells (30, 37). The  
61 envelope is acquired during the process of budding, which occurs at the host cell plasma  
62 membrane, and is also highly dependent on the presence of cholesterol in this cellular  
63 structure (20, 24), resulting in a high loading of this lipid on the viral envelope. These viruses  
64 are maintained in nature by replicating alternately in a hematophagous arthropod (usually a  
65 mosquito) and a vertebrate host (39).

66           Many other viruses also show a cholesterol requirement in either the envelope or the  
67 endosomal/plasma membrane (or both) for infection. Influenza virus type A and human

68 herpesvirus 6 (HHV-6) infectivity is notably affected by cholesterol depletion from their  
69 envelopes (15, 40). Vaccinia virus (VACV) and varicella-zoster virus (VZV) show a  
70 requirement of cholesterol in the plasma membrane for efficient penetration into the host cell  
71 (7, 13). Human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) and herpes simplex virus type 1  
72 (HSV-1) entry has also been shown to require cholesterol, in both the target and viral  
73 membranes (3, 5, 6, 11, 12, 44). This cholesterol requirement may involve the participation of  
74 raft domains in the infection process.

75         Since alphaviruses isolated from vertebrate cells have already been shown to have a  
76 high cholesterol content in their envelopes (18, 34), we examined the role of cholesterol in  
77 the MAYV envelope using methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M $\beta$ CD). M $\beta$ CD is a derivative of a cyclic  
78 oligomer of glucose with a lipophilic property, and it is known to extract cholesterol out of  
79 lipid membranes (16, 32). Our results demonstrate that M $\beta$ CD efficiently depleted envelope  
80 cholesterol and significantly reduced MAYV infectivity in a dose-dependent manner. We  
81 show that the MAYV envelope presents a high degree of lipid organization and that the  
82 disruption of this organization by cholesterol depletion markedly affects virus morphology  
83 and envelope lipid-packing. For the first time, the influence of cholesterol molecules on the  
84 organizational degree of the alphavirus envelope is assessed, and a relationship between the  
85 organization of envelope lipids and particle structural stability is observed.

## 86 MATERIALS AND METHODS

87

### 88 Cells and virus

89 Baby hamster kidney (BHK-21) and African green monkey kidney (Vero) cells were  
90 maintained and propagated as monolayers in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)  
91 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), supplemented with 10% fetal bovine serum  
92 (Cultilab, Campinas, SP, Brazil), 3% tryptose phosphate (Difco, Detroit, MI, USA), 100 U  
93 penicillin/mL and 100 µg streptomycin/mL (Gibco, Carlsbad, CA, USA) and grown at 37°C  
94 in a 5% CO<sub>2</sub> incubator. Mayaro virus (VR-1277) was obtained from the American Type  
95 Culture Collection (Manassas, VA, USA).

96

### 97 Virus propagation and purification

98 Mayaro virus was propagated in BHK-21 cells for 48 h at 37°C. The virus was purified  
99 as described previously (25) with some modifications. After propagation, the supernatant was  
100 collected and cleared of cellular debris at 8,000 rpm for 20 min at 4°C in a RPR 12-2 rotor.  
101 The supernatant was applied on a 30% sucrose cushion and centrifuged in a Beckman 45 Ti  
102 rotor at 32,000 rpm for 1 h 40 min at 4°C. The pellet was suspended in TNE buffer (10 mM  
103 Tris, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA), layered onto a discontinuous 5-50% sucrose density  
104 gradient and centrifuged at 30,000 rpm for 1 h 30 min at 4°C in a Beckman SW 41 rotor.  
105 Virus fraction was identified by reading the optical density of the fractions collected from the  
106 gradient at 260 and 280 nm. Purified virions were maintained at 4°C.

107 **Cholesterol depletion**

108 Methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M $\beta$ CD) was purchased from Sigma. Cholesterol depletion  
109 from the viral envelope was performed by incubating viruses at a concentration of 100  $\mu$ g  
110 viral proteins/mL with the indicated concentration of M $\beta$ CD for 30 min at 37°C. After  
111 incubation, cyclodextrin was removed by centrifugation on a 100,000 MWCO Microcon filter  
112 (Millipore, Billerica, MA, USA).

113

114 **Cholesterol content measurement**

115 The cholesterol content was determined using an Amplex Red cholesterol assay kit  
116 (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) according to the manufacturer's instructions. For the  
117 measurement of viral envelope cholesterol content, virus (100  $\mu$ g/mL) was concentrated by  
118 centrifugation on a 100,000 MWCO Microcon filter, resuspended in Amplex Red reaction  
119 buffer and analyzed on a SpectraMax M5 plate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA,  
120 USA) operated in fluorescence mode, using an excitation wavelength of 544 nm and an  
121 emission wavelength of 590 nm.

122

123 **Virus titer determination**

124 Virus titer was determined by plaque assay in Vero cells. Briefly, confluent  
125 monolayers of Vero cells on multiwell plates were infected with serial dilutions of Mayaro  
126 virus and incubated for 60 min at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> incubator. After this period, non-  
127 adsorbed virus was removed, and a semisolid medium (1.6% carboxymethylcellulose in  
128 DMEM) was added. Plates were left at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere for 48 h. After the  
129 removal of semisolid medium, the cells were stained with 1% crystal violet and plaques were  
130 counted.

131

132 **Negative-staining electron microscopy**

133 Virus samples were prepared for negative-staining electron microscopy by placing  
134 them onto a Formvar-coated hexagonal (300-hex) Cu grid, standing for 1 min, and immediate  
135 staining for 1 s with 2% aqueous uranyl acetate. After a drying period, the grid was viewed on  
136 a Morgani electron microscope (FEI Co., Hillsboro, OR, USA) operated at 100 kV. After  
137 scanning the negatives, images were processed with Adobe Photoshop (Adobe Systems Inc.,  
138 Mountain View, CA, USA).

139

140 **Atomic force microscopy**

141 Virus samples were prepared for atomic force microscopy by placing them onto a  
142 freshly cleaved mica surface, allowing them to adsorb for 5 min and then fixing them with  
143 0.5% glutaraldehyde for 20 min. After a drying period under N<sub>2</sub> stream, the mica surface was  
144 analyzed on a MFP-3D Asylum Research atomic force microscope (Santa Barbara, CA, USA)  
145 using an AC240TS cantilever (Olympus, Tokyo, Japan) in intermittent contact mode with a  
146 nominal spring constant of 2 N/m. Images were acquired in air, with 512 x 512 pixels of  
147 resolution, at a 0.60 Hz scan rate. Image processing was performed by line-wise flattening  
148 only. Since virus particles imaged by this technique were assumed to be ellipsoid, their  
149 volumes were determined as  $V = 4(\pi abc)/3$ , where a, b and c are the semi-axes of the  
150 ellipsoid.

151

152 **Analysis of leakage of viral RNA from samples treated with M $\beta$ CD**

153 Purified Mayaro virus (100  $\mu$ g/mL) was treated with 25 mM M $\beta$ CD as described  
154 above. A control sample was maintained under similar conditions in the absence of the drug.  
155 Subsequently, viral samples were centrifuged on Microcon PCR filters (Millipore),  
156 resuspended in TE buffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 7.5) and incubated for 5 min at

157 4° C with RiboGreen (Molecular Probes) according to the manufacturer's instructions. After  
158 that, the samples were analyzed using a spectrofluorimeter (ISS-PC, Champaign, IL, USA)  
159 with an excitation wavelength of 480 nm and scanning emission from 500 nm to 600 nm.

160

### 161 **Spectrofluorimetric analysis of Laurdan fluorescence**

162 The packing level of Mayaro virus envelope was inferred by means of Laurdan (2-  
163 dimethylamino-6-lauroylnaphthalene) (Molecular Probes) fluorescence. Briefly, viral samples  
164 (100 µg/mL) were incubated with 20 µM Laurdan for 30 min at 4°C and analyzed in a  
165 spectrofluorimeter PC1 (ISS). The samples were excited at 360 nm, and the fluorescence  
166 emission was scanned from 380 to 600 nm. The assay was carried out at 37°C, under constant  
167 stirring. Generalized polarization (GP) values were calculated as a function of the  
168 fluorescence emission intensities at 440 and 490 nm, based on the following equation:

$$169 \quad GP_{\text{corr}} = (I_{(440)} - G \times I_{(490)}) / (I_{(440)} + G \times I_{(490)}),$$

170 where

$$171 \quad G = (GP_{\text{theo}} + GP_{\text{theo}} \times GP_{\text{exp}} - 1 - GP_{\text{exp}}) / (GP_{\text{theo}} \times GP_{\text{exp}} - GP_{\text{theo}} + GP_{\text{exp}} - 1),$$

172  $GP_{\text{theo}}$  corresponds to the known GP value of a standard solution of Laurdan in DMSO at  
173 22°C (0,207), and  $GP_{\text{exp}}$  corresponds to the experimentally determined GP value of the  
174 standard solution (10).

175 **RESULTS**

176

177 **Treatment of MAYV with M $\beta$ CD to deplete cholesterol significantly reduces**  
178 **virus infectivity.** As a first measure of the importance of envelope cholesterol in Mayaro  
179 virus infection, we treated purified virions with two different concentrations of M $\beta$ CD for 30  
180 min to promote cholesterol depletion. Exposure to M $\beta$ CD resulted in a dose-dependent  
181 inhibition of Mayaro virus infectivity, as measured by plaque assays (Fig. 1). Upon addition  
182 of 10 mM M $\beta$ CD, there was a drop of ~3 logs in the virus titer. The decrease in virus  
183 infectivity was even more pronounced with an M $\beta$ CD concentration of 25 mM, where the  
184 virus titer was decreased by ~7 logs, which almost completely abolished virus infectivity. To  
185 prevent the effects of M $\beta$ CD on cellular membranes, virions were subjected to centrifugation  
186 on a Microcon filter to remove the cyclodextrin before adding them to cells. This procedure  
187 did not affect virus titer (data not shown).

188

189 **M $\beta$ CD efficiently removes cholesterol from the MAYV envelope.** We next assayed  
190 the relative depletion of MAYV envelope cholesterol mediated by M $\beta$ CD treatment. Purified  
191 MAYV was treated with either 10 mM or 25 mM of M $\beta$ CD for 30 min to promote cholesterol  
192 depletion as described above for the infectivity assays. The cholesterol content was  
193 determined using a cholesterol assay kit (Fig. 2). MAYV showed a dose-dependent decrease  
194 in envelope cholesterol content. Most of the cholesterol (~85%) was removed by treatment  
195 with 10 mM M $\beta$ CD. Treatment of virus particles with 25 mM M $\beta$ CD removed an additional  
196 10%, making up a total of ~95% of the cholesterol depleted from the viral envelope.

197

198 **Cholesterol depletion from the MAYV envelope significantly affects viral**  
199 **structure.** In order to examine the effects of cholesterol depletion on viral structure, M $\beta$ CD-

200 treated and mock-treated virions were initially subjected to negative-staining electron  
201 microscopy (Fig. 3). As revealed, cholesterol depletion led to morphological alterations of the  
202 virus particles. Treatment with 10 mM M $\beta$ CD caused mild changes characterized by a  
203 destabilization of the envelope of the virions (Fig. 3B) expressed by loss of its tight fit over  
204 nucleocapsids, leading to an irregular virion shape. Much more drastic changes were observed  
205 for particles treated with 25 mM M $\beta$ CD, evidenced by a strong permeabilization of the viral  
206 membrane in the virions, where a more electron dense area inside the virus particles was  
207 observed (Fig. 3C). This alteration is more clearly evidenced in the particle indicated by the  
208 arrow in Fig. 3C, showing the formation of a large gap in its envelope. The arrow points to the  
209 exit of an amorphous material (which may include the viral RNA) through this gap. In a  
210 general way, virus particles exposed to 25 mM M $\beta$ CD seemed to be “empty”, as represented  
211 by the absence of the respective nucleocapsids in their insides (Fig. 3C). In support of this  
212 observation, a more detailed analysis of the electron microscopy images obtained with this  
213 M $\beta$ CD concentration revealed the presence of envelope-free nucleocapsid-like structures near  
214 the permeabilized virus particles (data not shown).

215         The effects of cholesterol depletion on viral integrity were also evaluated by atomic  
216 force microscopy (AFM) (Fig. 4). MAYV presents an icosahedral symmetry and a typical  
217 diameter of ~70 nm (25), but virions imaged under this technique presented a collapse, given  
218 that its height is reduced while its length and width are increased (Fig. 4A and Table 1),  
219 resembling an ellipsoid. This seems to be due to an artifact inherent to virus particle  
220 immobilization onto the mica surface and was previously observed for other enveloped  
221 viruses (26). However, there was a strong correlation between the images obtained by  
222 negative-staining electron microscopy and AFM. Viral envelope destabilization with mild  
223 morphological changes was observed with 10 mM M $\beta$ CD (Fig. 4B) while strong  
224 permeabilization of the viral membrane with 25 mM M $\beta$ CD was evidenced by the formation

225 of “holes” in this structure (Fig. 4C, arrows). Moreover, M $\beta$ CD treatment led to changes in  
226 virus particle dimensions (Table 1), which resulted in a decrease of virus particle volume (Fig.  
227 5), as measured from AFM images. This volume decrease is more evident following treatment  
228 with 25 mM M $\beta$ CD and is probably an outcome of leakage of internal components of the  
229 virions, as suggested by the deposition of an amorphous material around them (Fig. 4C).

230 In order to test the hypothesis of RNA release from MAYV particles subjected to  
231 treatment with 25 mM M $\beta$ CD, we performed a test with RiboGreen, a fluorescent dye used in  
232 the detection of nucleic acids, including both RNA and DNA. This probe is almost non-  
233 fluorescent when free in solution, but it shows a large increase in quantum efficiency when  
234 bound to nucleic acids, evidenced by the increase in the detected fluorescence intensity signal.  
235 Purified Mayaro virus samples were treated with 25 mM M $\beta$ CD and assayed for RiboGreen  
236 binding (Fig. 6). A large increase in fluorescence intensity (Fig. 6, dashed line) was observed  
237 when virus particles were treated with 25 mM M $\beta$ CD, confirming that RNA is accessible to  
238 the fluorescent probe after treatment. Accessibility of RNA to RiboGreen may be caused by  
239 either particle envelope permeabilization, exposing the nucleocapsid and then rendering the  
240 RNA accessible to the probe through its fenestrations (39), or release of viral RNA due to  
241 disassembly of exposed nucleocapsids, both conditions suggested by electron and atomic  
242 force microscopy.

243

244 **Treatment of MAYV with M $\beta$ CD to deplete cholesterol perturbs envelope**  
245 **organization.** Given the high cholesterol content in the alphavirus envelope, we next  
246 evaluated by Laurdan generalized polarization the possible occurrence of a highly ordered  
247 phase in this membrane, as well as the effect of cholesterol depletion from this structure on its  
248 degree of organization (Fig. 7). Laurdan is a fluorescent probe that detects changes in  
249 membrane phase properties through its sensitivity to the polarity of its environment in the

250 bilayer. Variations in membrane water content cause shifts in the Laurdan emission spectrum,  
251 which is, for instance, blue-shifted with increasing membrane condensation as a consequence  
252 of the exclusion of water molecules from the lipid bilayer (14). The quantification of  
253 membrane order is achieved by the generalized polarization (GP) values that range from -1,  
254 corresponding to the most fluid regions, to +1, corresponding to the most condensed ones (28,  
255 10). Lipid phase boundaries for GP values have already been estimated by using liposomes  
256 with lipid compositions similar to those of cellular membranes. In such liposomes, GP values  
257 of  $<-0.05$  and  $>0.55$  represent membranes in fluid and gel phases, respectively, while GP  
258 values between  $-0.05$  and  $0.25$  and between  $0.25$  and  $0.55$  represent liquid-disordered/nonraft  
259 and liquid-ordered/raft domains, respectively (9).

260 As shown in Fig. 7A, cholesterol depletion from the MAYV envelope led to a red-shift  
261 in Laurdan emission spectrum of  $\sim 10$  nm with 10 mM M $\beta$ CD and  $\sim 15$  nm with 25 mM  
262 M $\beta$ CD, indicating that cholesterol molecules are related to the maintenance of a certain  
263 degree of organization in the MAYV envelope. Interestingly, the analysis of GP values (Fig.  
264 7B) revealed the presence of a highly ordered phase in this membrane (GP value of  $\sim 0.50$  for  
265 control virus) that undergoes a significant disorganization as a function of M $\beta$ CD treatment  
266 (GP values of  $\sim 0.33$  and  $\sim 0.25$  for 10 mM and 25 mM M $\beta$ CD-treated virus, respectively).

267 **DISCUSSION**

268

269 In this work, we examined the role of envelope cholesterol on Mayaro virus infection  
270 and uncovered a striking requirement of this lipid for viral biological activity. The marked  
271 drop in virus infectivity was likely due to the permeabilization of virus envelope promoted by  
272 cholesterol depletion from this structure, suggesting that this lipid is an important component  
273 for the maintenance of virus particle integrity. Our results show that envelope cholesterol  
274 depletion changes the lateral organization of the envelope membrane leading to envelope  
275 morphological changes and particle destabilization. Similar effects of cholesterol depletion  
276 using higher concentrations of M $\beta$ CD on influenza virus type A, HIV-1 and SIV were  
277 reported previously (2, 11). The fact that Mayaro virus particle destabilization is caused by  
278 lower concentrations of M $\beta$ CD suggests that alphavirus particles may be more dependent on  
279 envelope cholesterol for its structural stability and infectivity. Although we observed some  
280 structural changes in MAYV with lower concentrations of the drug, the more drastic effects  
281 were only seen when 25 mM M $\beta$ CD was used. It is interesting to note that while treatment  
282 with 10 mM M $\beta$ CD removed most of the cholesterol (85%) present in the envelope, treatment  
283 with 25 mM removed only an additional 10% (Fig. 2). Therefore, this small additional portion  
284 seems to be critical for particle integrity. Laurdan fluorescence data (Fig. 7) show that the  
285 virus particles present a highly ordered liquid phase envelope (GP = 0.49) on average, and  
286 treatment with 10 mM M $\beta$ CD changes membrane organization to a low ordered liquid phase  
287 (GP = 0.35). This change is accompanied by small structural effects as observed by  
288 transmission electron microscopy (Fig. 3B) and AFM (Fig. 4B). When 25 mM M $\beta$ CD is used,  
289 the additional 10% cholesterol removed brings the membrane envelope close to the limit  
290 between liquid ordered and liquid disordered phases (GP = 0.25). This seems to be enough to  
291 cause a drastic morphological change with permeabilization of the particles and leakage of

292 their internal components (Figs. 3C and 4C). The leakage of internal material from particles is  
293 confirmed by the change in particle dimensions and volume as measured by AFM (Fig. 5,  
294 Table 1). All these changes seem to lead to RNA release as observed by the increased  
295 RiboGreen fluorescence emission after particle treatment (Fig. 6). The gradual removal of  
296 cholesterol observed here is in agreement with the proposal by Graham and coworkers that  
297 two different pools of cholesterol seem to be present in the membrane with different  
298 susceptibility to removal by M $\beta$ CD (11). Our results show that the final small amount of  
299 cholesterol removed from the MAYV envelope membrane is responsible for the more drastic  
300 changes, suggesting that this final cholesterol, which is harder to remove, is probably involved  
301 in an important structural characteristic of the virus envelope that confers stability to the  
302 particle. Since the loss of lateral organization correlates with the structural damage, we  
303 speculate that this cholesterol is involved in raft-like structures present in the MAYV  
304 envelope.

305         The presence of a high cholesterol content in the alphavirus envelope can be justified  
306 by the well-established requirement of this lipid for efficient alphavirus budding through the  
307 cellular plasma membrane (19, 20, 24). In general, the lipid composition of the viral  
308 membrane resembles that of the host cell membrane. However, the molar ratio of cholesterol  
309 to phospholipids in alphavirus particles isolated from mammalian cells is 1:1, which is much  
310 higher than that for plasma membranes in general (18, 34). These observations, taken together  
311 with our data showing the presence of a liquid-ordered phase in the MAYV envelope by  
312 means of Laurdan generalized polarization, indirectly suggest that alphavirus budding may  
313 occur through cholesterol-enriched (raft-like) domains. In fact, E1 and E2 envelope  
314 glycoproteins undergo a post-translational processing where palmitic acid is attached to them  
315 (39). This palmitoylation is extremely important to address E1 and E2 to the plasma  
316 membrane and for the virus particle budding process (17). Palmitoylation of proteins is an

317 addressing signal for highly ordered membrane regions, such as rafts, which are present in the  
318 plasma membrane (4, 38). E2 palmitoylation provides a lipid anchor to other saturated chain  
319 fatty acids and cholesterol when E2 is in the membrane just before viral budding, increasing  
320 viral stability as proposed for HA (33). Thus, it is likely that the high degree of order found in  
321 the envelope of Mayaro virus is a remaining characteristic from these regions providing a  
322 rigid encapsulated structure that protects the viral nucleocapsid.

323         Determination of membrane organization through Laurdan generalized polarization  
324 shows an intrinsic advantage: Laurdan distributes equally into fluid or condensed membranes  
325 and does not associate itself with specific fatty acids or phospholipid head groups (1).  
326 Therefore, GP values reflect the overall membrane structure and not a specific lipid or protein  
327 composition (14). The presence of a high degree of order in the viral envelope was reported  
328 previously for Influenza viruses (35), which are known for selecting raft domains during their  
329 budding from the plasma membrane (41). Similar to what we observed for MAYV, Scheiffele  
330 and coworkers showed that the SFV envelope is highly organized. Together, the previous  
331 work and ours suggest that this may be a general characteristic of *Alphavirus* genus members  
332 (35). Some viruses, such as the West Nile virus (WNV), can even modulate host cell  
333 cholesterol homeostasis by up-regulating the biosynthesis of this lipid and redistributing it to  
334 viral replication membranes (23). Although we have shown that cholesterol is involved in the  
335 maintenance of the MAYV envelope in a raft-like phase, we cannot exclude the contribution  
336 of viral proteins to this high organization, since alphaviruses have a high density of proteins  
337 embedded in their envelopes. Indeed, data from earlier studies indicate that the increased  
338 microviscosity of alphavirus membranes appears to have a great contribution of the  
339 interaction of the viral proteins with cellular lipids selected during virus budding (27, 36).  
340 These highly ordered structures might be related to the maintenance of viral envelope  
341 glycoproteins in a functional conformation, or even provide a rigid envelopment structure to

342 protect the virion nucleocapsid from the extracellular milieu. Our data suggest that when this  
343 organization is affected, the particle becomes unstable and more susceptible to disassembly.  
344 The drop in infectivity observed here strongly suggests that the existence of lateral membrane  
345 organization in virus particles is important for virus-cell interaction because of its importance  
346 for particle stability and structure. The destabilization caused by cholesterol removal may be  
347 mimicking the destabilization of the envelope that happens during virus particle entry into  
348 host cells, leading to RNA release inside the cell after fusion. Further investigation is  
349 necessary in order to evaluate this relationship.

350         The cholesterol requirement of alphavirus infection exhibits an interesting paradox.  
351 The members of this genus, as arboviruses, use mosquitoes as vectors during their cycle in  
352 nature. However, insects are cholesterol auxotrophs; i.e., they cannot synthesize cholesterol  
353 (8). Thus, how alphaviruses deal with their dependence on cholesterol during the infection of  
354 these cells remains unclear. A possibility is that cholesterol from the mosquito blood meal diet  
355 allows the initial infection of this host by alphaviruses. Viruses grown in mosquito cells seem  
356 to have a different composition with more ethanolamine-based phospholipids and a  
357 cholesterol:phospholipid ratio of 1:6 (21, 22). Experiments are being carried out to further  
358 elucidate the role of envelope and membrane cholesterol during infection by MAYV isolated  
359 from insect cells.

360         Altogether, our work shows for the first time that lateral organization is present in the  
361 MAYV envelope and is crucial for virus particle stability and infectivity. In the case of  
362 particles isolated from mammalian cells, cholesterol seems to be a factor of great importance  
363 for the maintenance of their structure, most likely because of its role in the formation of raft-  
364 like lipid domains. Enveloped virus particles are naturally formed by the budding of virions  
365 from different cell membranes. Thus, the viral envelope represents a portion of the membrane  
366 just modified by virus particle assembly. Since cell membranes are very complex and difficult

367 to isolate in a high state of purity, the use of virus particles presents a very interesting  
368 approach to study lateral organization in membranes and the importance of membrane  
369 domains in protein-membrane interactions

370 **ACKNOWLEDGMENTS**

371

372           We are grateful to Emerson R. Gonçalves for competent technical assistance. This  
373 work was supported by grants from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível  
374 Superior (CAPES), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico  
375 (CNPq), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro  
376 (FAPERJ), Fundação Universitária José Bonifácio (FUJB), Instituto Milênio de Biologia  
377 Estrutural em Biomedicina e Biotecnologia (IMBEBB), Instituto Nacional de Ciência e  
378 Tecnologia em Biologia Estrutural e Biomagem (INCTBEB) and Programa de Apoio a  
379 Núcleos de Excelência (PRONEX).

380 **REFERENCES**

381

382 1. **Bagatolli, L. A., S. A. Sanchez, T. Hazlett, and E. Gratton.** 2003. Giant vesicles,  
383 laurdan, and two-photon fluorescence microscopy: evidence of lipid lateral separation  
384 in bilayers. *Methods Enzimol.* **360**:481-500.

385

386 2. **Barman, S., and D. P. Nayak.** 2007. Lipid raft disruption by cholesterol depletion  
387 enhances influenza A virus budding from MDCK cells. *J. Virol.* **81**:12169-12178.

388

389 3. **Bender, F. C., J. C. Whitbeck, M. Ponce de Leon, H. Lou, R. J. Eisenberg, and G.**  
390 **H. Cohen.** 2003. Specific association of glycoprotein B with lipid rafts during herpes  
391 simplex virus entry. *J. Virol.* **77**:9542-9552.

392

393 4. **Brown, D. A., and E. London.** 1998. Functions of lipid rafts in biological  
394 membranes. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **14**:111-136.

395

396 5. **Campbell, S. M., S. M. Crowe, and J. Mak.** 2001. Lipid rafts and HIV-1: from viral  
397 entry to assembly of progeny virions. *J. Clin. Virol.* **22**:217-227.

398

399 6. **Campbell, S. M., S. M. Crowe, and J. Mak.** 2002. Virion-associated cholesterol is  
400 critical for the maintenance of HIV-1 structure and infectivity. *AIDS* **16**:2253-2261.

401

402 7. **Chung, C. S., C. Y. Huang, and W. Chang.** 2005. Vaccinia virus penetration  
403 requires cholesterol and results in specific viral envelope proteins associated with lipid  
404 rafts. *J. Virol.* **79**:1623-1634.

- 405
- 406 8. **Clayton, R. B.** 1964. The utilization of sterols by insects. *J. Lipid Res.* **15**:3-19.
- 407
- 408 9. **Dietrich, C., L. A. Bagatolli, Z. N. Volovyk, N. L. Thompson, M. Levi, K.**
- 409 **Jacobson, and E. Gratton.** 2001. Lipid rafts reconstituted in model membranes.
- 410 *Biophys. J.* **80**:1417-1428.
- 411
- 412 10. **Gaus, K., T. Zech, and T. Harder.** 2006. Visualizing membrane microdomains by
- 413 Laurdan 2-photon microscopy. *Mol. Membr. Biol.* **23**:41-48.
- 414
- 415 11. **Graham, D. R., E. Chertova, J. M. Hilburn, L. O. Arthur, and J. E. Hildreth.**
- 416 2003. Cholesterol depletion of human immunodeficiency virus type 1 and simian
- 417 immunodeficiency virus with  $\beta$ -cyclodextrin inactivates and permeabilizes the virions:
- 418 evidence for virion-associated lipid rafts. *J. Virol.* **77**:8237-8248.
- 419
- 420 12. **Guyader, M., E. Kiyokawa, L. Abrami, P. Turelli, and D. Trono.** 2002. Role for
- 421 human immunodeficiency virus type 1 membrane cholesterol in viral internalization.
- 422 *J. Virol.* **76**:10356-10364.
- 423
- 424 13. **Hambleton, S., S. P. Steinberg, M. D. Gershon, and A. A. Gershon.** 2007.
- 425 Cholesterol dependence of varicella-zoster virion entry into target cells. *J. Virol.*
- 426 **81**:7548-7558.
- 427

- 428 14. **Harris, F. M., K. B. Best, and J. D. Bell.** 2002. Use of laurdan fluorescence intensity  
429 and polarization to distinguish between changes in membrane fluidity and  
430 phospholipid order. *Biochim. Biophys. Acta* **1565**:123-128.
- 431
- 432 15. **Huang, H., Y. Li, T. Sadaoka, H. Tang, T. Yamamoto, K. Yamanishi, and Y.**  
433 **Mori.** 2006. Human herpesvirus 6 envelope cholesterol is required for virus entry. *J.*  
434 *Gen. Virol.* **87**:277-285.
- 435
- 436 16. **Ilangumaran, S., and D. C. Hoessli.** 1998. Effects of cholesterol depletion by  
437 cyclodextrin on the sphingolipid microdomains of the plasma membrane. *Biochem. J.*  
438 **335**:433-440.
- 439
- 440 17. **Ivanova, L., and M. J. Schlesinger.** 1993. Site-directed mutations in the Sindbis virus  
441 E2 glycoprotein identify palmitoylation sites and affect virus budding. *J. Virol.*  
442 **67**:2546–2551.
- 443
- 444 18. **Laine, R., H. Söderlund, and O. Renkonen.** 1973. Chemical composition of Semliki  
445 Forest virus. *Intervirology* **1**:110-118.
- 446
- 447 19. **Lu, Y. E., and M. Kielian.** 2000. Semliki forest virus budding: assay, mechanisms,  
448 and cholesterol requirement. *J. Virol.* **74**:7708-7719.
- 449
- 450 20. **Lu, Y. E., T. Cassese, and M. Kielian.** 1999. The cholesterol requirement for Sindbis  
451 virus entry and exit and characterization of a spike protein region involved in  
452 cholesterol dependence. *J. Virol.* **73**:4272-4278.

453  
454  
455  
456  
457  
458  
459  
460  
461  
462  
463  
464  
465  
466  
467  
468  
469  
470  
471  
472  
473  
474  
475  
476  
477

21. **Luukkonen, A., C. H. Bonsdorff, and O. Renkonen.** 1977. Characterization of Semliki Forest virus grown in mosquito cells. Comparison with the virus from hamster cells. *Virology* **78**:331-335.
22. **Luukkonen, A., L. Kääriäinen, and O. Renkonen.** 1976. Phospholipids of Semliki Forest virus grown in cultured mosquito cells. *Biochim. Biophys. Acta* **450**:109-120.
23. **Mackenzie, J. M., A. A. Khromykh, and R. G. Parton.** 2007. Cholesterol manipulation by West Nile virus perturbs the cellular immune response. *Cell Host Microbe* **2**:229-239.
24. **Marquardt, M. T., T. Phalen, and M. Kielian.** 1993. Cholesterol is required in the exit pathway of Semliki Forest virus. *J. Cell Biol.* **123**:57-65.
25. **Mezencio, J. M., and M. A. Rebello.** 1993. Mayaro virus proteins. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **88**:299-304.
26. **Moloney, M., L. McDonnell, and H. O'Shea.** 2002. Immobilisation of Semliki Forest virus for atomic force microscopy. *Ultramicroscopy* **91**:275-279.
27. **Moore, N. F., Y. Barenholz, and R. R. Wagner.** 1976. Microviscosity of togavirus membranes studied by fluorescence depolarization: influence of envelope proteins and the host cell. *J. Virol.* **19**:126-135.

- 478 28. **Parasassi, T., G. de Stasio, A. D'Ubaldo, and E. Gratton.** 1990. Phase fluctuation in  
479 phospholipid membranes revealed by Laurdan fluorescence. *Biophys. J.* **57**:1179-  
480 1186.
- 481
- 482 29. **Parasassi, T., G. de Stasio, R. Ravagnan, M. Rusch, and E. Gratton.** 1991.  
483 Quantitation of lipid phases in phospholipid vesicles by the generalized polarization of  
484 Laurdan fluorescence. *Biophys. J.* **60**:179-189.
- 485
- 486 30. **Phalen, T., and M. Kielian.** 1991. Cholesterol is required for infection by Semliki  
487 Forest virus. *J. Cell Biol.* **112**:615-623.
- 488
- 489 31. **Pinheiro, F. P., and J. W. Leduc.** 1998. Mayaro virus disease, p. 137-150. In T. P.  
490 Monath (ed.), *The arboviruses: epidemiology and ecology*, CRC Press Inc., Boca  
491 Raton, FL.
- 492
- 493 32. **Pitha, J., T. Irie, P. B. Sklar, and J. S. Nye.** 1988. Drug solubilizers to aid  
494 pharmacologists: amorphous cyclodextrin derivatives. *Life Sci.* **43**:493-502.
- 495
- 496 33. **Polozov, I. V., L. Bezrukov, K. Gawrisch, and J. Zimmerberg.** 2008. Progressive  
497 ordering with decreasing temperature of the phospholipids of influenza virus. *Nat.*  
498 *Chem. Biol.* **4**:248-255.
- 499
- 500 34. **Renkonen, O., L. Kääriäinen, K. Simons, and C. G. Gahmberg.** 1971. The lipid  
501 class composition of Semliki Forest Virus and of plasma membranes of the host cells.  
502 *Virology* **46**:318-326.

503  
504  
505  
506  
507  
508  
509  
510  
511  
512  
513  
514  
515  
516  
517  
518  
519  
520  
521  
522  
523  
524  
525  
526  
527

35. **Scheiffele, P., A. Rietveld, T. Wilk, and K. Simons.** 1999. Influenza viruses select ordered lipid domains during budding from the plasma membrane. *J. Biol. Chem.* **274**:2038-2044.
36. **Sefton, B. M., and B. J. Gaffney.** 1974. Effect of the viral proteins on the fluidity of the membrane lipids in Sindbis virus. *J. Mol. Biol.* **90**:343-358.
37. **Smit, J. M., R. Bittman, and J. Wilschut.** 1999. Low pH-dependent fusion of Sindbis virus with receptor-free cholesterol- and sphingolipid-containing liposomes. *J. Virol.* **73**:8476-8484.
38. **Smotrýs, J. E., and M. E. Linder.** 2004. Palmitoylation of intracellular signaling proteins: regulation and function. *Annu. Rev. Biochem.* **73**:559-587.
39. **Strauss, J. H., and E. G. Strauss.** 1994. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiol. Rev.* **58**:491-562.
40. **Sun, X., and G. R. Whittaker.** 2003. Role for influenza virus envelope cholesterol in virus entry and infection. *J. Virol.* **77**:12543-12551.
41. **Takeda, M., G. P. Leser, C. J. Russell, and R. A. Lamb.** 2003. Influenza virus hemagglutinin concentrates in lipid raft microdomains for efficient viral fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**:14610-14617.

- 528 42. **Tesh, R. B., D. M. Watts, K. L. Russell, C. Damodaran, C. Calampa, C. Cabezas,**  
529 **G. Ramirez, B. Vasquez, C. G. Hayes, C. A. Rossi, A. M. Powers, C. L. Hice, L. J.**  
530 **Chandler, B. C. Cropp, N. Karabatsos, J. T. Roehrig, and D. J. Gubler.** 1999.  
531 Mayaro virus disease: an emerging mosquito-borne zoonosis in tropical South  
532 America. *Clin. Infect. Dis.* **28**:67-73.
- 533
- 534 43. **Vasconcelos, P. F., A. P. Travassos da Rosa, S. G. Rodrigues, E. S. Travassos da**  
535 **Rosa, N. Dégallier, and J. F. Travassos da Rosa.** 2001. Inadequate management of  
536 natural ecosystem in the Brazilian Amazon region results in the emergence and  
537 reemergence of arboviruses. *Cad. Saúde Pública* **17**:155-164.
- 538
- 539 44. **Viard, M., I. Parolini, M. Sargiacomo, K. Fecchi, C. Ramoni, S. Ablan, F. W.**  
540 **Ruscetti, J. M. Wang, and R. Blumenthal.** 2002. Role of cholesterol in human  
541 immunodeficiency virus type 1 envelope protein-mediated fusion with host cells. *J.*  
542 *Viro.* **76**:11584-11595.

543 **FIGURE LEGENDS**

544

545 **Fig. 1. Effect of cholesterol depletion by M $\beta$ CD on virus infectivity.** Purified MAYV was  
546 pretreated with 10 or 25 mM M $\beta$ CD or mock-treated with PBS as a control. After treatment,  
547 the virions were subjected to centrifugation on a Microcon filter to remove the cyclodextrin  
548 before adding them to cells. Virus titer was determined by plaque assay in Vero cells and  
549 expressed as plaque-forming units (PFU) per volume unit.

550

551 **Fig. 2. Determination of relative cholesterol content of M $\beta$ CD-treated virus.** Purified  
552 MAYV was pretreated with 10 or 25 mM M $\beta$ CD or mock-treated with PBS as a control. The  
553 virions were then subjected to centrifugation on a Microcon filter and analyzed using a  
554 cholesterol assay kit. The cholesterol contents were plotted based on fluorescence units.

555

556 **Fig. 3. Effect of M $\beta$ CD treatment on viral structure as assessed by negative-staining**  
557 **electron microscopy.** Purified MAYV was pretreated with 10 (B) or 25 (C) mM M $\beta$ CD or  
558 mock-treated with PBS as a control (A), prepared for negative-staining and then analyzed  
559 under a transmission electron microscope. The arrow in Panel C indicates possible internal  
560 components of a viral particle that seems to have extravasated through the clearly visible hole  
561 in the particle envelope. Bars: 100 nm.

562

563 **Fig. 4. Effect of M $\beta$ CD treatment on viral structure as assessed by atomic force**  
564 **microscopy.** Purified MAYV was pretreated with 10 (B) or 25 (C) mM M $\beta$ CD or mock-  
565 treated with PBS as a control (A), allowed to adsorb onto a mica surface and then analyzed  
566 under an atomic force microscope operated in intermittent contact mode. Arrows in Panel C  
567 indicate holes in the viral envelope.

568 **Fig. 5. Determination of virus particle volume as a function of M $\beta$ CD treatment.** Virus  
569 particle volume was determined using the dimensions obtained from AFM images showed in  
570 Table 1. Volumes were calculated as for an ellipsoid, as described in Materials and Methods.

571

572 **Fig. 6. Evaluation of the extravasation of the viral RNA after treatment with M $\beta$ CD.**

573 Purified MAYV was treated with 25 mM of M $\beta$ CD. After the treatment, the viral particles  
574 were centrifuged and incubated with RiboGreen for 5 minutes at 4°C and analyzed in a  
575 spectrofluorimeter. The samples were excited at 480 nm and fluorescence emission was  
576 acquired from 500 to 600 nm. The virus concentration was 100  $\mu$ g/mL. Filled line: Mayaro  
577 virus maintained in similar conditions to the treated virus, but without the presence of drug.  
578 Dashed line: Mayaro Virus treated with 25 mM of M $\beta$ CD.

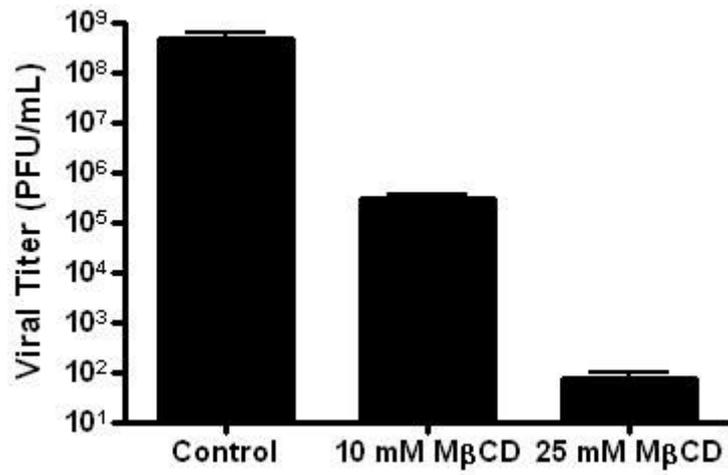
579

580 **Fig. 7. Influence of cholesterol depletion by M $\beta$ CD on viral envelope organization. (A)**

581 Purified MAYV was pretreated with 10 or 25 mM M $\beta$ CD or mock-treated with PBS as a  
582 control. After treatment, the virions were subject to centrifugation on a Microcon filter to  
583 remove the cyclodextrin before incubating them with 20  $\mu$ M Laurdan. Samples were analyzed  
584 on a spectrofluorimeter at 37°C by setting the excitation wavelength at 360 nm and scanning  
585 the fluorescence emission from 380 to 600 nm. (B) Generalized polarization (GP) values were  
586 calculated as a function of the fluorescence emission intensities at 440 and 490 nm, as  
587 described in Materials and Methods.

588

589



590

591

592

593

594

595

596

597

598

599

600

601

602

603

604

605

606

607

608

609

610

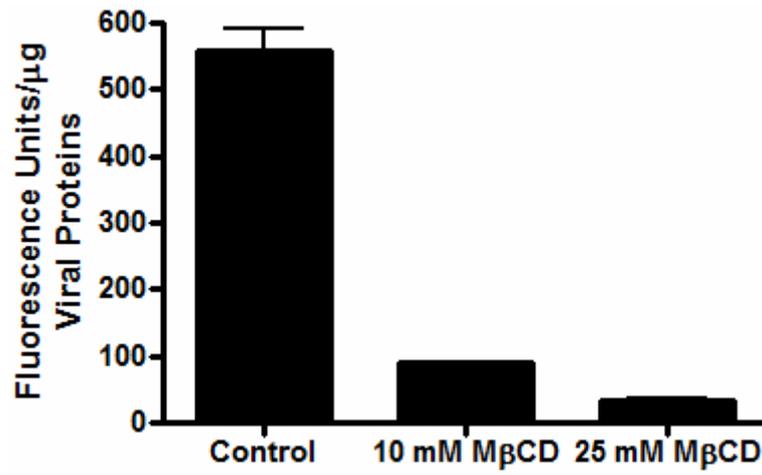
611

612

613

**FIGURE 1**, Sousa Jr. *et al.* 2009

614  
615

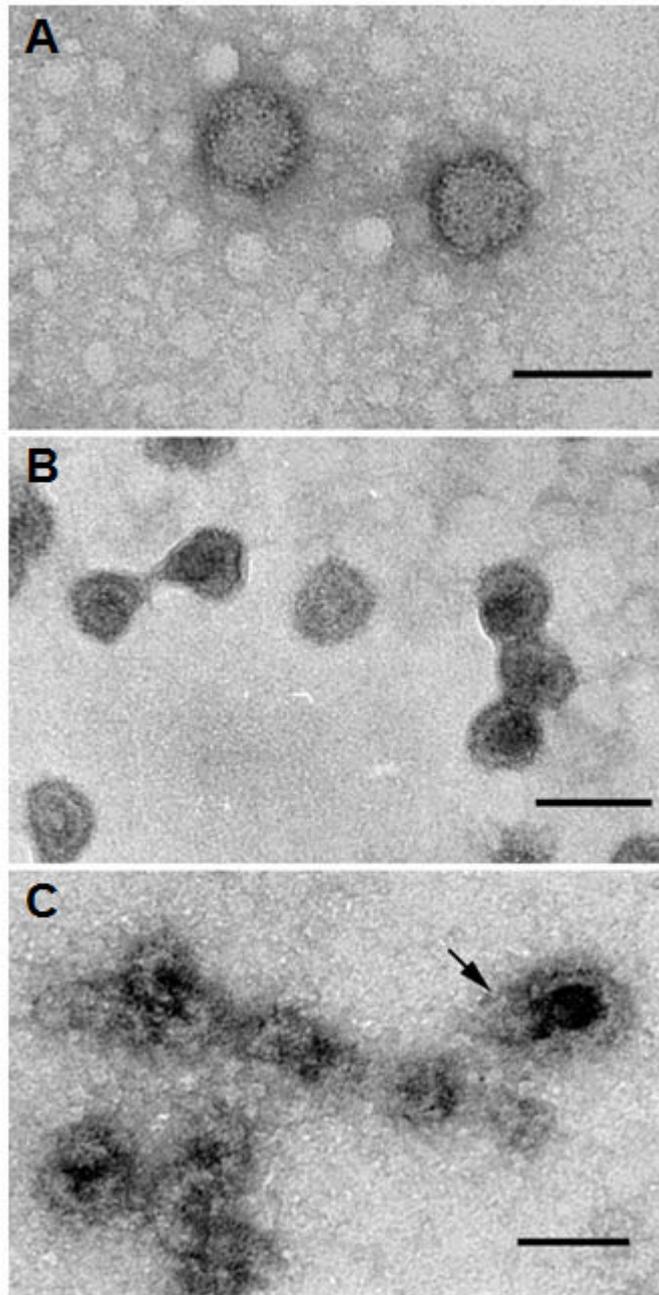


616  
617  
618  
619  
620  
621  
622  
623  
624  
625  
626  
627  
628  
629  
630  
631  
632  
633  
634  
635  
636  
637  
638  
639

**FIGURE 2**, Sousa Jr. *et al.* 2009

640

641



642

643

644

645

646

647

648

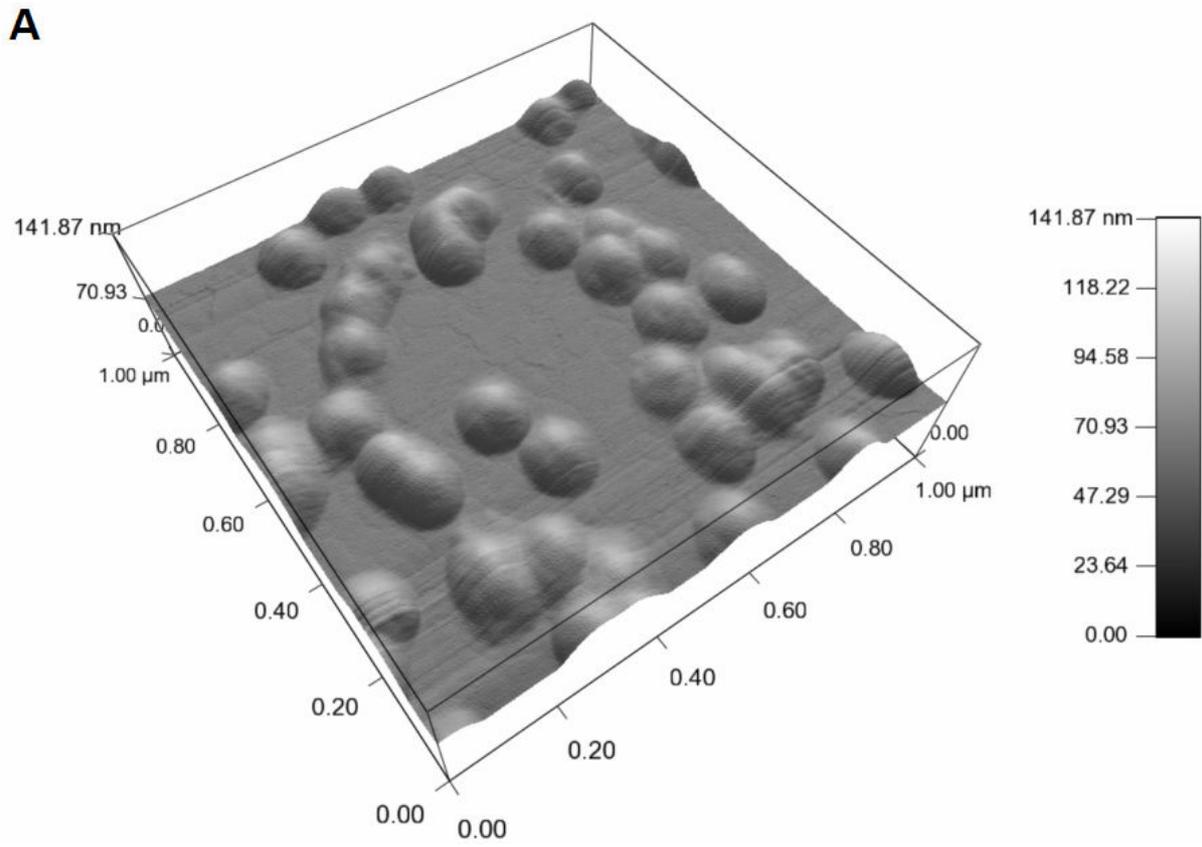
649

650

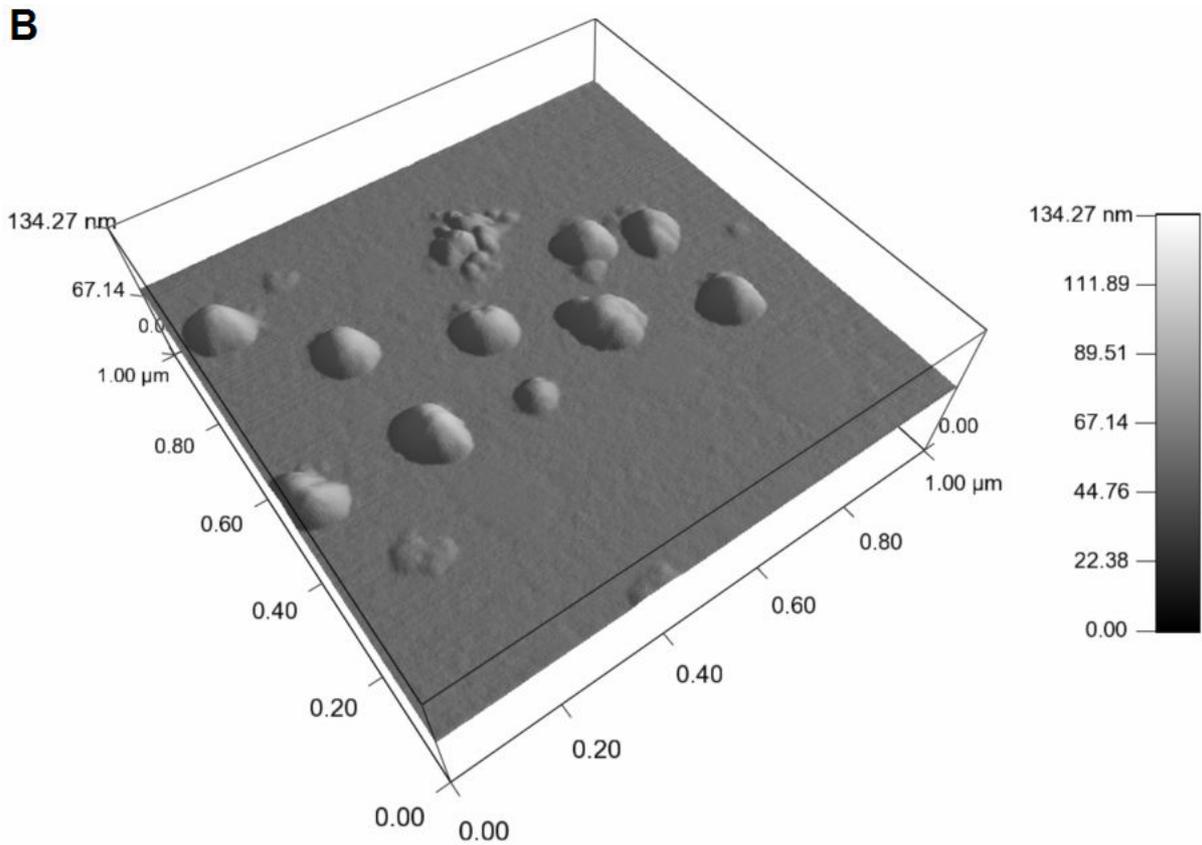
**FIGURE 3**, Sousa Jr. *et al.* 2009

651

652



653

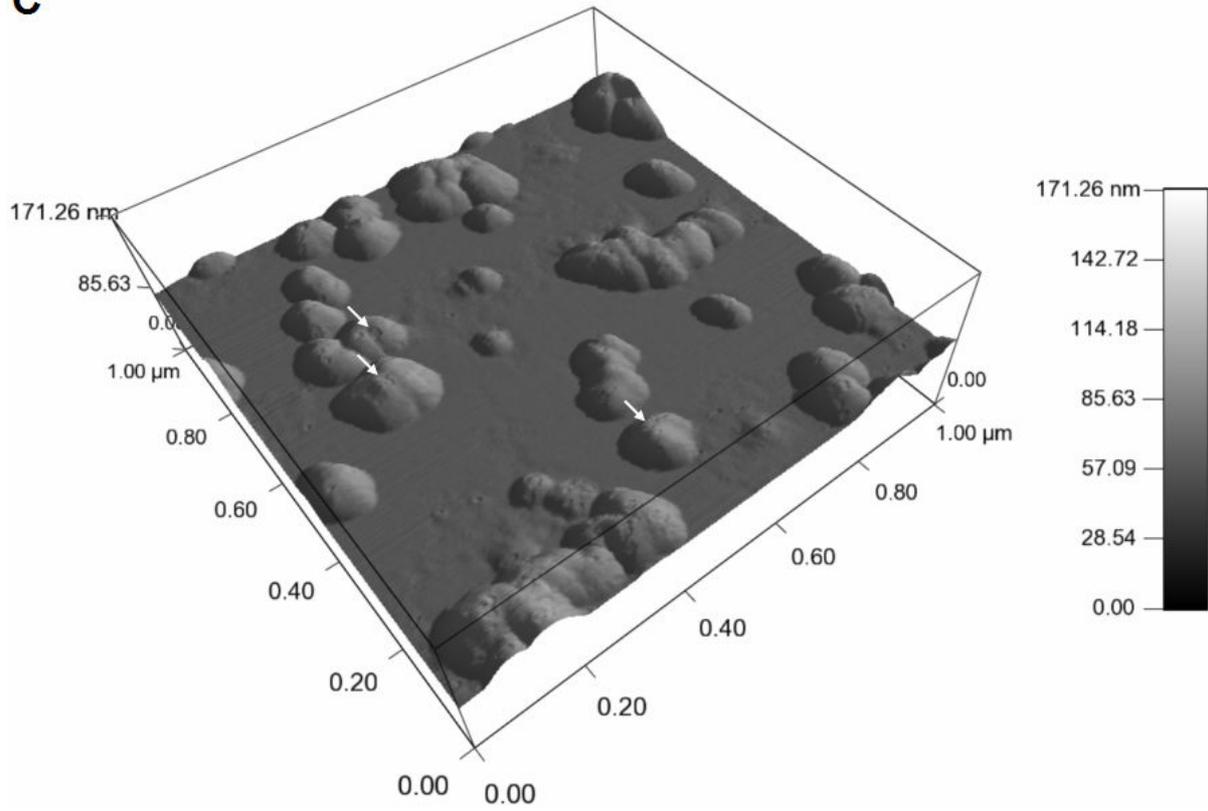


654

655

**FIGURE 4**, Sousa Jr. *et al.* 2009

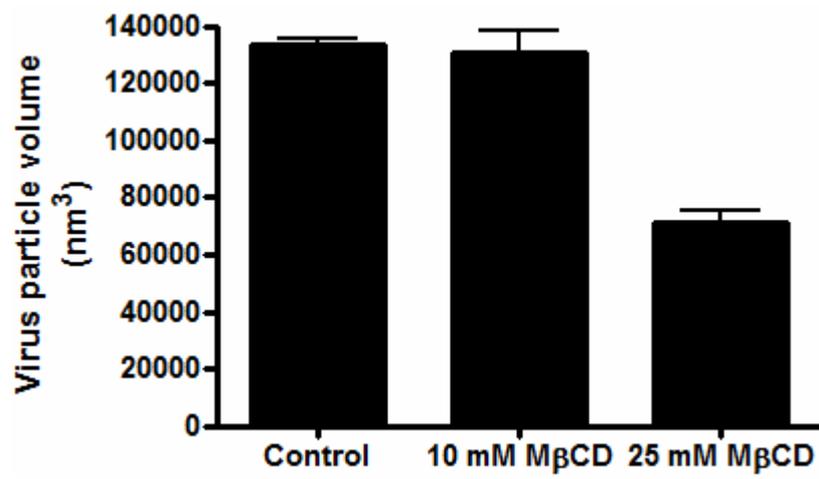
C



656  
657  
658  
659  
660  
661  
662  
663  
664  
665  
666  
667  
668  
669  
670  
671  
672  
673  
674

FIGURE 4, Sousa Jr. *et al.* 2009

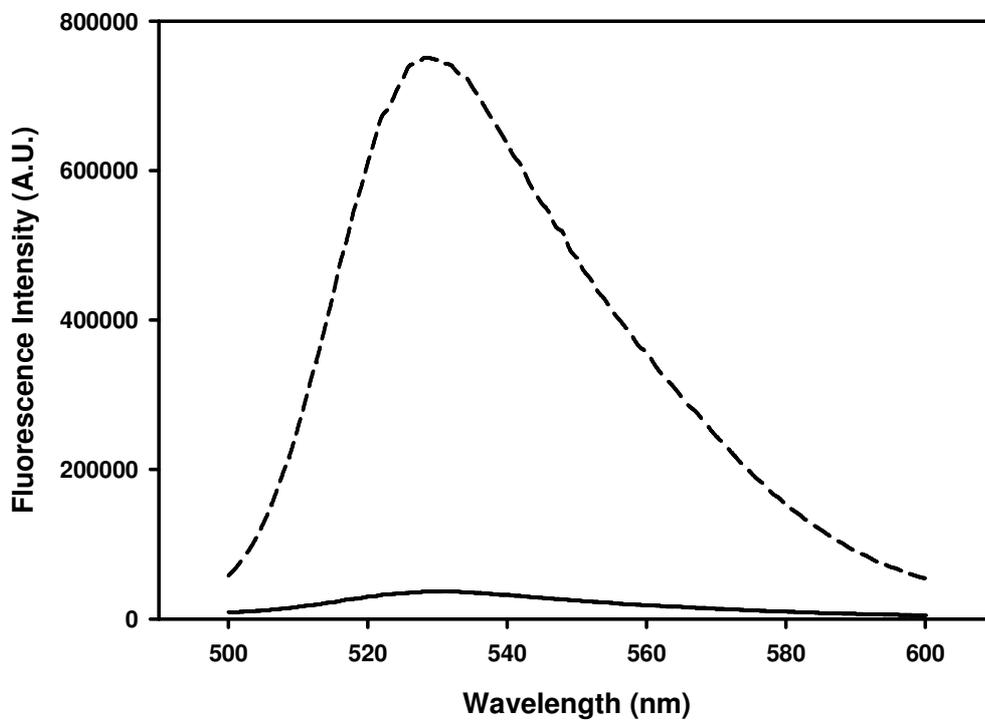
675  
676



677  
678  
679  
680  
681  
682  
683  
684  
685  
686  
687  
688  
689  
690  
691  
692  
693  
694  
695  
696  
697  
698  
699  
700

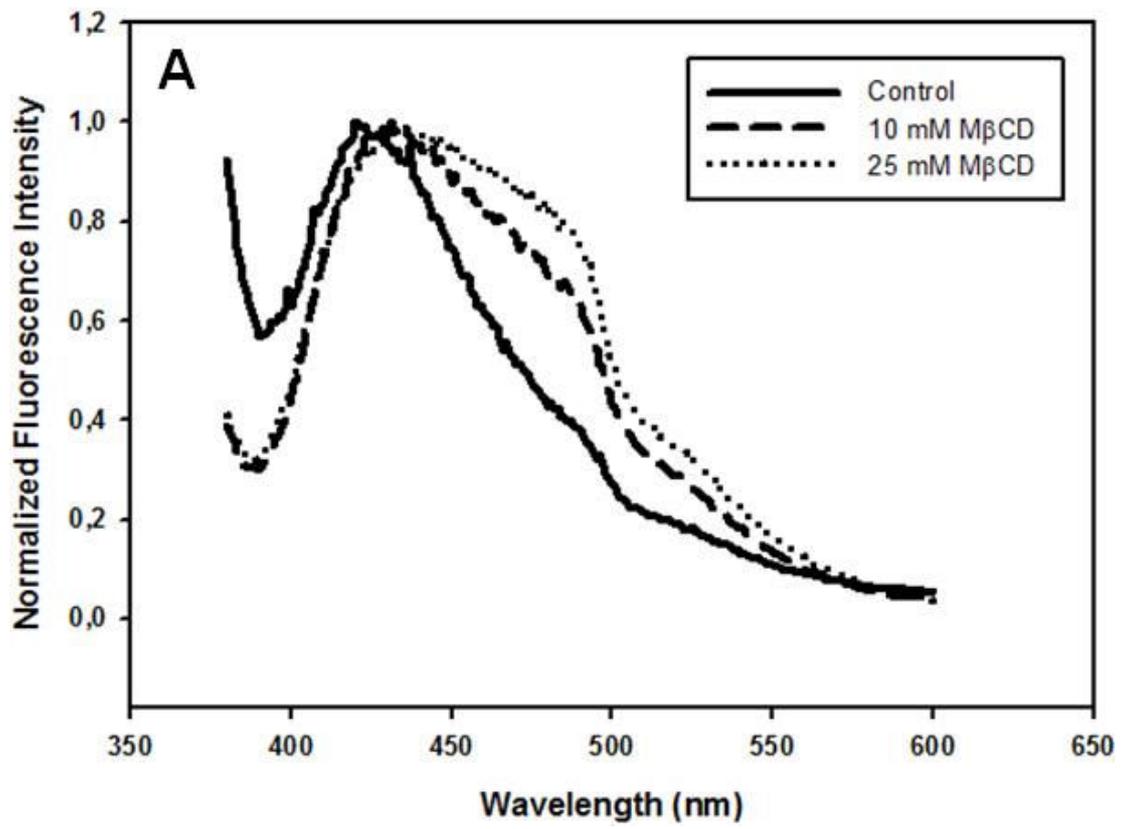
**FIGURE 5**, Sousa Jr. *et al.* 2009

701  
702  
703  
704  
705  
706  
707  
708  
709  
710  
711  
712  
713  
714  
715  
716  
717  
718  
719  
720  
721  
722  
723  
724  
725  
726  
727  
728  
729  
730  
731  
732  
733  
734



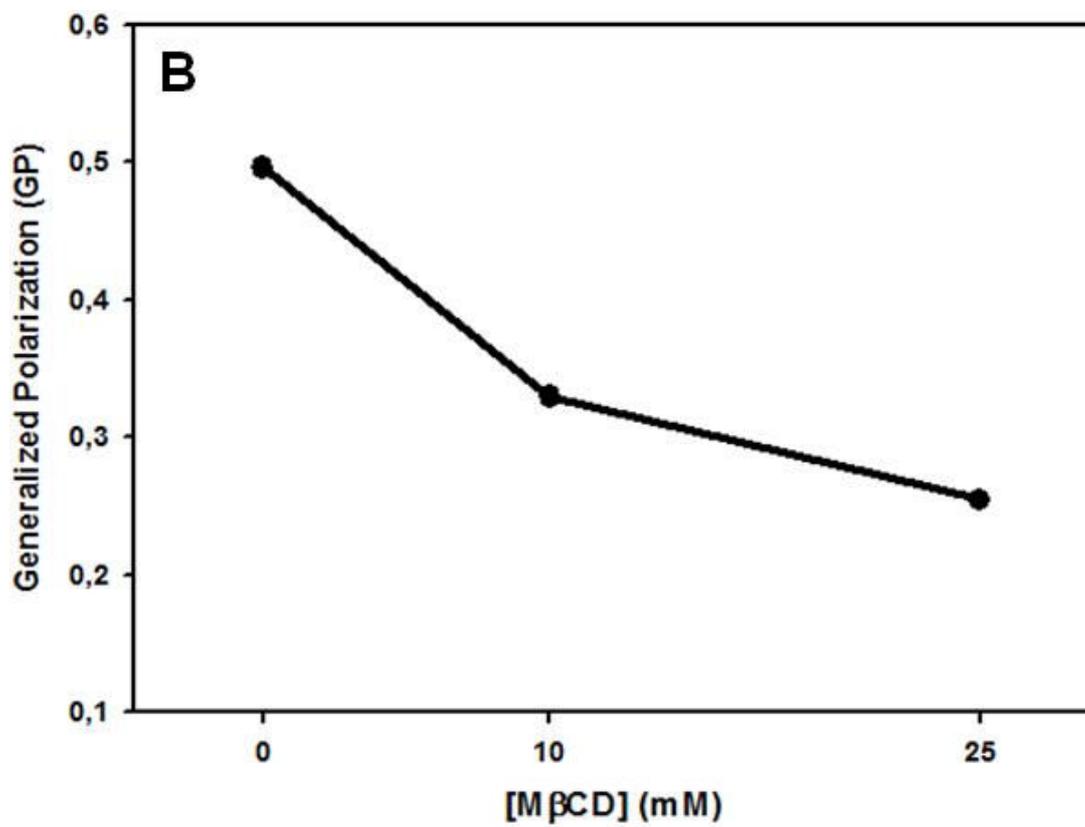
**FIGURE 6**, Sousa Jr. *et al.* 2009

735



736

737



738

739

FIGURE 7, Sousa Jr. *et al.* 2009

740

741

742 **TABLE 1**

743

744

Dimensions of Mayaro virus particles imaged by atomic force microscopy

<b><i>Virus sample</i></b>	<b><i>Length (nm)</i></b>	<b><i>Width (nm)</i></b>	<b><i>Height (nm)</i></b>
Control	122.33 ± 2.72	100.25 ± 2.63	20.75 ± 0.67
10 mM M $\beta$ CD	126.11 ± 9.04	101.56 ± 4.40	19.44 ± 1.41
25 mM M $\beta$ CD	95.22 ± 8.20	75.56 ± 7.28	18.89 ± 1.04

745

**DIFFERENTIAL REQUIREMENT OF CHOLESTEROL OVER DENGUE VIRUS  
INFECTION CYCLE**

Ivanildo P. Sousa Jr.<sup>1</sup>, Carlos A. M. Carvalho<sup>1</sup>, Ygara S. Mendes<sup>1</sup>, Nathalia S. Alves<sup>1</sup>,  
Thais Piazza<sup>1</sup>, Vivian N. S. Ferreira<sup>1</sup>, Mônica S. Freitas<sup>1</sup>, Georgia C. Atella<sup>1</sup>, Luciane P.  
Gaspar<sup>2</sup>, Marcos S. Freire<sup>2</sup>, Ricardo Galler<sup>2</sup>, Jerson L. Silva<sup>1</sup>, Andréa C. Oliveira<sup>1</sup>, and  
Andre M. O. Gomes<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>*Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil;* <sup>2</sup>*Instituto de Tecnologia em Imunobiológicos, Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.*

Keywords: Flavivirus, Dengue virus, Cholesterol, M $\beta$ CD

Running Title: Role of cholesterol in dengue virus infection

\*Corresponding author. Mailing address: Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro: Avenida Carlos Chagas Filho, 373 (CCS/E1-008), Cidade Universitária, Rio de Janeiro, RJ, 21941-902, Brazil. Phone: +55 21 2562-6756. Fax: +55 21 3881-4155. E-mail: amog@bioqmed.ufrj.br.

## ABSTRACT

Dengue virus is an enveloped virus presenting icosahedral symmetry that belongs to the *Flavivirus* genus and enters into host cells via receptor-mediated endocytosis followed by fusion between the virus envelope and the endosomal membrane. Certain lipid classes seem to contribute to the fusion event by their distinct chemical structure, composition and partitioning into specific microdomains at the plasma membrane. In this work, we evaluated the requirement of specific lipids to the fusion reaction of dengue virus serotype 2 (DENV-2) using a liposomal model loaded with ANTS/DPX. DENV-2 fused efficiently with receptor-free liposomes consisting of phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, cholesterol and sphingomyelin, suggesting that the interaction with a specific receptor is not required for fusion. However, the absence of cholesterol in this model blocked the fusion event, while the lack of sphingomyelin was indifferent to the process. The effect of cholesterol depletion from cell plasma membrane by methyl- $\beta$ -cyclodextrin on virus infection efficiency was investigated, and a requirement of this lipid to DENV-2 infection of mammalian cells was also observed. Additionally, cholesterol depletion from DENV-2 envelope impaired virus infectivity, suggesting that there also seems to be a call for this lipid in the donor membrane for an efficient virus entry into the host cell. As investigated through analysis of Laurdan fluorescence, cholesterol depletion from DENV-2 envelope led to an increase in the fluidity of this structure. Paradoxically, despite this cholesterol requirement in both the target and donor membranes for virus entry, DENV-2 infection seems to negatively modulate host cell cholesterol synthesis, as assessed through thin-layer chromatography. Our results suggest that DENV-2 shows a differential requirement of host cell cholesterol over its infection cycle.

## INTRODUCTION

Dengue virus (DENV) is a member of the *Flavivirus* genus, *Flaviviridae* family, and is an enveloped, positive-strand RNA virus. This genus comprises other viruses that can cause severe human illnesses, such as yellow fever virus (YFV), West Nile virus (WNV) and tick-borne encephalitis virus (TBEV). The epidemics caused by dengue virus has become a problem of global public health in the last few decades affecting more than 50 million people an year around the world, with children bearing much of disease burden (WHO, 1997; Gubler, 2002).

The early events of DENV entry involve clathrin-mediated endocytosis, fusion with the endosomal membrane and delivery of the RNA genome into the cytoplasm of the host cell. The membrane fusion event is triggered by low pH in the endosomal vesicles and leads to nucleocapsid delivery into the cytoplasm, where it disassembles releasing the genome (Acosta *et al.*, 2008; van der Schaar *et al.*, 2007). Interestingly, DENV presents a low efficiency of infection, where only 17% of the particles bound to cells have the capacity to fuse to membranes (van der Schaar *et al.*, 2007).

During flavivirus infection, the membrane structures and their lipid components around the endoplasmic reticulum (ER) seem to act as sites for virus replication (Westaway *et al.*, 2002). Cholesterol is an essential component of mammalian cell membranes. These cells obtain cholesterol by two mechanisms: by uptake of low-density lipoproteins (LDL) or by synthesizing it *de novo*. Recent evidences suggest that the infection by WNV induces the redistribution of cholesterol to viral replication membranes and an increase in the expression of a key cholesterol-synthesizing enzyme, the 3-hydroxy-methylglutaryl-CoA reductase (HMGCR) (Mackenzie *et al.*, 2007). Cholesterol seems to be also involved in the

fusion reaction, since it is required for the low-pH inducible fusion of WNV and TBEV with artificial target membranes (Gollins *et al.*, 1986; Stiasny *et al.*, 2005). Concerning the requirement of this lipid, Lee and coworkers demonstrated that several steps in flavivirus infection cycle could be inhibited by either removal or addition of cholesterol (Lee *et al.*, 2008). In this sense, cholesterol seems to be an important membrane component that may affect the rate and efficiency of the production of flaviviruses at multiple steps.

The main goals of the present study were to investigate the effect of cholesterol depletion from cellular plasma membrane on the efficiency of infection by dengue virus serotype 2 (DENV-2) and evaluate the synthesis of cholesterol in the infected cells. We also evaluated the role of cholesterol in the envelope of DENV-2 particles and its importance for virus infectivity. Our data show that while DENV-2 entry is dependent on the cholesterol content of both cellular and viral membranes, cholesterol molecules seem to be less important after virus entry since a decrease of their *de novo* biosynthesis is observed three days after infection. These data suggest that there are different requirements of cholesterol during DENV-2 infection cycle.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Cells and virus propagation/purification**

African green monkey kidney (Vero) cells were maintained and propagated as monolayers in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), supplemented with 10% fetal bovine serum (Cultilab, Campinas, SP, Brazil) and 3% tryptose phosphate (Difco, Detroit, MI, USA) and grown at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> incubator. Dengue virus serotype 2 (DENV-2, 44/2) was obtained from Fiocruz (Fundação Oswaldo Cruz) and propagated and purified as previously described by Kuhn and coworkers in 2002. Briefly, after propagation in Vero cells for 7 days at 37°C, the supernatant was collected and cleared of cellular debris at 8,000 rpm for 20 min at 4°C in a RPR 12-2 rotor. Once clarified, virus samples were added to PEG (40% of PEG in TNE buffer, pH 7.6, consisting of 0.1 M NaCl, 1 mM EDTA and 20 mM Tris). After standing for 3 h at 4°C, the solution was centrifuged at 10,700 g for 50 min at the same temperature. The precipitate was resuspended in TNE buffer, layered onto a density gradient of potassium tartrate and glycerol (10-40% potassium tartrate and 7.5-30% glycerol) and centrifuged at 130,000 g for 2 hours at 4°C. The concentration of viral proteins was determined as described by Lowry and coworkers in 1951.

### **ANTS/DPX leakage assay**

Virus-induced leakage of vesicle aqueous content was measured by using the ANTS/DPX assay as previously described (Maia *et al.*, 2006). Briefly, large unilamellar

vesicles (LUVs) were prepared by extrusion method in 10 mM sodium phosphate, 100 mM NaCl (pH 7.0). LUVs containing 12.5 mM ANTS, 45 mM DPX, 100 mM NaCl, and 10 mM sodium phosphate were obtained by separating the unencapsulated material by gel filtration chromatography in a SynChropak GPC300 column (Micra Scientific Inc., Lafayette, IN) eluted with 10 mM sodium phosphate, 100 mM NaCl (pH 7.0). Fluorescence measurements were performed by setting the ANTS emission at 523 nm and the excitation at 353 nm using a 500 nm cutoff filter in the emission pathway. The samples were acidified by the addition of 40  $\mu$ L of 0.1 M MES, 0.2 M acetic acid pre-titrated to achieve a final pH of 5.5 in a final volume of 0.7 mL. The absence of leakage (0%) corresponds to the fluorescence of the vesicles at time 0; 100% of leakage was taken as the fluorescence value obtained after addition of 1% (v/v) Triton X-100 detergent. The degree of permeabilization was then inferred from the following equation:

$$\% \text{ Leakage} = [(F - F_0) / (F_T - F_0)] \times 100,$$

where  $F$  is the fluorescence intensity after the addition of virus,  $F_0$  is the initial fluorescence of the intact LUV suspension and  $F_T$  is the fluorescence after the addition of Triton X-100.

### **Cholesterol depletion**

Methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M $\beta$ CD) was purchased from Sigma. Cholesterol depletion from cellular plasma membrane was performed by incubating cell monolayers with the indicated concentrations of M $\beta$ CD for 30 min at 37°C. After incubation, cyclodextrin was removed by extensive washes with PBS. Cholesterol depletion from virus envelope was performed by incubating the virus particles with the indicated concentration of M $\beta$ CD

under the same conditions as for the cells. After incubation, cyclodextrin was removed by centrifugation on a 100,000 MWCO Microcon filter (Millipore, Billerica, MA, USA).

### **Cholesterol content measurement**

The cholesterol content was measured using an Amplex Red cholesterol assay kit (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) according to the manufacturer's instructions. Briefly, cells were dissociated from monolayer and subjected to centrifugation. Cell pellet ( $10^6$  cells) was suspended in 50  $\mu$ L of reaction buffer (0.1 M potassium phosphate – pH 7.4, 50 mM NaCl, 5 mM cholic acid and 0.1% Triton X-100) and the reaction was then triggered by adding 50  $\mu$ L of Amplex Red reagent. For the measurement of virus envelope cholesterol content, virus (100  $\mu$ g/mL) was concentrated by centrifugation on a 100,000 MWCO Microcon filter and resuspended in Amplex Red reaction buffer. Samples were analyzed on a SpectraMax M5 plate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) operated in fluorescence mode, using an excitation wavelength of 544 nm and an emission wavelength of 590 nm.

### **Cell viability assay**

M $\beta$ CD cytotoxicity was evaluated through MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) reduction assay. Briefly, cell monolayers on multiwell plates were incubated with different concentrations of M $\beta$ CD at 37°C for 30 min, and MTT was subsequently added to culture media at a final concentration of ~250  $\mu$ g/mL. After incubation at 37°C for 4 h, a lysis solution (50% DMF and 20% SDS, pH 4.8) was added to

the wells for solubilizing the generated formazan crystals, and cell viability was determined analyzing absorbance at 570 nm.

### **Infectivity assay**

Virus titer was determined by plaque assay in Vero cells. Briefly, confluent monolayers of Vero cells on multiwell plates were infected with serial dilutions of DENV-2 and incubated for 60 min at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> incubator. After the incubation, non-adsorbed virus was removed, and a semisolid medium (1.6% carboxymethylcellulose in DMEM) was added. Plates were left at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere for 7 days. After the aspiration of semisolid medium, the cells were stained with 1% crystal violet and plaques were counted. Analysis of infection inhibition by cell membrane cholesterol depletion were carried out in a similar way to virus titer determination, but instead of serial dilutions of virus, Vero cells on multiwell plates were incubated with 10 mM M $\beta$ CD and then infected with DENV-2 at the same multiplicity of infection (MOI).

### **Extraction and amplification of viral RNA**

Vero cells were incubated with 10 mM M $\beta$ CD for 30 min at 37°C. After incubation, cyclodextrin was removed by extensive washing with PBS. After viral adsorption during 1 h, cells were washed three times with PBS to remove unbound virus and incubated at 37°C. The total RNA was extracted after 3 days p.i. using TRIzol reagent (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA). After treatment with DNase I (Invitrogen Co.), the first lane of cDNA was synthesized with indicators sense and anti-sense for GAPDH and DENV RNAs

using a SuperScript II<sup>®</sup> reverse transcriptase as suggested by manufacturer's instructions (SuperScriptII<sup>®</sup> kit First-Strand Synthesis System, Invitrogen Co.). The cDNA was subsequently PCR amplified by 5'-TCAATATGCTGAAACGCGCGAGAAACCG-3', TS2 5'-CGCCACAAGGGCCATGAACAG-3'. GAPDH (5'-CATCCTGCACCACCAACTGCTTAG-3' and 5'-GCCTGCTTCACCACCTTCTTGATG-3') was used as control. The PCR products were analyzed by 2% agarose gel electrophoresis and visualized with ethidium bromide staining. The RT-PCR was performed using the same first lane as described and the cycles were realized in a thermocyclator 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The relative amount of DENV RNA was calculated using GAPDH as normalizer.

### **Analysis of lipid packing in virus envelope**

The level of lipid packing in DENV-2 envelope was inferred by means of Laurdan (2-dimethylamino-6-lauroyl-naphthalene) (Molecular Probes) fluorescence. Viral samples were incubated with 20  $\mu$ M Laurdan for 30 min at 4°C and analyzed on a spectrofluorometer PC1 (ISS, Champaign, IL, USA). The samples were excited at 360 nm and the fluorescence emission was scanned from 380 nm to 600 nm. The assay was carried out at 37°C, under constant stirring.

## **Quantification of cell cholesterol synthesis**

To determine the effect of DENV-2 infection on cell cholesterol synthesis, Vero cell monolayers were infected with DENV-2 at a MOI of 1 and immediately incubated with 200  $\mu\text{Ci}$  of [ $^3\text{H}$ ]acetate (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). At the third day p.i., cells were dissociated from monolayers, pelleted and subjected to lipid extraction by the method described by Bligh and Dyer in 1959 for 2 h in a stoppered tube using 5 mL of chloroform:methanol:water (2:1:0.8, v/v) with intermittent agitation. The mixture was centrifuged at 1,500 g for 30 min at 4°C and the supernatant was collected and the precipitated subjected to a second lipid extraction for 1h. To the supernatants extracted, 5 mL of water and 5 mL of chloroform were added, the mixture was shaken and, after the centrifugation, the organic phase was removed and dried under  $\text{N}_2$  stream. The amount of total lipids was determined gravimetrically. Extracted lipids were analyzed by thin-layer chromatography (TLC) as described for neutral lipids (Vogel *et al.*, 1962). After staining the plate with iodine vapor, lipids were identified and radioactivity in each fraction was determined by scintillation counting. The revelation of radioactive bands was performed through phosphorimaging on a Storm 860 Molecular Imager (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK).

## RESULTS

As a first analysis of the lipid requirements for the fusion reaction of DENV-2, we carried out a leakage assay with ANTS/DPX co-encapsulated into receptor-free liposomes. This assay is based on the collisional quenching of the polyanionic fluorophore ANTS by the cationic quencher DPX. Upon dilution into surrounding medium, ANTS fluorescence will increase because quenching by DPX will be diminished. The fluorescent dye leakage assay is a well-established method for the study of pore formation in membranes (Nicol *et al.*, 2000; Yeagle, 1994). Fig. 1 shows the fusion extension of DENV-2 with liposomes of different compositions, inferred from the changes in the fluorescence intensity due to the leakage of ANTS/DPX from these vesicles, induced by virus interaction at low pH through pore formation. The effects were highly dependent on the lipid composition of the target membrane. A greater extension of fusion was observed in liposomes composed of PC/PE/SPM/Chol (1:1:1:1.5) when compared to vesicles containing a lower concentration of cholesterol (Fig. 1). Interestingly, a higher cholesterol concentration did not increase too much the leakage of the probes from within the vesicles. Furthermore, the absence of sphingomyelin was indifferent to the process.

Given the observed cholesterol requirement for fusion with artificial membranes, we next assayed for the importance of cholesterol present in the cellular plasma membrane for DENV-2 infection. To achieve this aim, we incubated Vero cells with methyl- $\beta$ -cyclodextrin (M $\beta$ CD), an extensively used cholesterol-sequestering drug, to deplete cholesterol. As assessed by MTT assay, cell viability was not severely compromised with concentrations of M $\beta$ CD up to 20 mM (Figure 2A). However, it was observed that the cells

trended to dissociate from the monolayer when using M $\beta$ CD concentrations from 15 mM up. Based on this observation, the concentrations of 5 and 10 mM M $\beta$ CD were tested for their efficiencies to deplete cholesterol. Treatment of Vero cells with 5 mM M $\beta$ CD promoted a depletion of ~15% of the original cholesterol content, while treatment with 10 mM M $\beta$ CD reduced the cellular cholesterol content in ~55% (Figure 2B). Thus, the concentration of 10 mM M $\beta$ CD was chosen for the performance of the following experiments.

In order to evaluate the importance of cholesterol for DENV-2 infection, we depleted cholesterol from Vero cells with 10 mM M $\beta$ CD and then subjected them to virus infection. As shown in Fig. 3, cellular cholesterol depletion prior to infection led to a reduction of ~35% in the efficiency of DENV-2 infection.

To further verify whether cholesterol depletion could affect the viral RNA content inside the cells, intracellular viral RNA was harvested and analyzed by real time RT-PCR after 3 days of infection. As represented in Figs. 4A and 4B, there was a significant reduction of ~95% in the viral RNA content in cells infected after the treatment with 10 mM M $\beta$ CD. Given the results shown in Fig. 1, this lower viral RNA content in cells treated with M $\beta$ CD prior to infection was due to an impairment in viral genome delivery rather than to a commitment of viral genome replication.

Since our results showed an importance of cellular cholesterol for DENV-2 infection, we wondered about a role of cholesterol molecules present in viral envelope. As a first measure, we analyzed the efficiency of cholesterol depletion from this membrane by M $\beta$ CD. Treatment of DENV-2 with 10 mM M $\beta$ CD led to a markedly drop of ~85% in the level of viral cholesterol (Fig. 5A). Then, we assayed for the effect of cholesterol depletion

from viral envelope on viral infectivity. Incubation of DENV-2 with 10 mM M $\beta$ CD resulted in a drop of  $\sim$ 3 logs in the virus titer, as measured by plaque assays (Fig. 5B). It is worthwhile to highlight that to prevent the effects of M $\beta$ CD on cellular membranes, virions were subjected to centrifugation on a Microcon filter to remove the cyclodextrin before adding them to cells. This procedure did not affect virus titer (data not shown). These data suggest that cholesterol molecules present in DENV-2 envelope also play a role in infection of host cells.

Since cholesterol is known to be involved in the modulation of the fluidity of biological membranes, we next evaluated the effect of cholesterol depletion from the viral envelope on its fluidity. To achieve this, DENV-2 was treated with 10 mM M $\beta$ CD and the degree of fluidity of its lipid envelope was assessed using Laurdan. Laurdan is a fluorescent probe that detects changes in membrane phase properties through its sensitivity to the polarity of its environment in a lipid bilayer. Variations in membrane water content cause shifts in the Laurdan emission spectrum, which is, for instance, blue-shifted with increasing membrane condensation as a consequence of exclusion of water molecules from the lipid bilayer (Harris *et al.*, 2002). Indeed, the drop in the cholesterol content of the viral envelope after treatment with M $\beta$ CD led this membrane to a more disordered state, as shown by the red-shift of the Laurdan emission spectrum (Fig. 6). This result indicates that cholesterol molecules are related to the maintenance of a certain degree of organization in DENV-2 envelope.

Given the observed cholesterol requirement for infection by DENV-2, we next aimed to investigate whether DENV-2 infection affects cellular cholesterol homeostasis. In this sense, Vero cells were cultured in medium containing a radioactive cholesterol precursor, [ $^3$ H]acetate, immediately after infection. Total lipids were extracted from the

cells and the newly synthesized cholesterol was analyzed by TLC. Surprisingly, after 3 days of infection, Vero cells presented a decrease in the *de novo* synthesis of cholesterol, as shown in Fig. 7. This finding suggests that DENV-2 infection seems to negatively modulate the *de novo* synthesis of cholesterol molecules in Vero cells.

## DISCUSSION

In this study, we evaluated the role of cholesterol during DENV-2 infection in Vero cells. Taken together, our results suggest a differential requirement of cholesterol during dengue virus-host membranes interaction. The ANTS/DPX leakage assay suggests the need for this lipid in the process of membrane fusion (Fig. 1). Nevertheless, it was shown recently that cholesterol seems to be not necessary to the process of internalization (Umashankar *et al.*, 2008).

In spite of the structural similarity between the fusion proteins of flaviviruses and alphaviruses, and sharing the same mechanism of activation and organization of the icosahedral capsid, the dependence on sphingomyelin to the fusion process, characteristic to alphaviruses, seems to be not shared by flaviviruses (Fig. 1). Experiments with TBEV also showed the independence of sphingomyelin for this event (Stiasny *et al.*, 2003). Thus, even showing a great structural homology, the distinct fusion proteins differ in the usage of sphingomyelin for this process and the role played by this lipid in the fusion of alphaviruses seems not be necessary for flaviviruses.

As previously shown for other viruses, the cholesterol present in DENV-2 envelope also plays an important role in maintaining viral infectivity. Interestingly, the process of budding of DENV occurs into the endoplasmic reticulum (Mackenzie *et al.*, 2001), whose lipid composition differs from plasma membrane. The cholesterol/phospholipids ratio in the membrane of the endoplasmic reticulum is approximately 0.15, while in the plasma membrane it is close to 1 (Van Meer *et al.*, 2008). Thus, it is curious how a lipid molecule supposed to be present in a relative low concentration in DENV envelope could play a role in viral infectivity (Fig. 5B) and envelope fluidity (Fig. 6). However, it was shown recently

that WNV infection is able to promote the redistribution of cholesterol molecules to the perinuclear region of the cell, where the endoplasmic reticulum is placed and the replication and assembly of viral particles occur (Mackenzie *et al.*, 2007). Thus, this low local content of cholesterol in normal cells could be increased in flavivirus-infected cells, then suggesting a high loading of this lipid in the viral envelope during the budding process.

Although we observed that the content of viral RNA inside cells infected for 3 days that were subjected to cholesterol depletion immediately prior to infection was reduced by 95% (Figs. 4A and 4B), we cannot state that this represents a requirement of cellular cholesterol for viral RNA replication, given the relative fast turnover of cholesterol molecules. In conjunction with the data shown in Fig. 1, it is more likely that the amount of viral particles that undergone fusion is lower in these cells than that in untreated cells.

Surprisingly, despite the observed importance of cholesterol for the early events of infection, DENV-2 infection induces a decrease in the *de novo* synthesis of cholesterol in late stages of infection (Fig. 7). Paradoxically, a previous work shows that an important enzyme of the mevalonate pathway, 3-hydroxy-methylglutaryl-CoA reductase (HMGCR), has its expression increased in cells infected with WNV (Mackenzie *et al.*, 2007). However, as in the referred work the cholesterol content in the infected cells was not assessed, this augmented expression can be due to a negative feedback mechanism.

One of the proteins that are overexpressed during DENV infection is called viperin (virus inhibitory protein, endoplasmatic reticulum-associated, interferon-inducible) (Fink *et al.*, 2007). The referred authors showed that this protein has an activity against DENV by preventing their replication. However, they failed to demonstrate how viperin inhibit virus replication. Another study showed that this protein was able to inhibit the budding of influenza virus by disruption of membrane microdomains, by reducing the activity of FPPS

(farnesyl diphosphate synthase), with a consequent increase in membrane fluidity (Wang *et al.*, 2007). This enzyme takes part in the mevalonate pathway converting geranyl-PP to farnesyl-PP. The formed farnesyl diphosphate is a precursor of several essential metabolites, including dolichol, heme A, ubiquinone, carotenoids, prenylated proteins and sterols, among them cholesterol (Bellés *et al.*, 2005). In fact, we cannot exclude the possibility that during DENV infection occurs a cellular counteract to inhibit the infection, through expression the viperin. Thus, in cells infected with DENV-2 there is a decrease in the *de novo* synthesis of cholesterol probably due to the inhibitory effect of viperin on FPPS, reducing the amount of farnesyl diphosphate for the synthesis of cholesterol. Indeed, initial experiments show that there is a reduction in the lipid packing degree of the membrane of cells infected by DENV-2 (unpublished data).

Overall, the results presented here show the importance of cholesterol for an efficient infection by DENV-2. These observations have fundamental importance in understanding the virus-cell interactions with potential therapeutic implications. The flaviviruses exploit the machinery involved in the regulation of cellular cholesterol content to their advantage. Compounds that are able to attenuate the effects of cholesterologenic enzymes can provide an interesting antiviral tool against these viruses.

## References

Acosta, E.G., Castilla, V. & Damonte, E.B. Functional entry of dengue virus into the *Aedes albopictus* mosquito cells is dependent on clathrin-mediated endocytosis. *Journal of General Virology*, **89**, 474-84. 2008.

Bellés, X., Martín, D. & Piulachs, M.D. The mevalonate pathway and synthesis of juvenile hormone in insects. *Annu. Rev. Entomol.*, **50**, 181-199. 2005.

Bligh, E.G. & Dyer, W.J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol.*, **37**, 911-917. 1959.

Fink, J., Gu, F., Ling, L., Tolfvenstam, T., Olfat, F., Chin, K.C., Aw, P., George, J., Kuznetsov, V.A., Schreiber, M., Vasudevan, S.G. & Hibberd, M.L. Host Gene Expression Profiling of Dengue Virus Infection in Cell Lines and Patients. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **1(2)**, e-86. 2007.

Gaus, K., Zech, T. & Harder, T. Visualizing membrane microdomains by Laurdan 2-photon microscopy. *Molecular Membrane Biology*, **23**, 41-48. 2006.

Gollins, S.W. & Porterfield, J.S. pH-dependent fusion between the flavivirus West Nile and liposomal model membranes. *J. Gen. Virol.*, **67**, 157-166. 1986.

Gubler, D. J. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends Microbiol.*, **10**, 100–103. 2002.

Harris, F.M., Best, K.B. & Bell, J.D. Use the Laurdan fluorescence intensity and polarization to distinguish between changes in membrane fluidity and phospholipid order. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1565**, 123-128. 2002.

Hernandez, R., Luo, T. & Brown, D.T. Exposure to low pH is not required for penetration of mosquito cells by Sindbis virus. *Journal of Virology*, **75**, 2010-2013. 2001.

Kuhn, R.J., Zhang, W., Rossmann, M.G., Pletnev, S.V., Corver, J., Lenches, E., Jones, C.T., Mukhopadhyay, S., Chipman, P.R., Strauss, E.G., Baker, T.S. & Strauss, J.H. Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell*, **108**, 717–725. 2002.

Lee, C.J., Lin, H.R., Liao, C.L. & Lin, Y.L. Cholesterol effectively blocks entry of flavivirus infection. *Journal Virology*, **82(13)**, 6470-80. 2008.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.Y., Farr, A.L. & Randall, R.J. Protein measurements with the Folin Phenol Reagent. *Journal of Biological Chemistry*, **193**, 265-275. 1951.

Maia, L.F., Soares, M.R., Valente, A.P., Almeida, F.C.L., Oliveira, A.C., Gomes, A.M.O., Freitas, M.S., Schneemann, A., Johnson, J.E. & Silva, J.L. Structure of a Membrane-binding Domain from a Non-enveloped Animal Virus: INSIGHTS INTO THE

MECHANISM OF MEMBRANE PERMEABILITY AND CELLULAR ENTRY. *Journal of Biological Chemistry*, **281**, 29278-29286. 2006.

Mackenzie, J.M., Khromykh, A.A. & Parton, R.G. Cholesterol manipulation by West Nile Virus perturbs the cellular immune response. *Cell Host & Microbe*, **2**, 229-239. 2007.

Nicol, F., Nir, S. & Szoka, F. C., Jr. Effect of phospholipid composition on an amphipathic peptide-mediated pore formation in bilayer vesicles *Biophys. J.*, **78**, 818–829. 2000.

Stiasny, K., Koessl, C. & Heinz, F.X. Involvement of lipids in different steps of the flavivirus fusion mechanism. *Journal of Virology*, **77**, 7856–7862. 2003.

Umashankar, M., Martín, C.S., Liao, M., Reilly, B., Guo, A., Taylor, G. & Kielian, M., Differential cholesterol binding by class II fusion proteins determines membrane fusion properties. *Journal of Virology*, **82**, 9245-9253. 2008.

Vogel, C.W., Doizaki, W.M. & Zieve, L. Rapid thin-layer chromatographic separation of phospholipids and neutral lipids of serum. *J. Lipid. Res.*, **3**, 138-140. 1962.

van der Schaar, H.M., Rust, M.J., Waarts, B.L., van der Ende-Metselaar, H., Kuhn, R.J., Wilschut, J., Zhuang, X. & Smit, J.M. Characterization of the early events in dengue virus entry by biochemical assays and single-virus tracking. *Journal of Virology*, **81**, 12019-28. 2007.

Van Meer, G., Voelker, D.R. & Feigenson, G.W. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat. Mol. Cell Biol.*, **9**, 112-124. 2008.

Wang, X., Hinson, E.R. & Cresswell, P. The interferon-inducible protein viperin inhibits influenza virus release by perturbing lipid rafts. *Cell Host Microbe*, **16**, 96-105. 2007.

Westaway, E.G., Mackenzie, J.M. & Khromykh, A.A. Replication and gene function in Kunjin virus. *Curr. Trop. Microbiol. Immunol.*, **267**, 323-351. 2002.

WHO. Dengue hemorrhagic fever: diagnosis, treatment prevention and control. *WHO, Geneva*, 1997.

Yeagle, P.L., Smith, F.T., Young, J.E. & Flanagan, T.D. Inhibition of membrane fusion by lysophosphatidylcholine. *Biochemistry*, **33**, 1820-7. 1994.

## FIGURE LEGENDS

### **Fig. 1. Evaluation of lipid requirements for the interaction of DENV-2 with liposomes.**

Fusion of DENV-2 to liposomes was monitored by means of its property of promoting pore formation on the target membrane, using vesicles loaded with the pair ANTS/DPX. The arrows indicate moment of addition of a pre-titrated volume of 0.1 M MES, 0.2 M acetic acid to achieve a final pH 5.5. The pore formation upon fusion to vesicle was assessed by monitoring fluorescence emission at 523 nm, with excitation at 353 nm. Leakage measurements were performed at 37°C. The virus concentration was 100 µg/mL.

### **Fig. 2. Effect of MβCD treatment on Vero cell viability and cholesterol content. (A)**

Vero cells were incubated with different concentrations of MβCD at 37°C for 30 min and subjected to analysis of viability by the MTT reduction assay. (B) Monolayers of Vero cells were incubated with 5 or 10 mM MβCD at 37°C for 30 min or were incubated with DMEM (Control). The cells were then collected, precipitated and subjected to determination of cholesterol content. The amount of cells used was 10<sup>6</sup>.

### **Fig. 3. Effect of cellular cholesterol depletion on the efficiency of DENV-2 infection.**

Monolayers of Vero cells were treated with 10 mM MβCD at 37°C for 30 min or treated with DMEM alone as control. After treatment, the cyclodextrin was removed by successive washes with PBS. The cells were then infected with DENV-2 at the same MOI and stained with 1% crystal violet solution 7 days after infection. Mock: non-infected cells.

**Fig. 4. Effect of cellular cholesterol depletion prior to DENV-2 infection on the content of viral RNA inside the cells.** Vero cells were treated with 10 mM M $\beta$ CD at 37°C for 30 minutes, washed to remove the cyclodextrin and then incubated with DENV-2 (MOI = 1) for 1 h. After 3 days of infection, the total RNA was isolated and analyzed by RT-PCR for the RNA of DENV and GAPDH as described in "Material and Methods." (A) Separation of the RT-PCR products by a 2% agarose gel electrophoresis visualized with ethidium bromide staining. (B) The relative amount of DENV RNA was calculated using GAPDH as normalizer.

**Fig. 5. Effect of M $\beta$ CD treatment on DENV-2 cholesterol content and infectivity.** DENV-2 isolated from Vero cells was treated with 10 mM M $\beta$ CD for 30 min at 37°C or mock-treated with PBS as control, subjected to centrifugation on a Microcon filter to remove the cyclodextrin and analyzed using a cholesterol assay kit (A). The effect of cholesterol depletion on viral titer was determined by plaque assays in Vero cells and expressed as plaque-forming units per volume unit (B).

**Fig. 6. Effect of cholesterol depletion from DENV-2 envelope on its fluidity.** The isolated virus particles were treated with 10 mM M $\beta$ CD for 30 min at 37°C (filled line) or mock-treated with PBS as control (dashed line), subjected to cyclodextrin removal as described and incubated with 20  $\mu$ M Laurdan for 30 min. The samples were then analyzed for its fluorescence exciting them at 360 nm and scanning emission from 380 to 600 nm. The experiment was performed at 37°C, and the viral concentration used was 100  $\mu$ g/mL.

**Fig. 7. Influence of DENV-2 infection on host cell cholesterol synthesis.** Vero cells were incubated with culture medium containing [<sup>3</sup>H]acetate immediately after infection with DENV-2 and subjected to lipid extraction 3 days p.i. The lipid extract was then subjected to thin-layer chromatography (TLC) for neutral lipids and the revelation of radioactive bands was performed through phosphorimaging (A). The radioactivity in each band was determined by scintillation counting (B). Mock: non-infected cells.

Figure 1

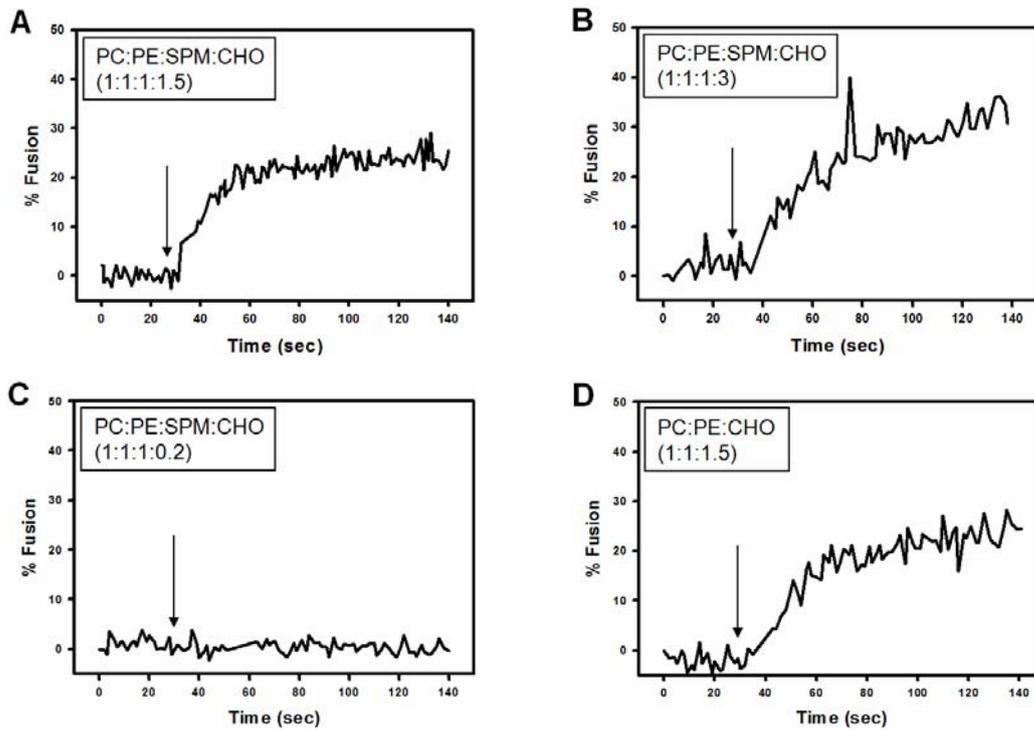


Figure 2

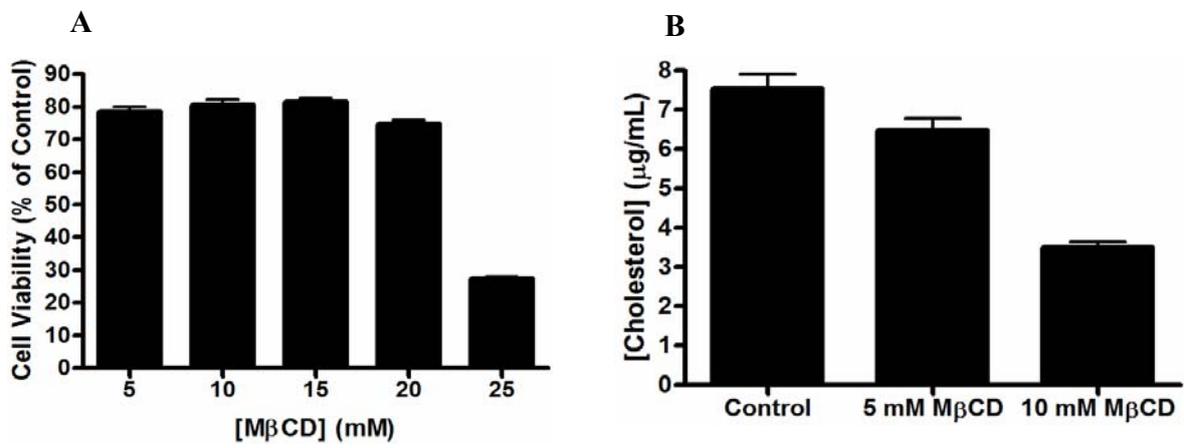


Figure 3

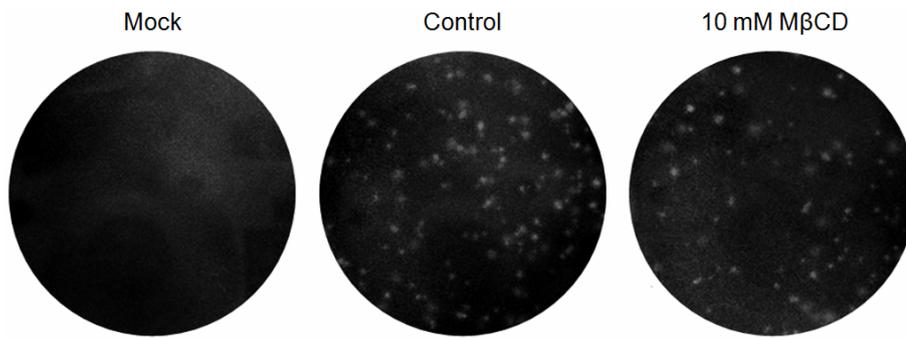


Figure 4

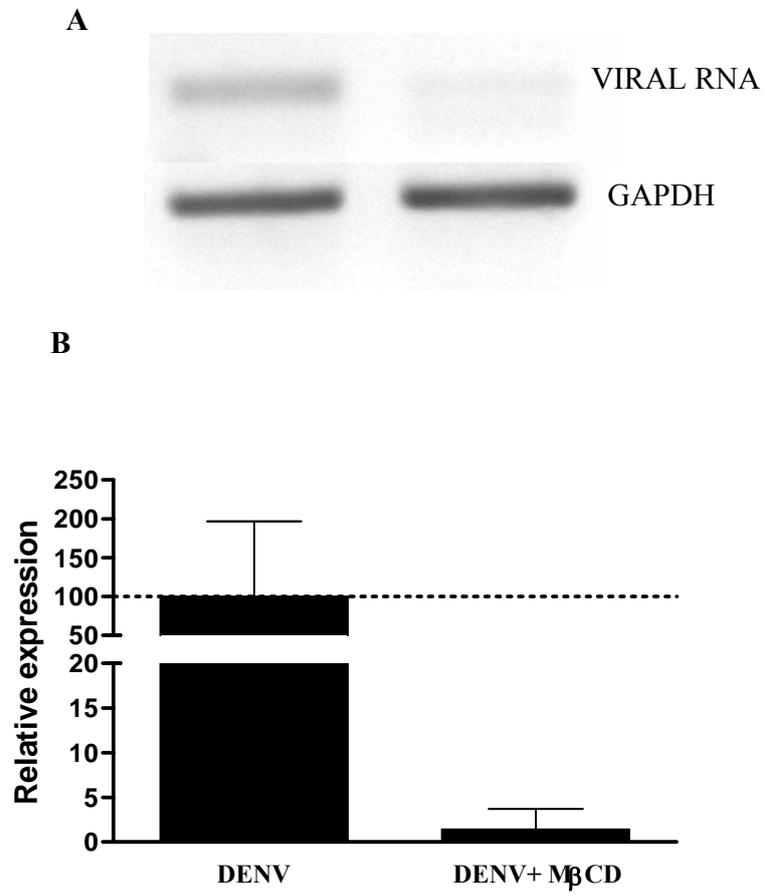


Figure 5

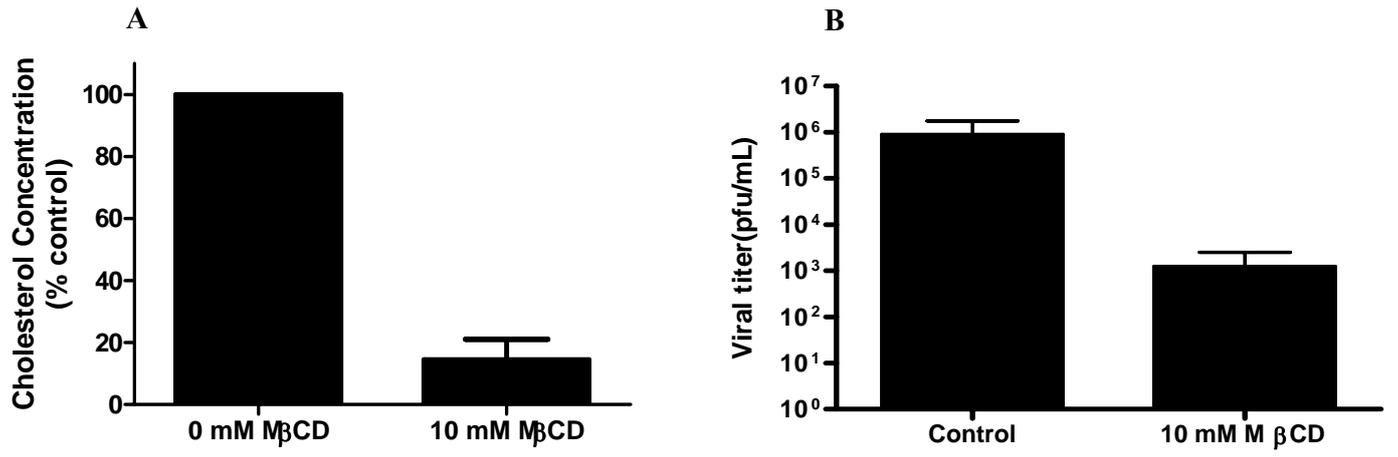


Figure 6

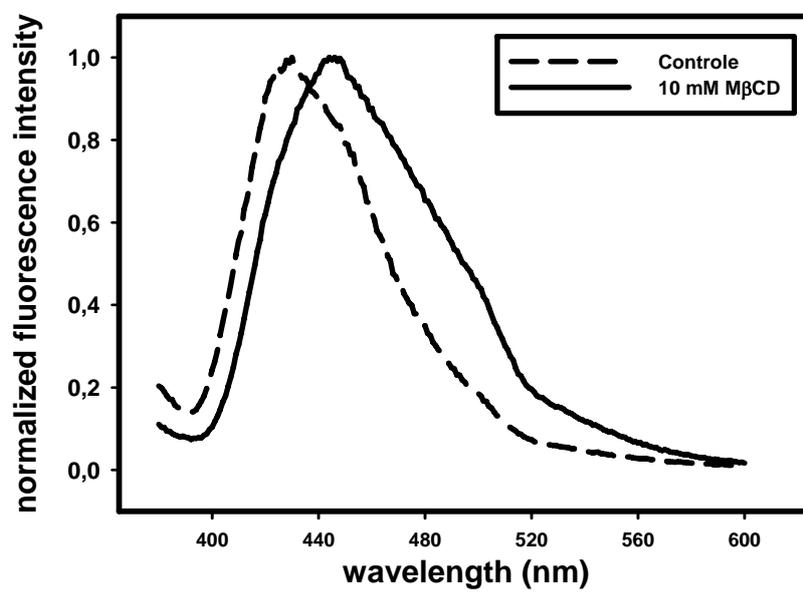
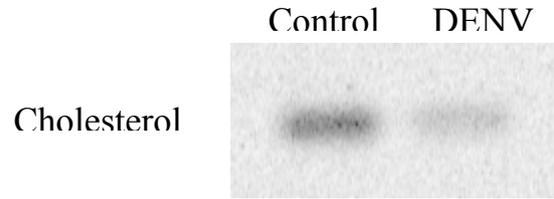


Figure 7



# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)