

---

LUCIANA GARCIA ANDRADE

*Tese de Doutorado*

O ENVOLVIMENTO DA PROTEÍNA CINASE PAK1 NA INFECÇÃO  
PELO ORTHOPOXVIRUS VACCINIA  
- IMPLICAÇÕES PARA A DISSEMINAÇÃO VIRAL -

GRUPO DE TRANSDUÇÃO DE SINAL  
LABORATÓRIO DE VÍRUS  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

BELO HORIZONTE, MARÇO DE 2012

---

---

LUCIANA GARCIA ANDRADE

O ENVOLVIMENTO DA PROTEÍNA CINASE PAK1 NA INFECÇÃO  
PELO *ORTHOPOXVIRUS VACCINIA*  
- IMPLICAÇÕES PARA A DISSEMINAÇÃO VIRAL -

Tese apresentada no Programa de Pós-graduação  
em Microbiologia do Instituto de Ciências  
Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais,  
como requisito parcial para a obtenção do grau de  
Doutor em Microbiologia.

ORIENTADOR: DR. CLÁUDIO ANTÔNIO BONJARDIM

BELO HORIZONTE, MARÇO DE 2012

---

“NÃO DEIXE QUE A SAUDADE SUFOQUE,  
QUE A ROTINA ACOMODE,  
QUE O MEDO IMPEÇA DE TENTAR.  
DESCONFIE DO DESTINO E  
ACREDITE EM VOCÊ...”

## **AGRADECIMENTOS**

*Eis o final de mais uma etapa! E desta vez, de uma grande etapa... o final do doutorado e o final da minha vida acadêmica como estudante... uma década inteira. Gostaria de agradecer aqui a todos que nesses 10 anos fizeram a diferença na minha vida, mas isso iria gastar mais páginas do que as usadas para tese em si. Vou ter que me restringir, mas quero deixar registrado o meu humilde e sincero agradecimento a cada um que, não só durante essa etapa, mas também ao longo de toda minha vida, contribuiu para que eu chegasse até aqui e me tornasse a pessoa que sou hoje. MUITO OBRIGADA!*

Ao meu orientador, Prof. Cláudio Antônio Bonjardim, por ter me ensinado a dar os primeiros passos no mundo da pesquisa científica. Obrigada pela oportunidade e pela confiança, pela experiência compartilhada e pelo apoio desde meu ingresso no Laboratório de Vírus.

À Prof<sup>a</sup>. Erna Geessien Kroon pela forma com a qual comanda o laboratório de vírus, exemplo de dedicação, sempre trabalhando incansavelmente para torná-lo um ambiente de trabalho cada vez melhor.

Ao Prof. Paulo César Peregrino Ferreira, à Prof<sup>a</sup> Giliane Trindade e ao Prof, Jônatas Abrahão, pelo agradável convívio, pelas dicas, sugestões e pelo apoio carinhoso de sempre. E PP, ainda não esqueci a valiosa ajuda no processo de recuperação das minhas células, lá no meu mestrado... sem elas esse trabalho não existiria!

À Prof<sup>a</sup>. Marisa Bianco Bonjardim, pelo apoio desde o início, lá no meu bacharelado em genética, até hoje. Muito Obrigada por tudo!

À Jaque Germano, pela praticidade e objetividade em resolver todo e qualquer problema, sempre disposta a contribuir de alguma forma. Muito Obrigada pela ajuda sempre que precisei, pelas sugestões e pelos conselhos.

Aos GTSs antigos, com os quais aprendi a ser uma GTS, meu eterno carinho e gratidão: Patty, Landa, Jamas, Lina, Breno, Flavinha e Bruninho.

Aos GTSs atuais, que vieram depois de mim, e com os quais também aprendi muito, obrigada pelo convívio e apoio carinhoso de sempre: Alice, Léo, Jonas e André.

Às ICs que passaram pelas minhas mãos nesses anos todos e foram de fundamental ajuda sempre. Não posso deixar de citar, especialmente, a Débora, minha pupila eterna, por quem eu tenho até hoje um imenso carinho; e a Fer, IC, amiga e companheira durante todo doutorado. Muito Obrigada!

À todos os amigos do Laboratório de Vírus, pela convivência agradável e alegre durante todo esse tempo e pela ajuda sempre que precisei... não vou citar nomes, pois certamente esquecerei de alguém e não quero ser injusta. Muito obrigada a todos os labvirianos atuais ou que estiveram por lá durante algum período dos últimos 7 anos.

À Ana P., pessoa ímpar, uma grande e querida amiga! Muito Obrigada pela amizade, pelos abraços e sorrisos diários e pelo apoio, sempre!

À Tia Ângela e ao João Rodrigues, peças raras do Laboratório de Vírus. Pessoas impossíveis de esquecer! Muito Obrigada!

Às meninas da cozinha: Ildinha, Andreza, Rose, e outras tantas que passaram por lá, sem as quais nosso trabalho seria muito mais difícil.

Aos funcionários da pós-graduação em Microbiologia, representados aqui pelo Douglas e pela Fatinha. Obrigada pela prestabilidade em todos os momentos.

À todos os professores pelos quais passei nesses 10 anos de UFMG, valorizo e agradeço as sementinhas plantadas por cada um de vocês.

Aos amigos e colegas de graduação e pós-graduação, obrigada pelo convívio e trocas enriquecedoras de experiência e conhecimento.

Às minhas queridas amigas Dri e Marina e ao meu querido amigo Celso, obrigada por me deixar compartilhar com vocês minhas angustias, aflições, medos, dúvidas, e também

minhas alegrias e realizações. Obrigada por toda a ajuda sempre que precisei e por fazerem parte da minha vida!

À minha família, obrigada pelo apoio e pelo carinho!!!

À Passo Básico, que colocou muita dança na minha vida nos últimos 3 anos... minha válvula de escape, responsável por recarregar minhas energias e fazer tudo parecer mais leve e mais suave.

Ao Francismar, que há um ano vem colorindo a minha vida com cores novas e de um jeito todo especial. Amo você demais da conta! Muito Obrigada!

Ao meu pai, por quem eu cheguei até aqui. Meu exemplo de empenho e integridade. Hoje, sem você, eu nada seria. Te Amo! OBRIGADA POR TUDO!!

À minha mãe querida, meu anjo da guarda, que ilumina e zela meus passos, como sempre fez. Te amo! SAUDADES...

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>X</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>XII</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>XIII</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>XV</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>XVI</b>
<b>I. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>1. OS POXVÍRUS .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 - HISTÓRICO .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2 - A FAMÍLIA Poxviridae .....</b>	<b>2</b>
<b>1.3 - CARACTERÍSTICAS GERAIS .....</b>	<b>5</b>
<b>1.3.1 - Morfologia.....</b>	<b>5</b>
<b>1.3.2 - Genoma .....</b>	<b>8</b>
<b>1.4 - CICLO DE MULTIPLICAÇÃO VIRAL .....</b>	<b>8</b>
<b>1.4.1 - Adsorção, Penetração e Desnudamento Primário.....</b>	<b>11</b>
<b>1.4.2 - Expressão Gênica e Replicação do DNA viral.....</b>	<b>12</b>
<b>1.4.3 - Morfogênese e Liberação da Progenie Viral.....</b>	<b>13</b>
<b>2. INTERAÇÃO POXVÍRUS-HOSPEDEIRO .....</b>	<b>15</b>
<b>2.1 - SINALIZAÇÃO CELULAR .....</b>	<b>15</b>
<b>2.2 - MODULAÇÃO DO CITOESQUELETO CELULAR.....</b>	<b>19</b>
<b>3. PAK1 (p21-ACTIVATED KINASE 1).....</b>	<b>22</b>
<b>3.1 - ESTRUTURA, REGULAÇÃO E MECANISMOS DE ATIVAÇÃO DE PAK1.....</b>	<b>24</b>
<b>3.2 - BIOLOGIA DE PAK1.....</b>	<b>26</b>
<b>3.2.1 - Regulação do Citoesqueleto.....</b>	<b>26</b>

3.2.2 - <i>Transdução de Sinais Relacionados à Proliferação e Sobrevivência</i> .....	27
3.2.3 - <i>Localização Nuclear de PAK1</i> .....	28
3.3 - <i>PAK E VÍRUS</i> .....	29
3.3.1 - <i>PAK1 e o Orthopoxvirus VACV</i> .....	31
<b>II. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>32</b>
<b>III. OBJETIVOS</b> .....	<b>35</b>
1. OBJETIVO GERAL .....	35
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
<b>IV. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>36</b>
1. LINHAGENS CELULARES.....	36
1.1. <i>CÉLULAS BSC-40 E VERO</i> .....	36
1.3. <i>CÉLULAS SELVAGENS (WT) E NOCAUTES (PAK1<sup>-/-</sup>) PARA PAK1</i> .....	36
2. VÍRUS .....	36
3. MULTIPLICAÇÃO E PURIFICAÇÃO VIRAL .....	37
4. TITULAÇÃO VIRAL.....	37
5. DROGAS E ANTICORPOS .....	38
6. ANÁLISE DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO E EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS VIRAIS.....	38
6.1. <i>INFECÇÃO</i> .....	38
6.2. <i>EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS</i> .....	39
6.3. <i>TRASFERÊNCIA DE "WESTERN"</i> .....	39
7. CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE IMVs E EEVs .....	40
7.1. <i>INFECÇÃO</i> .....	40
7.2. <i>TITULAÇÃO DOS EEVs</i> .....	40
7.3. <i>TITULAÇÃO DOS IMVs</i> .....	40

8. FENÓTIPO DE PLACA VIRAL .....	41
9. MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA E CONFOCAL.....	41
10. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA .....	42
<b>V – RESULTADOS .....</b>	<b>43</b>
1. CINÉTICA DE FOSFORILAÇÃO DAS MAPKS JNK1/2 E ERK1/2 NOS MEFs WT E PAK1 <sup>-/-</sup> APÓS INFECCÃO COM VACV.....	43
2. EXPRESSÃO GÊNICA VIRAL NOS MEFs WT E PAK1 <sup>-/-</sup> .....	45
3. CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE IMVs E EEVs NOS MEFs WT E PAK1 <sup>-/-</sup> INFECTADOS COM VACV.....	48
4. FENÓTIPO DE PLACA VIRAL NOS MEFs WT E PAK1 <sup>-/-</sup> .....	50
5. DISSEMINAÇÃO DO VACV NOS MEFs WT E PAK1 <sup>-/-</sup> .....	52
6. FORMAÇÃO DE CEVs E CAUDAS DE ACTINA NOS MEFs WT E PAK1 <sup>-/-</sup> INFECTADOS COM VACV .....	56
7. FOSFORILAÇÃO DE A36R NOS MEFs WT E PAK1 <sup>-/-</sup> INFECTADOS COM VACV.....	61
8. COLOCALIZAÇÃO DE ARP2 COM CEVs E CAUDAS DE ACTINA NOS MEFs WT E PAK1 <sup>-/-</sup> INFECTADOS COM VACV .....	63
9. LOCALIZAÇÃO DE P-PAK1 EM MEFs WT AO LONGO DA INFECCÃO COM VACV..	66
<b>VI – DISCUSSÃO.....</b>	<b>69</b>
<b>VII – CONCLUSÕES.....</b>	<b>74</b>
<b>VIII –PERSPECTIVAS.....</b>	<b>75</b>
<b>IX – ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NO PERÍODO.....</b>	<b>76</b>
<b>X – REFERÊNCIAS BIBLIGRÁFICAS .....</b>	<b>78</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1:</b> REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA PARTÍCULA DOS POXVÍRUS.....	6
<b>FIGURA 2:</b> IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DAS PARTÍCULAS DOS POXVÍRUS.....	7
<b>FIGURA 3:</b> REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO GENOMA DOS POXVÍRUS.....	9
<b>FIGURA 4:</b> CICLO DE MULTIPLICAÇÃO DOS POXVÍRUS.....	10
<b>FIGURA 5:</b> ATIVAÇÃO DAS MAPKS ERK E JNK APÓS INFECÇÃO PELO VACV.....	17
<b>FIGURA 6:</b> ALTERAÇÕES CELULARES AO LONGO DA INFECÇÃO PELO VACV.....	21
<b>FIGURA 7:</b> A INDUÇÃO DE CAUDAS DE ACTINA PELO CEV.....	23
<b>FIGURA 8:</b> DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DAS CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DE PAK1.....	25
<b>FIGURA 9:</b> CONSEQÜÊNCIAS DA ATIVAÇÃO D PAK POR DIFERENTES VÍRUS.....	30
<b>FIGURA 10:</b> CINÉTICA DE FOSFORILAÇÃO DE ERK1/2 E JNK1/2 NOS MEFs WT E PAK1 <sup>-/-</sup> APÓS INFECÇÃO PELO VACV.....	44
<b>FIGURA 11:</b> EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS VIRAIS PRECOSES.....	46
<b>FIGURA 12:</b> EXPRESSÃO DE PROTEÍNA VIRAL TARDIA.....	47
<b>FIGURA 13:</b> A AUSÊNCIA DE PAK1 NÃO TEM IMPACTO NA MULTIPLICAÇÃO DO VACV.....	49
<b>FIGURA 14:</b> A AUSÊNCIA DE PAK1 PROVOCA UMA REDUÇÃO NO TAMANHO DA PLACA VIRAL.....	51
<b>FIGURA 15:</b> DISSEMINAÇÃO DO VACV É AFETADA NAS CÉLULAS NOCAUTES PARA PAK1.....	53
<b>FIGURA 16:</b> DETALHE DA DISSEMINAÇÃO NAS PLACAS VIRAIS.....	54-5

<b>FIGURA 17:</b> A AUSÊNCIA DE PAK1 NÃO INTERFERE NA EXPOSIÇÃO DE CEVs NA SUPERFÍCIE CELULAR.....	58
<b>FIGURA 18:</b> A AUSÊNCIA DE PAK1 INTERFERE NA FORMAÇÃO DAS CAUDAS DE ACTINA PELO VACV.....	59
<b>FIGURA 19:</b> A AUSÊNCIA DE PAK1 INTERFERE NA FORMAÇÃO DAS CAUDAS DE ACTINA PELO VACV.....	60
<b>FIGURA 20:</b> A FOSFORILAÇÃO DE A36R OCORRE NAS CÉLULAS NOCAUTES PARA PAK1.....	62
<b>FIGURA 21:</b> A AUSÊNCIA DE PAK1 NÃO IMPEDE O RECRUTAMENTO DE ARP2 PARA OS SÍTIOS DE POLIMERIZAÇÃO DAS CAUDAS DE ACTINA INDUZIDAS PELOS CEVs.....	64
<b>FIGURA 22:</b> A AUSÊNCIA DE PAK1 NÃO IMPEDE O RECRUTAMENTO DE ARP2 PARA AS ADJACÊNCIAS DOS CEVs.....	65
<b>FIGURA 23:</b> P-PAK1 COLOCALIZA COM AS CAUDAS DE ACTINA E COM CEVs NOS MEFs WT.....	67-8

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1:</b> CLASSIFICAÇÃO DOS <i>CHORDOPOXVIRUS</i> .....	03
--	----

## ABREVIATURAS

Arp2/3	Proteína relacionada à actina 2 e 3
Bad	Promotor de morte celular associado à Bcl-xL/Bcl-2
BR	Brighton Red
BSA	Albumina sérica bovina
CEV	Vírus envelopado associado à célula
CPXV	<i>Cowpox virus</i>
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindole
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
dsRNA	RNA dupla-fita
ECP	Efeito citopático
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EEV	Vírus envelopado extracelular
EGF	Fator de crescimento epidérmico
c-fos e c-jun	proto-oncogenes celulares <i>fos e jun</i>
Egr-1	Gene de resposta precoce ao crescimento celular
eIF-2 $\alpha$	Fator de iniciação eucariótico 2 $\alpha$
ERK	Proteína cinase regulada por estímulo extracelular
EV	Vírus extracelular
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
GAGs	Glicosaminoglicanas
GFP	Proteína verde fluorescente
HBV	<i>Hepatitis B virus</i>
HCV	<i>Hepatitis C virus</i>
HIV	<i>Human immunodeficiency virus 1</i>
hpi	horas pós-infecção
HSV	<i>Human herpesvirus</i>
IEV	Vírus envelopado intracelular
IFN	Interferon
IMV	Vírus maduro intracelular
IRF-3	Fator regulatório do interferon 3
ITR	Seqüência terminal invertida
IVs	Vírus imaturos
JNK	Proteína cinase Jun N-terminal
LB	Tampão Laemmli
LB (meio)	Luria Bertani
LIMK	LIM cinase
MAPK	Proteína cinase ativada por mitógeno
MEM	Meio mínimo essencial
MEFs	Fibroblastos embrionários murinos
MHC	Molécula de histocompatibilidade principal
MOI	Multiplicidade de infecção

MPXV	<i>Monkeypox virus</i>
mRNAs	RNAs mensageiros
MV	Vírus maduro
MYXV	<i>Myxoma virus</i>
N-WASP	Proteína da síndrome neural Wiskott-Aldrich
NF-κB	Fator nuclear κB
ORF	Janela aberta de leitura
PAK1	Proteína cinase ativada por p21
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PBD	Domínio de ligação a p21
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PDK1	Proteína cinase dependente de PI3K
PI3K	Fosfatidil inositol 3-cinase
PKR	Proteína cinase R
PKA	Proteína cinase A
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluoreto
SDS	Duodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
SH3	Domínio de homologia a Src 3
STK	Serina/treonina cinase
UFP	Unidade formadora de placa
VACV	<i>Vaccinia virus</i>
VARV	<i>Variola virus</i>
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
VGf	Fator de crescimento do <i>Vaccinia virus</i>
WIP	Proteína de interação a WASP
WR	Western Reserve
WV	Vírus envelopado
siRNA	Pequeno RNA interferente
OMS	Organização Mundial de Saúde

## RESUMO

A multiplicação viral eficiente resulta de uma complexa rede de interações vírus - célula hospedeira, que gera um ambiente intracelular propício a geração e disseminação da progênie viral. Interferir em vias de sinalização relacionadas à dinâmica do citoesqueleto é uma estratégia comum empregada pelos vírus para atingir esse propósito. O *Orthopoxvirus Vaccinia* (VACV), membro protótipo da família *Poxviridae*, interage de forma complexa com o citoesqueleto de actina e de microtúbulos de suas células hospedeiras durante seu ciclo de multiplicação viral, sendo esta manipulação essencial para garantir a eficiência da penetração, montagem, transporte e disseminação viral. Neste trabalho tivemos como objetivo investigar o papel desempenhado pela serina/treonina cinase PAK1 (p21-activated kinase 1) na infecção pelo VACV. Para isso, fibroblastos embrionários murinos (MEFs) derivados de camundongos selvagens (WT) ou nocautes (PAK1<sup>-/-</sup>) para PAK1, foram infectados com VACV por diferentes períodos de tempo. Verificou-se, através de ensaios de transferência de *Western* e microscopia de fluorescência, que PAK1 não está criticamente envolvida em etapas precoces do ciclo de multiplicação do VACV, sendo que a necessidade de PAK1 para a penetração do VACV por macropinocitose, previamente descrita (*Science*, 320:531, 2008), não interfere com a produção viral. Apesar disso, observamos que a ausência de PAK1 provoca uma grande redução no tamanho da placa viral, e que infecções a baixa MOI resultam em uma produção significativamente menor (~ 90%), tanto de IMVs, quanto de EEVs, indicando que a disseminação viral está sendo de alguma forma prejudicada. Marcação fluorescente do citoesqueleto de actina e microscopia eletrônica de varredura mostraram uma redução no número de caudas de actina induzidas pelo VACV em MEFs PAK1<sup>-/-</sup> sem haver, no entanto, alteração da quantidade de CEVs expostos na superfície celular. Além disso, experimentos de microscopia confocal revelaram que a ausência de PAK1 não impede o recrutamento do complexo ARP2/3 para os sítios de polimerização de actina subjacentes aos CEVs, e que em células WT, a forma ativa de PAK1 (P-PAK1 Thr 423) colocaliza com CEVs e caudas de actina. Assim, os resultados obtidos permitem concluir que PAK1 desempenha um papel na disseminação viral, sendo um constituinte celular importante para garantir a eficiência desse processo.

**Palavras-chave:** *Vaccinia Virus*, PAK1, Interação vírus-hospedeiro, Disseminação viral.

## ABSTRACT

An efficient virus multiplication cycle results from a complex network of virus-host interactions culminating with a propitious intracellular environment for the generation and spread of virus progeny. Interfering with signaling pathways related to cytoskeleton dynamics is a common strategy employed by viruses to achieve this purpose. The *Orthopoxvirus Vaccinia* (VACV), the prototypic member of *Poxviridae* family, interacts in a complex way with both actin and microtubules cytoskeleton of their host cells during the whole replication cycle, and this manipulation is essential to assure the efficiency of viral entry, assembly, transport and dissemination. In the present study we investigated the possible involvement of serine/threonine kinase PAK1 (p21-activated kinase 1) upon VACV infection. To that end, mouse embryo fibroblasts (MEFs) derived from wild-type (WT) and PAK1-null (PAK1<sup>-/-</sup>) mice were infected with VACV at different times. We showed, through *Western* blotting assay and fluorescence microscopy, that PAK1 is not critically involved in the early steps of VACV cycle, and the need of PAK1 to VACV entry by macropinocytosis, previously described (Science, 320:531, 2008), does not affect the production of intracellular mature virus (IMVs). Although, we found that the absence of PAK1 led to a severe reduction in plaque phenotype and infections of MEFs PAK1<sup>-/-</sup> carried out at low-multiplicity were followed by a greatly reduced production (~90%) of both IMV and extracellular enveloped virus (EEV), indicating that virus spread was drastically impaired. Immunofluorescent staining of actin cytoskeleton and scanning electron microscopy showed a reduction in the number of VACV-induced actin tails in MEFs PAK1<sup>-/-</sup>, without alteration in the amount of cell-associated enveloped virus (CEVs). Furthermore, confocal microscopy of MEFs PAK1<sup>+/+</sup> infected with VACV revealed a colocalization of P-PAK1 with actin tails tips as well as CEVs (B5R) particles. Indeed, these results show that PAK1 plays a role in actin-based motility of VACV, being an important cellular constituent to assure the efficiency of viral dissemination.

**Keywords:** *Vaccinia Virus*, PAK1, Virus-host interaction, Viral spread.

# I. INTRODUÇÃO:

## 1. OS POXVÍRUS

### 1.1. HISTÓRICO:

Os poxvírus representaram um importante marco no desenvolvimento da virologia, imunologia e vacinologia. No século XVIII, a varíola (doença causada pelo poxvírus de mesmo nome) era prevalente em todo o mundo e estima-se que, somente na Europa, houve 60 milhões de vítimas da doença. Em 1796, o Dr. Edward Jenner, após notar que os ordenhadores infectados nas mãos, pelo agente causador da varíola bovina (*Cowpox virus*), tornavam-se imunes ao vírus da varíola, passou a inocular o *Cowpox virus* deliberadamente em humanos para protegê-los da doença. Durante o século XIX, a vacinação com *Cowpox virus* tornou-se uma prática mundial. Quase um século e meio depois, em 1939, análises do vírus contido nas amostras vacinais revelaram que este era diferente do vírus original, sendo pertencente a uma espécie não encontrada na natureza até então. Essa nova espécie de poxvírus foi denominada *Vaccinia virus* (revisado por SMITH & MCFADDEN, 2002).

Em 1967 a Organização Mundial de Saúde (OMS) iniciou uma grande campanha de vacinação contra a varíola. Em 1980 a OMS declarou a varíola erradicada do mundo e recomendou que a vacinação fosse interrompida (revisado por FENNER, 2000 e GEDDES, 2006).

O *Vaccinia virus* (VACV), usado para prevenir a varíola, tornou-se modelo para os primeiros estudos biológicos e bioquímicos dos poxvírus. Ele foi o primeiro vírus animal a ser purificado suficientemente para mostrar que continha DNA e não RNA e a ser visualizado por microscopia eletrônica. O VACV também foi o primeiro modelo usado em ensaios de infectividade por contagem de lesões em membranas corioalantóides de ovos embrionados de galinha. Além disso, o VACV foi o primeiro vírus utilizado como vetor de expressão, tornando-se candidato a atuar como vetor de vacinas contra doenças não relacionadas, fato que vem renovando o interesse pelos poxvírus nas últimas décadas (revisado por FENNER, 2000; MOSS, 1996 e PASTORET & VANDERPLASSCHEN, 2003).

## **1.2. A FAMÍLIA *Poxviridae*:**

Os poxvírus são pertencentes à família *Poxviridae*, que compreende vírus envelopados, possuindo como material genético DNA fita dupla linear, com as extremidades ligadas covalentemente em forma de alça. Os membros dessa família possuem diversas características marcantes: apresentam partículas virais complexas, variando em torno de 300 nm, possuem uma capacidade codificadora gênica relativamente extensa e, a despeito do seu genoma de DNA, desenvolvem seu ciclo de multiplicação inteiramente no citoplasma da célula hospedeira (MOSS, 2001).

A família *Poxviridae* é subdividida em duas subfamílias de acordo com o tipo de hospedeiro que infectam. A subfamília *Entomopoxvirinae*, cujos membros infectam invertebrados, e a subfamília *Chordopoxvirinae*, que compreende os vírus de vertebrados. Esta última é constituída de nove gêneros (Tabela 1), dos quais, o gênero *Orthopoxvirus* é o mais estudado. Nesse gênero estão inseridas nove espécies distintas (*Camelpox virus*, *Cowpox virus*, *Ectromelia virus*, *Monkeypox virus*, *Raccoonpox virus*, *Taterapox virus*, *Vaccinia virus*, *Variola virus*, *Volepox vírus*), mas que são genética e antigenicamente relacionadas. Dentre essas espécies, quatro se destacam por infectar humanos: *Variola virus* (VARV), *Monkeypox virus* (MPXV), *Cowpox virus* (CPXV) e *Vaccinia virus* (VACV) (MOSS, 2001; revisado por FENNER, 2000).

O *Variola virus* (VARV) é um patógeno humano específico, uma das características que determinou o sucesso da campanha de erradicação da varíola promovida pela OMS. Hoje, estoques de VARV autorizados pela OMS são mantidos em dois laboratórios de referência: o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), em Atlanta, nos Estados Unidos e o Instituto para Preparações Virais, em Moscou na Rússia. No entanto, existe uma preocupação acerca da existência de estoques clandestinos de VARV, e sua liberação, acidental ou deliberada, poderia resultar em uma grande epidemia, já que a vacinação foi suspensa a mais de três décadas (revisado por FENNER, 2000; SMITH & McFADDEN, 2002; McFADDEN, 2005 e GEDDES, 2006).

O *Monkeypox virus* (MPXV) ocorre naturalmente apenas na África central e ocidental, podendo causar uma doença exantematosa generalizada, clinicamente muito semelhante à varíola, mas a transmissibilidade de pessoa para pessoa é baixa. Em 2003, um surto de MPXV ocorreu nos Estados Unidos devido à importação inadvertida de ratos contaminados por esse vírus presentes em uma embarcação vinda da África (revisado por McFADDEN, 2005).

**Tabela 1: Classificação dos *Chordopoxvirus*.**

<b>Família <i>Poxviridae</i>; subfamília <i>Chordopoxvirinae</i></b>	
<b>Gênero</b>	<b>Protótipo</b>
<i>Avipoxvirus</i>	<i>Fowlpox virus</i>
<i>Capripoxvirus</i>	<i>Sheeppox virus</i>
<i>Cervidpoxvirus</i>	<i>Deerpox virus W-848-83</i>
<i>Leporipoxvirus</i>	<i>Myxoma virus</i>
<i>Molluscipoxvirus</i>	<i>Molluscum contagiosum virus</i>
<i>Orthopoxvirus</i>	<i>Vaccinia virus</i>
<i>Parapoxvirus</i>	<i>Orf virus</i>
<i>Suipoxvirus</i>	<i>Swinepox virus</i>
<i>Yatapoxvirus</i>	<i>Yaba monkey tumor virus</i>
Unassigned	<i>Squirrel poxvirus</i>

A família *Poxviridae*, subfamília *Chordopoxvirinae*, apresenta 9 gêneros, sendo seus protótipos indicados. **Fonte:** ICTV – *International Committee on Taxonomy of Viruses*.

O *Cowpox virus* (CPXV) é um vírus de roedores, mas apresenta um amplo espectro de hospedeiros, podendo ser adquirido por humanos, vacas ou gatos, caracterizados como hospedeiros acidentais. A doença provocada por esse vírus é endêmica na Europa e na Ásia. Nos últimos anos, é crescente o número de casos relatados de infecção humana por CPXV, associada principalmente aos gatos, que exercem um importante papel de hospedeiro intermediário, transmitindo CPXV de roedores para os seres humanos e outros animais domésticos (CORAS, 2005). No Brasil, o isolamento de CPXV não tem sido relatado em humanos ou animais (TRINDADE *et al.*, 2003).

O *Vaccinia virus* (VACV) é o protótipo da família *Poxviridae*. Informações detalhadas a respeito dos poxvírus são derivadas principalmente de estudos com o VACV, entretanto, as características básicas se aplicam aos outros membros da família (MOSS, 2001). Apesar de ser o mais estudado, o hospedeiro natural do VACV ainda é desconhecido. Muitas teorias tentam explicar sua origem, como por exemplo, que o VACV seria derivado do VARV ou do CPXV, ou possivelmente um híbrido destes dois (FENNER *et al.*, 1989). Após a erradicação da varíola, o VACV passou a ser amplamente utilizado na pesquisa e nas últimas décadas esse vírus tem atraído um interesse renovado devido ao seu potencial uso como vetor recombinante para a produção de vacinas ou de ação oncolítica (revisado por PASTORET & VANDERPLASSCHEN, 2003; ERBS *et al.*, 2008). Além disso, diversos trabalhos desenvolvidos, muitos deles no Laboratório de Vírus – ICB/UFMG, mostram que amostras de VACV estão sob ativa circulação no país, já tendo sido isoladas ou detectadas em camundongos, roedores silvestres, gado e primatas (da FONSECA *et al.*, 2002; TRINDADE *et al.*, 2004; TRINDADE *et al.*, 2007<sup>a</sup>; ABRAHÃO *et al.*, 2009; ABRAHÃO *et al.*, 2010). Vários surtos de vaccínia bovina já foram registrados, causando, inclusive, infecções zoonóticas em humanos, principalmente ordenhadores (DAMASO *et al.*, 2000; TRINDADE *et al.*, 2003; NAGASSE-SUGAHARA *et al.*, 2004; LEITE *et al.*, 2005; TRINDADE *et al.*, 2006; TRINDADE *et al.*, 2007<sup>b</sup>; MEDAGLIA *et al.*, 2009; SILVA-FERNANDES *et al.*, 2009; TRINDADE *et al.*, 2009; QUIXABEIRA-SANTOS *et al.*, 2011), caracterizando-se como uma zoonose emergente e que requer atenção dos órgãos de Saúde Pública.

### **1.3. CARACTERÍSTICAS GERAIS:**

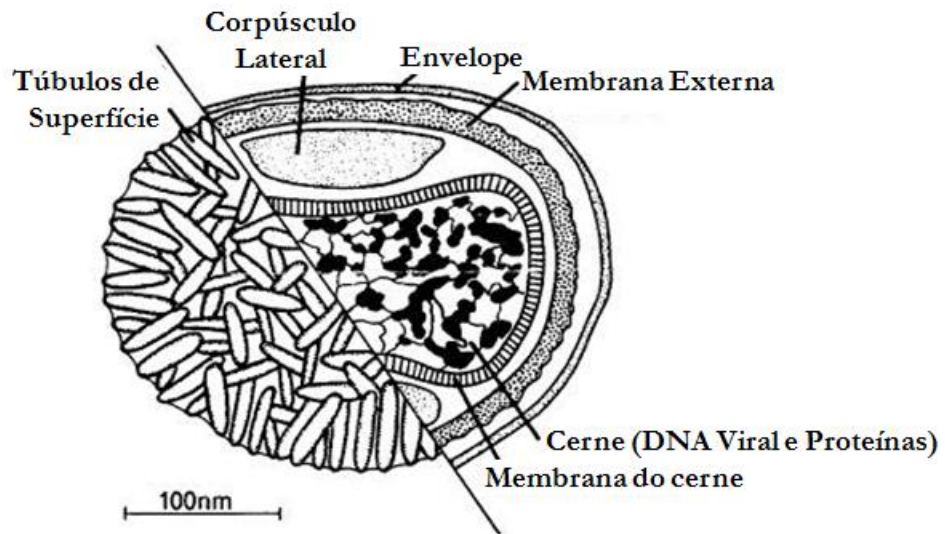
#### **1.3.1. Morfologia**

Os poxvírus são os maiores e mais complexos dentre os vírus animais. Apresentam-se sob a forma ovóide ou semelhante a um tijolo, sendo que o VACV possui cerca de 350 x 270 nm (DUBOCHET *et al.*, 1994; FENNER *et al.*, 1989).

A partícula viral infecciosa completa apresenta basicamente quatro elementos estruturais principais: envelope, membrana externa, corpúsculos laterais e cerne (FENNER *et al.*, 1989; revisado por CONDIT *et al.*, 2006) (Figura 1).

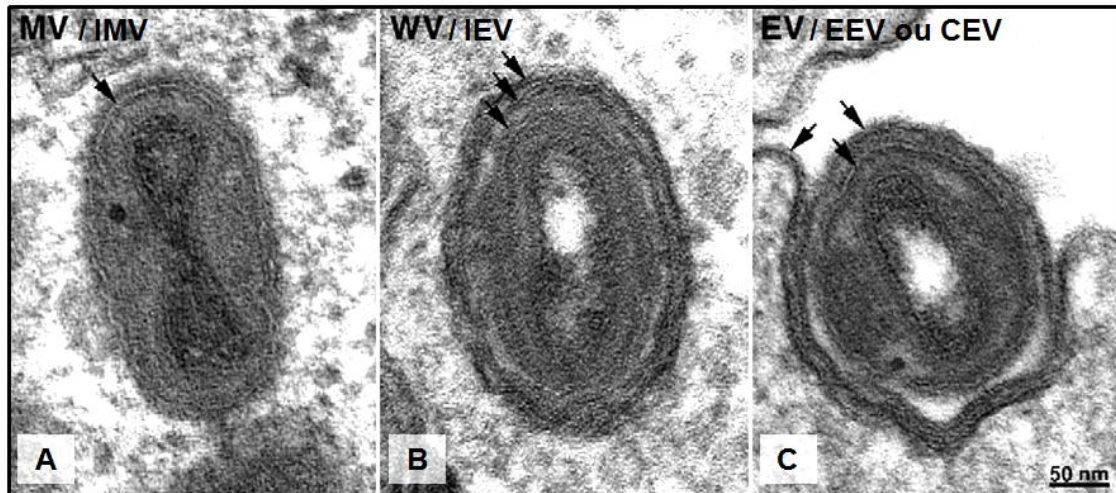
O cerne representa a estrutura mais interna do vírus, sendo um disco ovalado, bicôncavo e envolto por uma camada composta de pequenas subunidades protéicas cilíndricas, denominada paliçada. No interior do cerne se encontra o material genético, complexado a proteínas virais, em uma estrutura denominada nucleossomo. Os corpúsculos laterais são estruturas de forma ovóide dispostos nas duas concavidades do cerne, de composição química e função ainda pouco definida. A membrana externa é uma bicamada lipoprotéica, de origem celular, que circunda o cerne e os corpúsculos laterais, e contém proteínas de superfície tubulares ou globulares arranjadas irregularmente. O envelope é a estrutura mais externa, também de composição lipoprotéica e de origem celular, podendo estar presente ou não, originando três partículas virais distintas: o vírus maduro intracelular (IMV), o vírus envelopado intracelular (IEV) e o vírus envelopado extracelular (EEV), que pode ser liberado ou permanecer associado à membrana celular, sendo neste último caso, denominado de vírus envelopado associado à célula (CEV) (revisado por SMITH *et al.*, 2003 e por CONDIT *et al.*, 2006).

Uma nova nomenclatura para as partículas dos poxvírus foi proposta por MOSS (2006). Os IMVs foram classificados como vírus maduros (MV), e estas partículas apresentam apenas a membrana externa. Os IEVs, por adquirirem um envelope composto por duas membranas que circundam o MV, foram chamados de vírus envelopados (WV), e as partículas EEV e CEV, por ocorrerem fora da célula, foram denominadas vírus extracelulares (EV), e possuem um envelope composto de apenas uma membrana (MOSS, 2006) (Figura 2). Entretanto, neste trabalho, por motivos didáticos, utilizaremos a nomenclatura antiga.



**FIGURA 1:** REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA PARTÍCULA DOS POXVÍRUS

A figura mostra a partícula viral infecciosa completa evidenciando seus elementos estruturais principais: membrana externa, corpúsculos laterais, cerne e envelope. (*Fonte: modificado de MOSS, 2001*).



**FIGURA 2:** *IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO DAS PARTÍCULAS DOS POXVÍRUS*

A: IMV (vírus maduro intracelular) ou MV (vírus maduro) - a seta aponta a única membrana desta partícula; B: IEV (vírus envelopado intracelular) ou WV (vírus envelopado) - uma seta apontando a membrana do IMV e as outras duas, as membranas resultantes do envelopamento; C: EEV (vírus envelopado extracelular) e CEV (vírus envelopado associado à célula) ou EV (vírus extracelulares) - uma seta indicando a membrana externa do IEV, que se fundiu à membrana plasmática, e as outras duas setas, a membrana interna remanescente do IEV (envelope) e a membrana do IMV (**Fonte:** *modificado de MOSS, 2006*).

### 1.3.2. Genoma

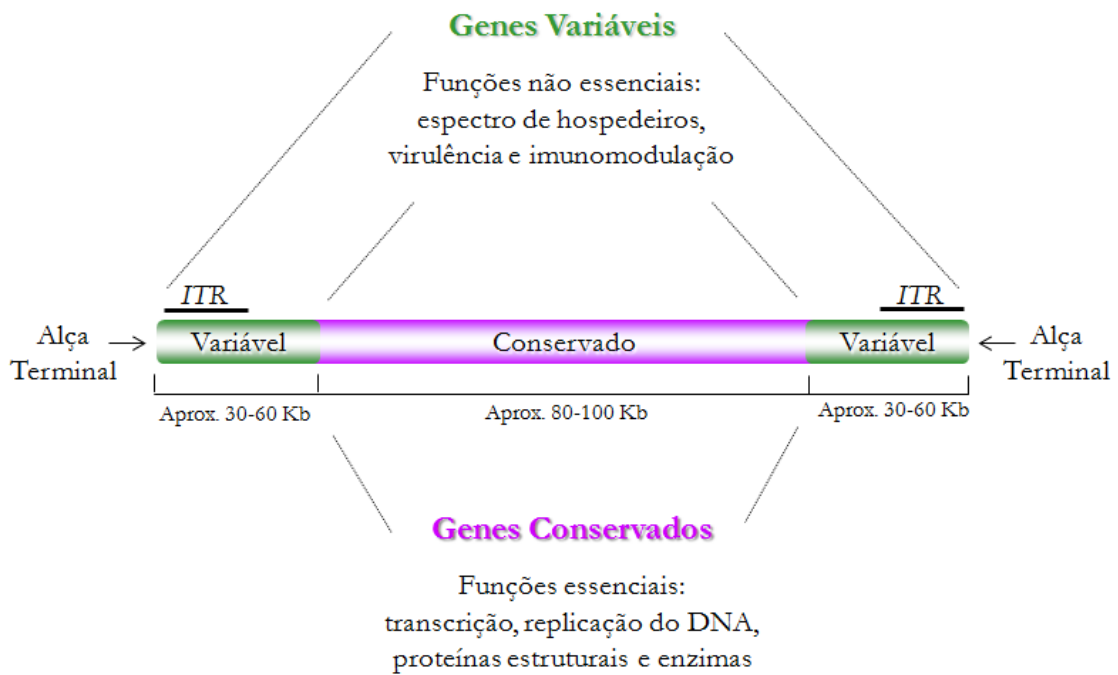
O genoma dos poxvírus varia de 130 Kbp a 300 Kbp e é constituído de uma molécula de DNA dupla fita linear, covalentemente ligada nas extremidades por alças de fita simples. O genoma do VACV-WR (amostra Western Reserve) contém 200 Kpb, enquanto que o genoma do CPXV-BR (amostra Brighton Red) possui cerca de 220 Kpb (MOSS, 2001).

A porção central do genoma dos poxvírus apresenta seqüências de DNA altamente conservadas, que codificam genes essenciais, como polipeptídeos estruturais e enzimas envolvidas no metabolismo do ácido nucléico. Já as regiões mais externas do genoma são variáveis e codificam genes relacionados à interação vírus-hospedeiro e mecanismos de patogênese. Nas extremidades também se encontram as regiões terminais invertidas (ITRs), variando de 10 a 12 Kpb, que possuem seqüências idênticas dispostas em orientações contrárias (Figura 3) (revisado por SMITH & MCFADDEN, 2002). As alças de fita simples que conectam as duas fitas de DNA são ricas em adenina e timina e possuem seqüência conservada, sendo importantes no processo de replicação do DNA viral. Os genomas do VACV e do CPXV estão completamente seqüenciados e contêm aproximadamente 200 genes (MOSS, 2001).

As ORFs (open reading frames – janelas de leitura aberta) dos *orthopoxvirus* são nomeadas de acordo com a sua localização no perfil de restrição obtido após a digestão do genoma com a enzima *HindIII*. Cada ORF é denominada pela letra do fragmento gerado pela digestão com *HindIII* em que se localiza, seguida do número da ORF e da letra L ou R, dependendo do sentido da leitura do gene, para esquerda ou direita, respectivamente (revisado por CONDIT *et al.*, 2006). O genoma do VACV não possui íntrons e cada gene contém seu próprio promotor. A expressão gênica é regulada primariamente em nível transcricional, sendo os genes divididos em três classes temporais: precoce, intermediária e tardia (revisado por CONDIT & NILES, 2002).

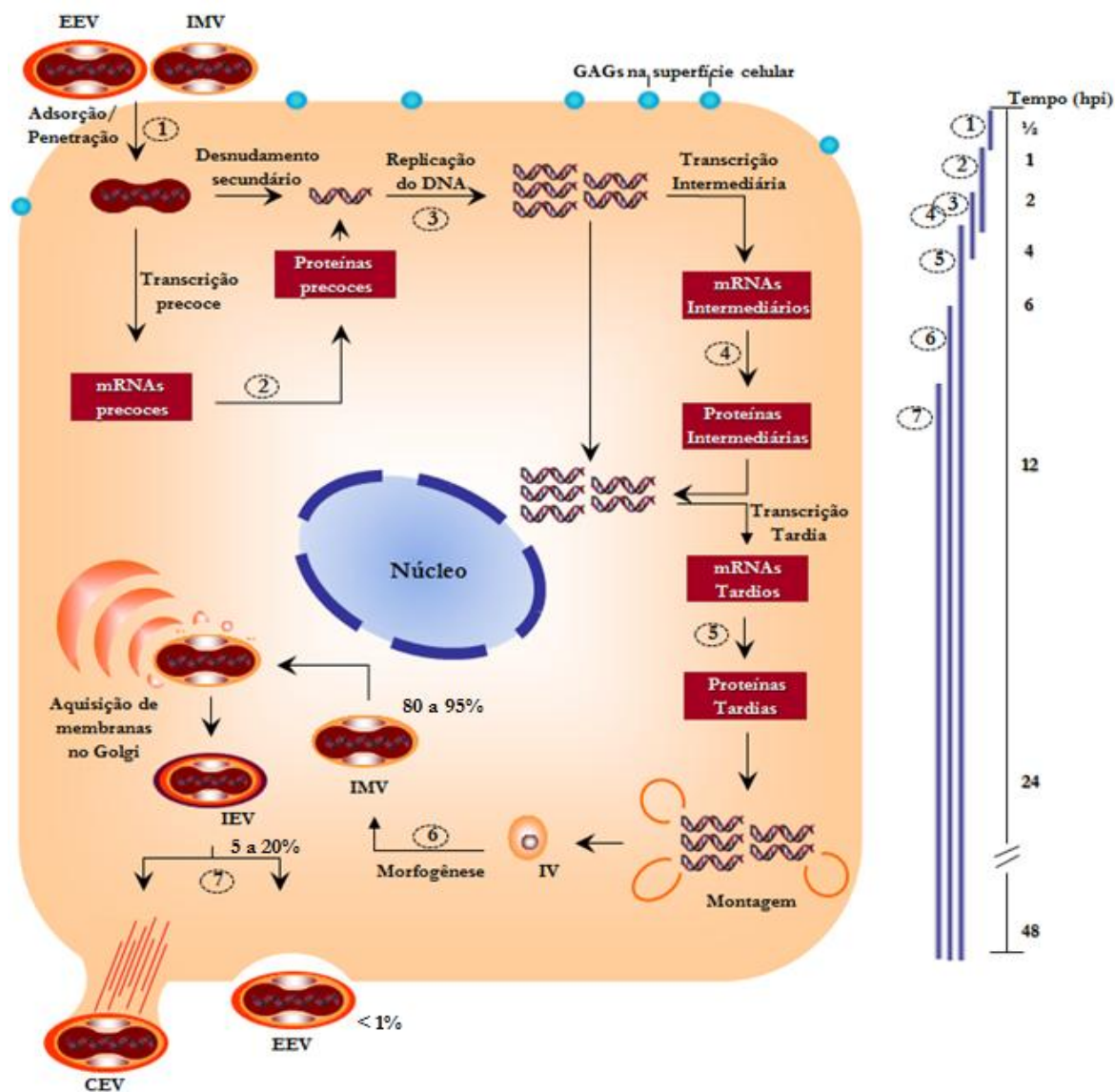
### 1.4. CICLO DE MULTIPLICAÇÃO VIRAL:

O ciclo de multiplicação dos poxvírus ocorre inteiramente no citoplasma da célula hospedeira (Figura 4). O tempo necessário para completar o ciclo varia de acordo com o vírus e com a célula infectada, sendo que para o VACV, em células epiteliais de linhagem contínua (VERO), dura de 12 a 24 horas. As informações que se seguem são relativas ao ciclo de multiplicação do *Vaccinia virus*, porém, refletem também os mecanismos que ocorrem durante o ciclo de multiplicação da grande maioria dos poxvírus (MOSS, 2001).



**FIGURA 3:** REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO GENOMA DOS POXVÍRUS.

O genoma possui, em média, 200 Kb e pode ser dividido em duas partes. Uma região central conservada, que codifica principalmente proteínas essenciais para a replicação viral, e as regiões terminais, que são variáveis e codificam proteínas não essenciais para a replicação viral em cultura de células. Estas últimas também contêm as regiões terminais repetidas (ITRs) (*Fonte: Adaptado de SMITH & McFADDEN, 2002*).



**FIGURA 4:** CICLO DE MULTIPLICAÇÃO DOS POXVÍRUS

As duas formas infectivas dos poxvírus, o vírus envelopado extracelular (EEV) e o vírus maduro intracelular (IMV) iniciam o seu ciclo ao adsorverem e penetrarem na célula, ocorrendo o desnudamento primário (1). Ainda no cerne, ocorre a transcrição de genes precoces e após a síntese de proteínas precoces, ocorre o desnudamento secundário e conseqüente liberação do DNA no citoplasma (2). Enzimas sintetizadas na etapa inicial da infecção, então, atuam na replicação do DNA viral (3). Durante e após a replicação deste DNA, ocorre a transcrição dos genes intermediários e tardios (4 e 5). Finalmente, tem-se a montagem e morfogênese dos vírus (6), que são posteriormente liberados no meio extracelular (7). A porcentagem de cada partícula viral formada está indicada, e, à direita, linha do tempo representando a duração aproximada de cada etapa do ciclo de multiplicação, ambas para o VACV-WR. *(Fonte: Adaptado de McFADDEN, 2005).*

#### *1.4.1. Adsorção, Penetração e Desnudamento Primário:*

Os poxvírus diferem da maioria dos outros vírus com relação à etapa de adsorção, pois não possuem um ligante único específico de interação com receptores celulares. Assim, a possibilidade de utilização de diferentes receptores, bem como a existência de duas formas infectivas com topologias distintas, IMV e EEV, dificulta o entendimento da adsorção dos poxvírus às células hospedeiras (revisado por MOSS, 2006). Os poxvírus são capazes de adsorver e penetrar em uma grande variedade de tipos celulares, sendo que a não-permissividade a infecção, em geral, ocorre em estágios pós-penetração. Dessa forma, acredita-se que os determinantes celulares para a adsorção sejam ubiquamente expressos, como as glicosaminoglicanas (GAGs) da superfície celular e componentes da matriz extracelular (revisado por McFADDEN, 2005). Alguns trabalhos demonstram que proteínas de superfície do IMV, como H3L, A27L e D8L, são capazes de se ligar a sulfato de heparina ou sulfato de condroitina (revisado por MOSS, 2006). Entretanto, essa ligação do IMV à GAGs parece ocorrer de maneira célula-específica e não é essencial para a penetração viral (CARTER *et al.*, 2005).

Com relação à penetração dos poxvírus, evidências mostram tanto um mecanismo de fusão direta da membrana do IMV com a membrana plasmática, quanto a internalização por via endossômica (CARTER *et al.*, 2005; TOWNSLEY *et al.*, 2006 e 2007), sendo possível que ambas as rotas sejam usadas, dependendo da linhagem do vírus e do tipo celular (revisado por MOSS, 2006). Várias proteínas presentes na membrana do IMV, incluindo: A21, A28, A16, H2, L5, G3, G9 e J5, mostraram estar envolvidas na etapa de fusão. Vírus mutantes com deleção para cada um desses genes apresentam um bloqueio na etapa de fusão da membrana do IMV com a membrana plasmática, indicando que elas exercem funções essenciais não-redundantes. Essas proteínas se associam umas às outras, sugerindo que funcionem como um complexo de fusão/penetração que atua cooperativamente com componentes celulares para promover a penetração viral (SENKEVICH *et al.*, 2005; LALIBERTE *et al.*, 2011.). Recentemente, foi demonstrado que a penetração do VACV por via endossômica ocorre por meio de macropinocitose, processo que demanda intenso rearranjo de actina e requer a participação de diversos componentes celulares, como Rac1, PAK1, PI3K, PKC, entre outros (MERCER & HELENIUS, 2008; MERCER & HELENIUS, 2009; SANDGREN *et al.*, 2010; SCHMIDT *et al.*, 2011).

No caso do EEV, estudos recentes demonstraram que estas partículas perdem o envelope, através de um mecanismo não fusogênico e dependente de ligante, na superfície

celular, capacitando a penetração do IMV interno por fusão. Esse processo requer a participação das glicoproteínas de envelope A34 e B5R, e mostrou ser dependente de interações com moléculas polianiónicas na superfície celular, como as GAGs (LAW *et al.*, 2006; HUSAIN *et al.*, 2007; ROBERTS *et al.*, 2009). Foi demonstrado que essas partículas também penetram por macropinocitose, necessitando de acidificação vacuolar para o rompimento da membrana externa do EEV e posterior fusão da membrana do IMV com a membrana do endossomo (SCHMIDT *et al.*, 2011).

Assim, embora as formas IMV e EEV possam interagir diferenciadamente com a superfície celular, as vias de penetração de ambas convergem para a etapa de fusão da membrana do IMV com a membrana da célula. Esse evento culmina com a liberação do cerne viral no citoplasma, processo denominado desnudamento primário. O cerne viral é transportado da periferia celular, através de microtúbulos, até locais próximos ao núcleo, onde se inicia a síntese dos mRNAs virais (MOSS, 2001)

#### *1.4.2. Expressão Gênica e Replicação do DNA viral:*

Os poxvírus coordenam os processos de replicação do genoma e morfogênese através da regulação temporal da expressão gênica viral. Dessa forma, a replicação viral completa é caracterizada por três etapas de síntese de mRNA e proteína viral - as fases precoce, intermediária e tardia (revisado por CONDIT & NILES, 2002).

A fase precoce se inicia com a transcrição dos genes precoces, ainda dentro do cerne viral. Em seguida, os mRNAs transcritos são direcionados para o citoplasma, através de poros na superfície do cerne, onde são traduzidos pela maquinaria celular. Os genes precoces codificam para proteínas relacionadas à replicação do DNA, biossíntese de nucleotídeos, evasão imune, fatores de crescimento e transcrição dos genes intermediários (revisado por CONDIT & NILES, 2002). As proteínas precoces também são necessárias para degradar as nucleoproteínas que constituem o cerne, resultando na liberação do DNA viral no citoplasma da célula hospedeira, processo denominado desnudamento secundário (MOSS, 2001).

A fase intermediária inicia-se com a replicação do DNA viral e a transcrição dos genes intermediários a partir do DNA recém-sintetizado, que são então, traduzidos nos fatores de transcrição tardios. O processo de replicação do DNA viral começa, tipicamente, entre 1 e 2 horas após a infecção e resulta na geração de aproximadamente 1000 cópias do genoma viral por célula, das quais metade será empacotada nas partículas virais durante a morfogênese. A replicação ocorre exclusivamente no citoplasma, em regiões granulares,

eletrodensas, denominadas fábricas virais ou virossomos, sendo que todas as proteínas necessárias à replicação do DNA viral são codificadas pelo próprio vírus nos estágios precoces da infecção (FENNER *et al.*, 1989; MOSS, 2001; revisado por CONDIT & NILES, 2002).

A fase tardia se caracteriza pela transcrição dos genes tardios, sendo que os mRNAs desta fase são detectados após 140 minutos de infecção com o VACV, e continuam sendo expressos até 48 horas, refletindo uma transcrição ativa, uma vez que a meia-vida desses mRNAs é estimada em 30 minutos ou menos (MOSS, 2001). Tais mRNAs são traduzidos nas proteínas virais estruturais, enzimas e fatores de transcrição precoces, que irão constituir as novas partículas virais.

#### *1.4.3. Morfogênese e Liberação da Progenie Viral:*

A montagem e morfogênese dos poxvírus começa 5 a 6 horas após a infecção e ocorre inteiramente nas fábricas virais. As primeiras estruturas visíveis são as crescentes, que se estendem formando os vírus imaturos (IVs), partículas esféricas e não infecciosas. Os IVs passam por um processo de maturação, que envolve clivagem de várias proteínas do capsídeo viral, promovendo a condensação do cerne e a formação dos IMVs com sua morfologia característica (revisado por SMITH *et al.*, 2003).

Após a geração dos primeiros IMVs, a maioria é envelopada para a formação dos IEVs. Entretanto, à medida que mais IMVs vão sendo produzidos, estes passam a predominar, possivelmente devido ao esgotamento das membranas de envelopamento (ULAETO *et al.*, 1996). Assim, do total de IMVs produzidos, a maioria permanece nessa forma, só sendo liberada com a lise celular. Parte dos IMVs (5 a 20%) é transportada ao longo de microtúbulos até a rede do *trans*-Golgi ou endossomos precoces, de onde recebem uma dupla membrana, formando os IEVs. Tanto o transporte, quanto o envelopamento, são dependentes da proteína de superfície do IMV A27L. Os IEVs então se movem através dos microtúbulos até a periferia celular, onde se fundem com a membrana plasmática para formar os CEVs, que são liberados como EEVs, ou ficam retidos e induzem a polimerização de actina, sendo propulidos em direção às células vizinhas. Sete proteínas específicas do IEV foram identificadas: F13L, B5R e F12L, que desempenham importante papel no envelopamento e no transporte dos IEVs; A33R, A34R e A36R, importantes para a liberação dos vírus da célula; e A56R, a hemaglutinina viral, com papel na formação de sincícios. Com exceção de A36R e F12L, todas as outras

proteínas também estão presentes nas partículas extracelulares CEV e EEV (revisado por SMITH *et al.*, 2002 e SMITH & LAW, 2004).

Essas formas envelopadas extracelulares, apesar de constituírem apenas uma pequena fração da progênie viral, têm grande importância biológica, pois são as principais responsáveis pela disseminação viral, tanto em cultura de células, quanto *in vivo*. Os IMVs, apesar de serem os principais responsáveis pela disseminação a novos hospedeiros, devido a sua relativa resistência e estabilidade, não são adequados a disseminação dentro do hospedeiro, pois são partículas altamente imunogênicas. Além disso, por serem liberados apenas com a lise celular, são pouco representativos no sobrenadante de culturas infectadas e não contribuem significativamente para a disseminação *in vitro*. Já as formas EEV e CEV possuem um envelope externo que dificulta o reconhecimento pelo sistema imune, sendo a principal forma de disseminação dentro do hospedeiro. O EEV é responsável pela disseminação de longo-alcance (sistêmica) e o CEV pela disseminação célula-a-célula (revisado por SMITH *et al.*, 2002 e SMITH & LAW, 2004; PAYNE, 1980).

Acredita-se que a retenção do vírus na superfície celular como CEV possa ser um requerimento para a indução de caudas de actina, e dessa forma, uma estratégia empregada pelos poxvírus para uma eficiente disseminação célula-a-célula (revisado por SMITH *et al.*, 2002). Esse processo é o que determina o tamanho do fenótipo de placa viral, existindo uma forte correlação entre redução no tamanho da placa e a ausência ou redução na formação de caudas de actina (McINTOSH *et al.*, 1996; MATHEW *et al.*, 1998; ROPER *et al.*, 1998; ZHANG *et al.*, 2000; revisado por SMITH, 2002; KATZ *et al.*, 2003). A formação de caudas de actina foi recentemente implicada em um mecanismo adicional de dispersão do VACV, que garante uma rápida disseminação e aumento da placa viral. CEVs propelidos por células infectadas em direção as células vizinhas, caso encontrem uma célula já infectada, induzem a formação de uma nova cauda de actina nessa célula, evento dependente da expressão e localização precoce de A36 e A33 na membrana celular, sendo propelidos novamente, até alcançarem uma célula não infectada, na qual irão penetrar e iniciar novo ciclo (DOCEUL *et al.*, 2010).

A magnitude da liberação de EEVs, por sua vez, parece não interferir com o tamanho da placa em si, embora a liberação de EEVs em grande quantidade interfira com o fenótipo de placa, formando placas em forma de cometa, em decorrência das inúmeras placas satélites geradas pela disseminação unidirecional dessas partículas, por correntes de convecção do meio de cultivo (PAYNE, 1980; BLASCO & MOSS, 1992; KATZ *et al.*, 2003). A quantidade de EEVs liberados no meio, entretanto, é de certa forma determinada

pela eficiência com que os CEVs são retidos na superfície celular, e tanto a genética do vírus, quanto o fenótipo da célula hospedeira, podem influenciar esse processo (BLASCO & MOSS, 1992).

## **2. INTERAÇÃO POXVÍRUS-HOSPEDEIRO**

Os vírus possuem capacidades codificadoras gênicas e estruturais limitadas, o que faz destes agentes infecciosos parasitas intracelulares obrigatórios. Para se manterem na natureza, replicando seu genoma e produzindo novas partículas infectivas, os vírus necessitam de uma célula viva que seja permissiva à replicação viral. Para isso, ao longo da evolução, os vírus adquiriram múltiplas estratégias para manipular as respostas e funções celulares do hospedeiro, resultando em uma complexa rede de interações vírus - célula hospedeira, que culmina em um ambiente intracelular adequado a geração e disseminação da progênie viral (JOHNSTON *et al.*, 2003).

Os poxvírus são particularmente habilidosos na micromanipulação das respostas e funções da célula-hospedeira. Essa propriedade é facilitada pelo seu grande genoma, capaz de codificar numerosas proteínas modulatórias, que interagem com diversos mecanismos celulares e modificam os ambientes intra e extracelular das células infectadas. Essa inter-relação, resultado de um processo de co-evolução, torna as interações poxvírus-hospedeiro altamente especializadas e tem importantes conseqüências, tanto para o tropismo viral, quanto com relação à susceptibilidade do hospedeiro à infecção (revisado por McFADDEN, 2005; JOHNSTON *et al.*, 2003).

### **2.1. SINALIZAÇÃO CELULAR:**

Dentre as estratégias empregadas pelos vírus para o controle das funções da célula hospedeira, a sinalização intracelular assume papel extremamente relevante. Várias vias de sinalização, as quais exercem um papel fundamental para o funcionamento celular, são alvos de proteínas codificadas pelos poxvírus (revisado por McFADDEN, 2005).

Os vírus necessitam dispor de estratégias para manter a célula viva e em um estado que suporte a multiplicação viral até a geração da progênie. A manutenção da sobrevivência celular e o estabelecimento de condições permissivas à multiplicação viral podem ser alcançados através da estimulação mitogênica celular. Células estimuladas mitogenicamente são metabolicamente ativas e, portanto, podem aumentar a

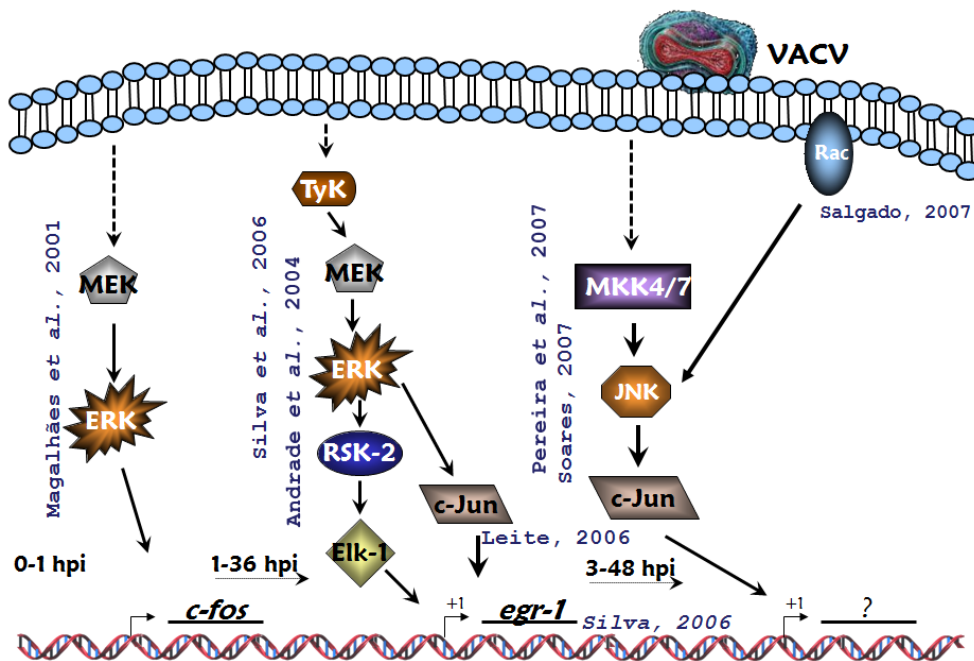
disponibilidade de fatores e precursores metabólicos requeridos pelos vírus para a produção de sua progênie.

Uma característica interessante dos poxvírus é a capacidade que possuem de codificar fatores de crescimento (por exemplo, o VGF – fator de crescimento do *Vaccinia virus*), homólogos a EGF ou VEGF, que atuam de forma parácrina, estimulando mitogenicamente células vizinhas à célula infectada (da FONSECA *et al.*, 1999; revisado por McFADDEN, 2005).

Nesse contexto, as vias de sinalização das proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs) representam um papel central. As MAPKs constituem um sistema sinalizador existente em todos os eucariotos, sendo responsável por controlar processos de proliferação, diferenciação, sobrevivência e apoptose (revisado por KOLCH, 2000). Dessa forma, não é de se estranhar a capacidade que inúmeros vírus possuem de interferir com essas vias durante seu ciclo multiplicativo (BENN & SCHNEIDER, 1994; YANG & GABUZDA, 1999; CHEN *et al.*, 2002; LUO *et al.*, 2002; RAHAUS *et al.*, 2004; FENG *et al.*, 2005; WONG *et al.*, 2005; SHARMA-WALIA *et al.*, 2005).

Estudos realizados pelo nosso grupo demonstraram que a infecção pelo VACV promove a ativação sustentada da via das MAPKs MEK-ERK1/2, levando a expressão dos fatores transcricionais egr-1 e c-fos, e ativação de c-jun (Figura 5). Através de estratégias como o uso de inibidores farmacológicos, dominância-negativa e silenciamento ou nocaute gênico, foi possível determinar que, além de ativadas, estas vias e/ou fatores transcricionais desempenham importantes papéis para a multiplicação do VACV em fibroblastos murinos, uma vez que o bloqueio da atividade de algum de seus componentes provoca uma drástica redução na multiplicação e no fenótipo de placa viral (MAGALHÃES *et al.*, 2001; ANDRADE *et al.*, 2004; LEITE, F.G.G. & BONJARDIM, C.A. – resultados não publicados; BRASIL, B.S.A.F & BONJARDIM, C.A. – resultados não publicados). O CPXV também induz a via MEK/ERK/Egr-1 em cinética muito semelhante à apresentada pelo VACV. Entretanto, para esse vírus, o bloqueio dessa via não tem nenhum efeito, tanto para a multiplicação, quanto para o fenótipo de placa viral (SILVA *et al.*, 2006).

Outro poxvírus, o *Myxoma virus* (MYXV), também leva a ativação de ERK. Entretanto, essa ativação só ocorre em células não permissivas, atuando como limitadora do espectro de hospedeiro, uma vez que culmina com a ativação de IRF-3 e expressão de IFN do tipo I, bloqueando a replicação viral (WANG *et al.*, 2004).



**FIGURA 5:** ATIVAÇÃO DAS MAPKS ERK E JNK APÓS INFECÇÃO PELO VACV

A infecção pelo VACV leva à ativação das vias das MAPKs ERK e JNK de forma sustentada ao longo de seu ciclo de multiplicação. A ativação da via de ERK se inicia em tempos precoces da infecção, e culmina com a expressão/ativação de Elk-1, c-jun, c-fos e egr-1. A ativação da via de JNK ocorre a partir de 3 hpi, se estendendo até tempos tardios de 48 hpi, também levando a ativação de c-JUN. *Ver texto para detalhes.*

A via da MAPK JNK1/2 também vem sendo estudada pelo nosso grupo. Foi demonstrado que a infecção pelo VACV e pelo CPXV ativa a via MKK4/7-JNK1/2, sendo que os níveis de fosforilação de JNK aumentam em tempos tardios da infecção. A ativação da via de JNK pelos dois vírus também culmina com a fosforilação de c-JUN, sendo que, no caso do VACV, a ativação deste fator transcricional é temporalmente regulada por ERK e JNK ao longo do seu ciclo de multiplicação (Figura 5). A ativação da via de JNK, entretanto, não se mostrou relevante para a multiplicação viral, estando envolvida particularmente na regulação da liberação da progênie viral, através de seu envolvimento com componentes do citoesqueleto de actina e microtúbulos (PEREIRA *et al.*, 2012)

Outra via de sinalização que vem atraindo crescente interesse durante a infecção viral é a via de PI3K-Akt. Como a ativação dessa via contribui para prolongar a sobrevivência celular, sua manipulação parece ser uma estratégia comum usada por muitos vírus para regular a apoptose (WANG *et al.*, 2006). Recentemente foi mostrado que o MYXV é capaz de completar seu ciclo em células humanas tumorais, desde que Akt possa ser ativada pela proteína viral M-T5, mostrando um papel para esta via em determinar o sucesso da multiplicação e o tropismo viral (revisado por WERDEN & McFADDEN, 2008). Além disso, foi observado pelo nosso grupo que a inibição farmacológica e/ou genética da via PI3K/Akt leva à apoptose da célula infectada e afeta significativamente a multiplicação do VACV e do CPXV, indicando a manipulação desta via por esses *Orthopoxvirus* para promover a sobrevivência celular (SOARES *et al.*, 2009).

De modo a modular a ativação dessas vias, os poxvírus também expressam inúmeras proteínas modulatórias que atuam coletivamente em uma grande variedade de respostas de defesa antiviral que são disparadas mediante infecção. Estas incluem importantes vias do hospedeiro, como apoptose, indução do estado antiviral pelo IFN, cascatas sinalizadoras induzidas por estresse, apresentação de antígenos pelo MHC e vias pró-inflamatórias (revisado por SEET *et al.*, 2003 e McFADDEN, 2005).

As proteínas A46R, A52R, K1L, N1L e M2L do VACV, por exemplo, suprimem a ativação de NFκ-B (Fator Nuclear κB) e IRF-3 (Fator Regulador de Interferon 3) através da intervenção em diferentes pontos de vias que convergem para a ativação destes fatores transcpcionais. O bloqueio dessas vias sinalizadoras impede a expressão de IFN e outras citocinas pró-inflamatórias (HARTE *et al.*, 2003; DIPERNA *et al.*, 2004; STACK *et al.*, 2005; GEDEY *et al.*, 2006; revisado por BONJARDIM, 2005 e BONJARDIM *et al.*, 2009).

Além de estratégias que inibem a expressão de IFN, os poxvírus também são capazes de impedir a ação destas citocinas. O VACV codifica várias proteínas secretadas que são homólogas a receptores de IFN. Um exemplo é a proteína B18R, que é secretada e se associa à membrana plasmática de células infectadas e não infectadas, onde se liga a moléculas de IFN- $\alpha/\beta$ , bloqueando seus efeitos antivirais (ALCAMÍ *et al.*, 2000; revisado por EVERETT & McFADDEN, 2002). Somado a esse bloqueio extracelular, o VACV também produz duas proteínas intracelulares, E3L e K3L, que impedem a ação de um dos principais efetores do IFN, a proteína cinase R (PKR). PKR é uma cinase que, quando ativada por dsRNA (RNA dupla-fita), fosforila vários substratos, como o fator de iniciação da tradução eIF-2 $\alpha$ , e induz uma repressão generalizada da síntese protéica. Além disso, a indução da apoptose também é uma consequência freqüente da ativação de PKR em células infectadas. A proteína E3L se liga aos intermediários de dsRNA produzidos durante a infecção viral, seqüestrando, deste modo, o ativador de PKR. K3L, por sua vez, atua como um falso substrato de PKR, inibindo competitivamente a fosforilação de eIF-2 $\alpha$ . Assim, a ação dessas proteínas previne a indução do estado antiviral induzido por IFN (revisado por EVERETT & McFADDEN, 2002; DAVE *et al.*, 2006).

Outro evento comum entre os poxvírus é a capacidade de inibir ou retardar o processo apoptótico. As proteínas anti-apoptóticas CrmA e SPI-2, de CPXV e VACV, respectivamente, bloqueiam a ação da caspase 1, caspase 8 e granzima B (revisado por EVERETT & McFADDEN, 2002). Os poxvírus também atuam na inibição da apoptose em nível mitocondrial. A proteína F1L do VACV, por exemplo, atua na membrana da mitocôndria, impedindo a ativação de Bak, uma proteína pró-apoptótica, membro da família Bcl-2. Conseqüentemente, a liberação do citocromo c é impedida, evento essencial para a ativação de caspases efectoras da morte celular. A expressão de F1L se mostrou crucial para a inibição da apoptose após infecção pelo VACV (revisado por TAYLOR & BARRY, 2006).

## **2.2. MODULAÇÃO DO CITOESQUELETO CELULAR:**

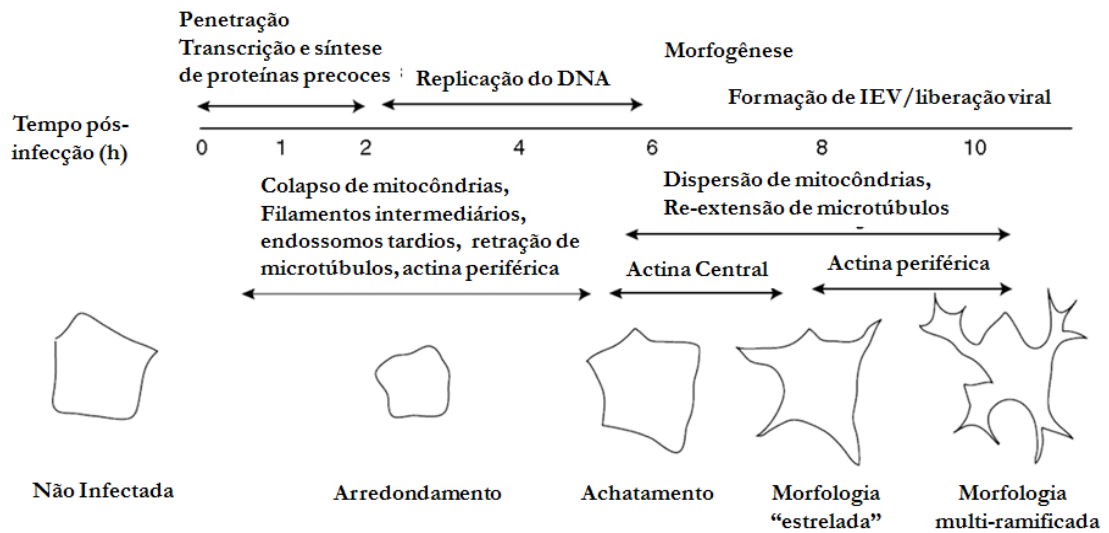
Para coordenar os distintos passos de seu complexo ciclo de multiplicação, os poxvírus não só interferem com diversas vias de transdução de sinal, como foi exemplificado no tópico anterior, mas também interagem constantemente com o citoesqueleto celular.

Essa interação provoca rearranjos no citoesqueleto que acarretam mudanças pronunciadas na morfologia celular, coletivamente chamadas de efeito citopático (ECP). Inicialmente, o ECP era visto como um processo de degeneração gradual da viabilidade, arquitetura e função celulares, como se fosse apenas um “efeito colateral” decorrente da progressão do ciclo de multiplicação viral. Hoje se sabe, no entanto, que as alterações observadas são induzidas pelos poxvírus e desempenham importante papel nas diversas etapas do ciclo de multiplicação viral (revisado por SANDERSON & SMITH, 1999).

A infecção pelo VACV induz um grande número de alterações no citoesqueleto, incluindo: reorganização dos microtúbulos, perda da integridade e função do centrossomo, perda das fibras de *stress* de actina, migração celular, perda de adesão, formação de múltiplas projeções celulares e formação de caudas de actina (revisado por MÜNTER *et al.*, 2006; PEREIRA *et al.*, 2012).

Inicialmente, em etapa precoce da infecção, ocorre um arredondamento celular, acompanhado pelo colapso de filamentos intermediários, mitocôndrias e endossomos tardios ao redor do núcleo, todos dependentes de microtúbulos e da expressão de proteínas virais precoces. Esse arredondamento celular, que é acompanhado pela retração dos microtúbulos, parece facilitar o eficiente acúmulo dos sítios de replicação viral ao redor do núcleo. Concomitantemente, ocorre a perda das fibras de actina, a qual aparece apenas delimitando a periferia celular. Com a progressão do ciclo, e síntese de proteínas tardias, esse fenótipo é revertido. Os microtúbulos se estendem novamente em direção à periferia, e a célula sofre um re-achatamento, adquirindo uma morfologia “estrelada”, seguida da formação de múltiplas projeções ramificadas, que são delimitadas por bordas de actina. Essas alterações finais acompanham a etapa de transporte e liberação dos vírus envelopados da célula (Figura 6) (SCHEPIS *et al.*, 2006; SCHRAMM *et al.*, 2006).

Durante a infecção, a célula também passa por alterações na migração e adesão, observadas em etapa posterior ao arredondamento inicial (SANDERSON & SMITH, 1998; SANDERSON *et al.*, 1998). Esse processo é dependente da proteína viral F11L, que interage e inibe a sinalização da GTPase celular RhoA, induzindo a migração celular (VALDERRAMA *et al.*, 2006). Assim, a modulação do citoesqueleto pelo VACV, além de tornar a disseminação viral mais eficiente através do transporte da progênie para a periferia celular, também o faz por intensificar o contato das células infectadas com as não infectadas, através da indução de migração (revisado por GREBER & WAY, 2006). Outro mecanismo utilizado pelos poxvírus para maximizar a eficiência de disseminação, através da modulação do citoesqueleto, é a indução de caudas de actina. Esse processo exemplifica



**FIGURA 6:** ALTERAÇÕES CELULARES AO LONGO DA INFECÇÃO PELO VACV

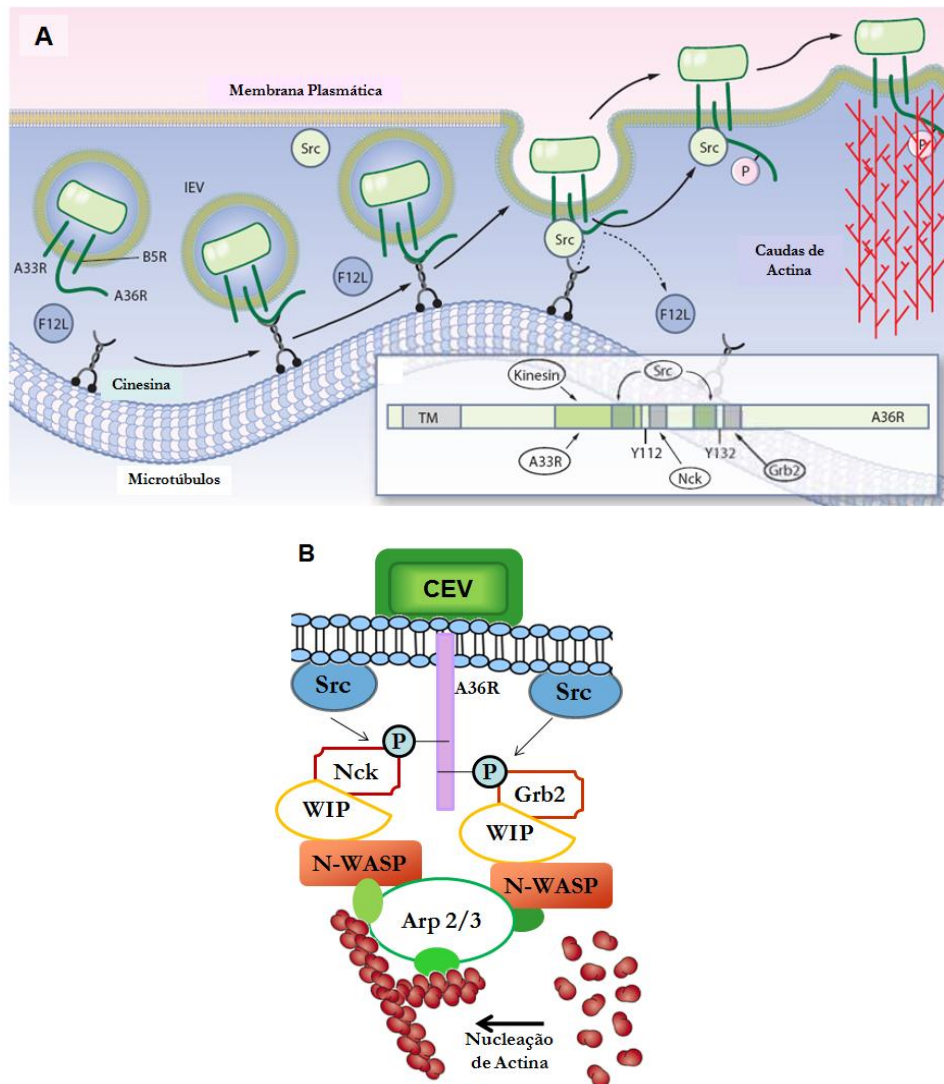
A linha horizontal representa o tempo pós-infecção (MOI 60). As setas duplas acima da linha indicam o início e a duração aproximados das etapas do ciclo de multiplicação viral. Abaixo da linha, as alterações celulares que ocorrem ao longo do ciclo e a duração aproximada de cada uma, indicada por setas duplas. Figuras esquemáticas mostram as mudanças seqüenciais na morfologia celular ao longo do ciclo de multiplicação. *Ver texto para detalhes. (Fonte: Adaptado de SCHEPIS et al., 2006).*

a intrínseca associação existente entre a modulação de componentes do citoesqueleto e sinalização celular. Em linhas gerais, os IEVs são transportados, através dos microtúbulos, dos sítios de envelopamento até a periferia celular. Esse transporte é mediado pela interação da proteína de envelope viral A36R com a cinesina-1, umas das moléculas motoras de microtúbulos. Ao alcançarem a periferia celular, os IEVs se fundem com a membrana plasmática, liberando os CEVs. Essas partículas, então, iniciam uma cascata de sinalização que leva à ativação local de cinases da família Src e Abl, que fosforilam A36R. A fosforilação de A36R induz sua dissociação da cinesina-1 e recrutamento de um complexo de sinalização capaz de estimular a polimerização de actina (Figura 7A). Esse complexo é composto pelas proteínas Nck, Grb2, N-WASP (neural Wiskott-Aldrich syndrome protein) e WIP (WASP-interacting protein), que sinalizam a polimerização de actina, abaixo dos CEVs, através do recrutamento local e ativação do complexo Arp2/3 (actin-related protein 2 e 3) (Figura 7B) (RIETDORF *et al.*, 2001; SCAPLEHORN *et al.*, 2002; WARD & MOSS, 2004; NEWSOME *et al.*, 2006; revisado por MÜNTER *et al.*, 2006).

Por tudo, vemos que a interligação entre as alterações do citoesqueleto, sinalização celular e os distintos passos do ciclo de multiplicação viral representa um sofisticado mecanismo de interação dos poxvírus com suas células hospedeiras para garantir a produção e disseminação de sua progênie.

### **3. PAK1 (p21-ACTIVATED KINASE 1)**

As proteínas cinases ativadas por p21 ou PAKs são serina/treoninas cinases (STKs) associadas às GTPases Rac/Cdc42. Elas foram as primeiras cinases reguladas por GTPases a serem identificadas. Essas proteínas constituem uma importante classe de mediadores da atividade das GTPases Rac e Cdc42, além de já terem sido implicadas em inúmeros outros processos de sinalização intracelular. Em mamíferos existem três isoformas principais, denominadas PAK1, PAK2 e PAK3, sendo PAK1 a mais amplamente estudada (KNAUS & BOKOCH, 1998; revisado por BOKOCH, 2003; ZHAO & MANSER, 2005; ESWARAN *et al.*, 2008).



**FIGURA 7: A INDUÇÃO DE CAUDAS DE ACTINA PELO CEV**

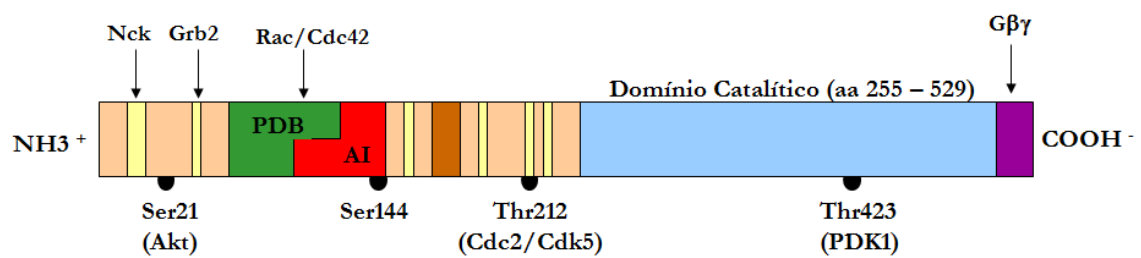
(A) Os IEVs são transportados até a periferia celular através dos microtúbulos, e então, induzem caudas de actina após fusão com a membrana plasmática e geração dos CEVs. Algumas proteínas que participam do processo de transporte e formação de caudas de actina são mostradas. A36R interage diretamente com a cadeia leve da cinesina-1, promovendo o transporte do IEV até a periferia celular. Esse transporte também é dependente da proteína F12L. Na periferia, ocorre a fusão do vírus com a membrana plasmática. Os CEVs liberados disparam sinais dependentes de B5R, induzindo a ativação de Src, que fosforila A36R e provoca sua dissociação da cinesina-1. O acúmulo de A36R fosforilada na membrana plasmática parece ser o sinal para o recrutamento das proteínas responsáveis pela formação da cauda de actina. No canto inferior direito, um modelo de A36R, indicando o domínio transmembrana (TM), os sítios de fosforilação (Tyr<sup>112</sup> e Tyr<sup>132</sup>), e as regiões aproximadas de interação com proteínas virais (A33R) ou celulares (cinesina, Src, Nck e Grb2) (*Fonte: Adaptado de MÜNTER et al., 2006*). (B) A fosforilação de A36R por cinases da família Src leva ao recrutamento de um complexo que consiste nas proteínas adaptadoras Nck, Grb2, WIP e N-WASP, e em seqüência, o complexo Arp2/3, que é ativado e promove a nucleação de actina (*Fonte: Adaptado de SMITH et al., 2003*).

### **3.1. ESTRUTURA, REGULAÇÃO E MECANISMOS DE ATIVAÇÃO DE PAK1:**

A proteína PAK1 possui 545 aminoácidos e massa molecular de 68 kilodaltons. PAK1 contém um domínio regulatório na sua extremidade N-terminal, e um domínio catalítico C-terminal altamente conservado (aa 255-529). No domínio regulatório de PAK1 estão presentes seis motivos de ligação a SH3, que interagem com proteínas adaptadoras, como Nck e Grb2. A ligação das GTPases Rac e Cdc42 ocorre no domínio PBD (domínio de ligação a p21) que engloba os aminoácidos 67-113. PBD se sobrepõe a um segmento autoinibitório (aa 83-149) que forma parte de um mecanismo de inibição que controla a atividade cinase basal de PAK1. Na extremidade C-terminal, existe um sítio de ligação a subunidade  $G_{\beta\gamma}$  das proteínas G heterotríméricas (Figura 8) (revisado por BOKOCH, 2003).

PAK1 existe como um homodímero nas células, em uma conformação de trans-inibição, onde o domínio regulatório N-terminal de uma molécula de PAK1 se liga e inibe o domínio catalítico C-terminal de outra, prevenindo a ativação da atividade cinase (revisado por BAGRODIA & CERIONE, 1999). Dados estruturais e estudos genéticos e bioquímicos suportam um modelo no qual a ligação de GTPases ativas, particularmente, Rac1, Rac2, Rac3 e Cdc42, rompe a dimerização, expondo sítios de fosforilação e rearranjando o sítio ativo de cinase em um estado cataliticamente competente. Um importante sítio de fosforilação é a Thr423, tanto para manter PAK liberado da conformação autoinibitória, quanto para a completa função catalítica sobre seus substratos. Além disso, fosforilação exógena e/ou autofosforilação de sítios adicionais, como a Ser144 e a Ser199, também podem contribuir para a ativação de cinase e/ou manutenção desta atividade. A ligação a GTPases, além de liberar a restrição inibitória imposta ao domínio catalítico, pode atuar também como um mecanismo alostérico para promover eventos de autofosforilação necessários para a eficiente ativação da atividade cinase de PAK1 (CHONG *et al.*, 2001; revisado por BOKOCH, 2003).

Além de Rac e Cdc42, inúmeras outras proteínas também afetam a atividade de PAK, como, por exemplo, PDK1, PKA, PI3K, Akt, Nck e Grb2, fornecendo mecanismos de ativação ou inativação de PAK independentes da ação das GTPases (PAPAKONSTANTI & STOURNARAS, 2002; MENARD & MATTINGLY, 2003; ZHOU *et al.*, 2003; LEISNER *et al.*, 2005; revisado por BOKOCH, 2003 e KUMAR *et al.*, 2006). A interação de PAK1 com as proteínas adaptadoras Nck e Grb2, por exemplo, pode recrutar PAK1 para receptores tirosina-cinases ativados na membrana plasmática, em um ambiente que promove a fosforilação no resíduo crítico da Thr423, resultando na ativação



**FIGURA 8:** *DIAGRAMA ESQUEMÁTICO DAS CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DE PAK1.*

O domínio catalítico está mostrado em azul (aa 255 – 529). Na extremidade C-terminal, em roxo, está o sítio de ligação a  $G\beta\gamma$ . Sítio de ligação a Rac e Cdc42 (PBD), mostrado em verde (aa 67 – 113), sobrepondo-se ao domínio autoinibitório (AI), em vermelho (aa 83 – 149). Segmentos amarelos mostram os motivos de ligação a SH3. Círculos pretos representam importantes sítios de fosforilação (**Fonte:** Modificado de BOKOCH, 2003).

de sua atividade cinase de forma GTPase-independente (LU *et al.*, 1997; PUTO *et al.*, 2003). Além disso, muitos fatores de crescimento estimulam a formação e metabolismo de esfingolipídeos, e PAK1 pode ser diretamente estimulada por esfingosina e lipídeos derivados de esfingosina, através de um mecanismo similar de liberação da conformação de autoinibição. Gangliosídeos e ácidos fosfatídicos também são capazes de estimular a atividade de PAK (revisado por BOKOCH, 2003).

Enfim, a modulação da atividade de PAK1 e/ou moléculas associadas, resultante da fosforilação de vários sítios por outras STKs e tirosinas cinases, pode promover importantes mecanismos para capacitar as células a responder apropriadamente a diferentes estímulos.

### **3.2. BIOLOGIA DE PAK1:**

Tem se tornado cada vez mais evidente que a família de cinases PAK exerce importantes funções na modulação de uma grande variedade de atividades biológicas. Essas ações pleiotrópicas são refletidas pelo grande número de proteínas que podem interagir com PAK, seus inúmeros substratos e diversos estímulos que regulam sua atividade (revisado por BOKOCH, 2003). PAK1 é uma importante reguladora da dinâmica do citoesqueleto e motilidade celular, além de estar implicada na transcrição através das MAPKs, sinais de morte e sobrevivência celular e progressão do ciclo celular (revisado por ZHAO & MANSER, 2005). PAK1, bem como os demais membros da família, tem sido associada a diferentes tipos de câncer, processos inflamatórios e infecções virais, o que é justificado pelas características das atividades biológicas reguladas por essa proteína (Revisado por ESWARAN *et al.*, 2008 e DUMMLER *et al.*, 2009; MOLLI *et al.*, 2009; PACHECO & CHERNOFF, 2010).

#### **3.2.1. Regulação do Citoesqueleto:**

PAK1 desempenha múltiplos e críticos papéis fisiológicos no controle da regulação e organização do citoesqueleto. Além disso, estudos de motilidade celular, neurogênese e angiogênese em mamíferos indicam que PAK1 é um componente crítico destes processos (revisado por BOKOCH, 2003). PAK1 já mostrou exercer regulação tanto positiva, quanto negativa, da migração/motilidade celular. A expressão de mutantes constitutivamente ativos de PAK1, por exemplo, promove a migração celular em colágeno (SELLS *et al.*, 1997, 1999), enquanto que em outros estudos, estes mesmos mutantes inibem a migração em fibronectina (KIOSSES, 1999). Já foi visto também que células nocautes para PAK1

migram mais eficientemente que as células selvagens, característica evidenciada pela formação claramente detectável de lamelipodias (LEISNER *et al.*, 2005; TEN KLOOSTER *et al.*, 2006). Além disso, a atividade cinase de PAK1 é requerida para migração celular direcional, mas não para movimentos celulares randômicos (SELLS *et al.*, 1999; ADAM *et al.*, 2000). PAK1 participa desses processos regulando a reorganização de actina através de vários substratos. A fosforilação de LIMK por PAK1, por exemplo, promove a ativação desta proteína, que, por sua vez, fosforila a cofilina e inativa sua atividade de despolimerização de F-actina. PAK1 também fosforila a subunidade p41-ARC do complexo Arp2/3, estimulando a formação do complexo e a nucleação de actina (VADLAMUDI *et al.*, 2004; revisado por KUMAR *et al.*, 2006). Enfim, PAK1 pode exercer múltiplos efeitos na dinâmica do citoesqueleto de actina, sendo ativada e interagindo com diferentes proteínas e exercendo funções de forma dependente ou independente de sua atividade cinase (FROST *et al.*, 1998; PARRINI *et al.*, 2009).

Além de sua atuação no citoesqueleto de actina, várias linhas de evidência implicam PAK1 como possível reguladora da dinâmica dos microtúbulos, podendo potencialmente coordenar eventos necessários para a divisão celular. Durante a mitose, PAK1 é fosforilada na Thr212, e a fosforilação neste sítio parece modular a interação de PAK1 com várias proteínas associadas e/ou substratos relevantes para as mudanças morfológicas durante as etapas do ciclo celular (THIEL, *et al.*, 2002). Além disso, PAK1 já mostrou estar envolvida em processos de macropinocitose, interagindo e fosforilando a cadeia leve da dineína, uma molécula motora de microtúbulos, regulando a formação de vesículas e transporte intracelular (YANG *et al.*, 2005).

### 3.2.2. *Transdução de Sinais Relacionados à Proliferação e Sobrevivência:*

Vários estudos têm implicado PAK1 em vias sinalizadoras envolvidas em sinais de sobrevivência e proliferação celulares, em particular às vias das MAPKs.

Já foi visto, por exemplo, que PAK1 pode atuar sinergisticamente com Ras para aumentar a transformação celular através da ativação da via da MAPK ERK. A ativação de Ras induz efetivamente a ativação de PAK através de uma via envolvendo PI3K, Rac e Cdc42 e Akt (TANG *et al.*, 1999). A conexão à via de ERK é particularmente interessante, porque PAK1 tem a capacidade de fosforilar tanto a MAPKKK Raf-1 (Ser 338) quanto a MAPKK MEK1 (Ser 298). Embora essas fosforilações não sejam suficientes para ativar Raf ou MEK, elas são requeridas para uma eficiente ativação destas cinases por Ras e Raf,

respectivamente, controlando distintos mecanismos de ativação de ERK em diferentes contextos celulares (HOFMANN *et al.*, 2004; BEESER *et al.*, 2005; PARK, *et al.*, 2007).

Diversos estudos também mostram o envolvimento de PAK1 na ativação das cascatas das cinases ativadas por estresse JNK e p38. Essa ativação ocorre através de sinais vindos de Rac e Cdc42 ou por mecanismos GTPase-independentes, através do recrutamento para a membrana mediado pela proteína adaptadora Nck, o qual também pode ativar a via de ERK (BROWN *et al.*, 1996; LU *et al.*, 1997; LEE *et al.*, 2001; revisado por BOKOCH, 2003).

Os membros da família PAK também participam em vias que promovem eventos tanto apoptóticos quanto anti-apoptóticos (revisado por BOKOCH, 2003). PAK1 estimula sinais de sobrevivência ativados por fatores de crescimento (EGF e PDGF), citocinas e adesão celular. A ativação de Raf-1 na Ser338 por PAK1, por exemplo, capacita sua translocação para a mitocôndria, onde fosforila um membro da família Bcl-2, Bad, na Ser112, como resultado, Bad se dissocia das proteínas anti-apoptóticas Bcl-2/Bcl-xL, que então podem exercer livremente suas funções (SCHURMANN *et al.*, 2000; revisado por BOKOCH, 2003; JIN *et al.*, 2005; YE *et al.*, 2011). Também foi reportado que a atividade de PAK1 é requerida para ativação de NF- $\kappa$ B por Rac1 e Raf-1, e parece ser crucial para a regulação da atividade desse fator transcricional mediante diversos estímulos, constituindo mais um mecanismo capaz de proteger a célula da morte apoptótica (FROST *et al.*, 2000; revisado por KUMAR *et al.*, 2006).

### 3.2.3. Localização Nuclear de PAK1:

A maioria das funções associadas a PAK1, como o rearranjo do citoesqueleto e o envolvimento com outras cascatas sinalizadoras, são eventos primariamente citoplasmáticos. Entretanto, PAK1 também pode exercer funções nucleares, tendo sido identificadas, em seu domínio regulatório, três potenciais seqüências de localização nuclear. A entrada de PAK1 no núcleo parece ser dependente de um sinal ativador, sendo observada em resposta a tratamento com soro ou EGF. Estudo da localização subcelular de PAK1 mostrou uma quantidade apreciável dessa proteína associada com cromatina ativa, e os resultados demonstram que PAK1 se associa diretamente com promotores gênicos e elementos acentuadores específicos, exercendo controle regulatório transcricional positivo ou negativo (SINGH *et al.*, 2005). PAK1 também possui como substratos nucleares vários co-reguladores e fatores transcpcionais, além da histona H3, fosforilando-a em um sítio

requerido para a organização do nucleossomo e compactação do DNA no início da mitose, e ativação transcricional (revisado por KUMAR *et al.*, 2006).

### 3.3. PAK E VÍRUS

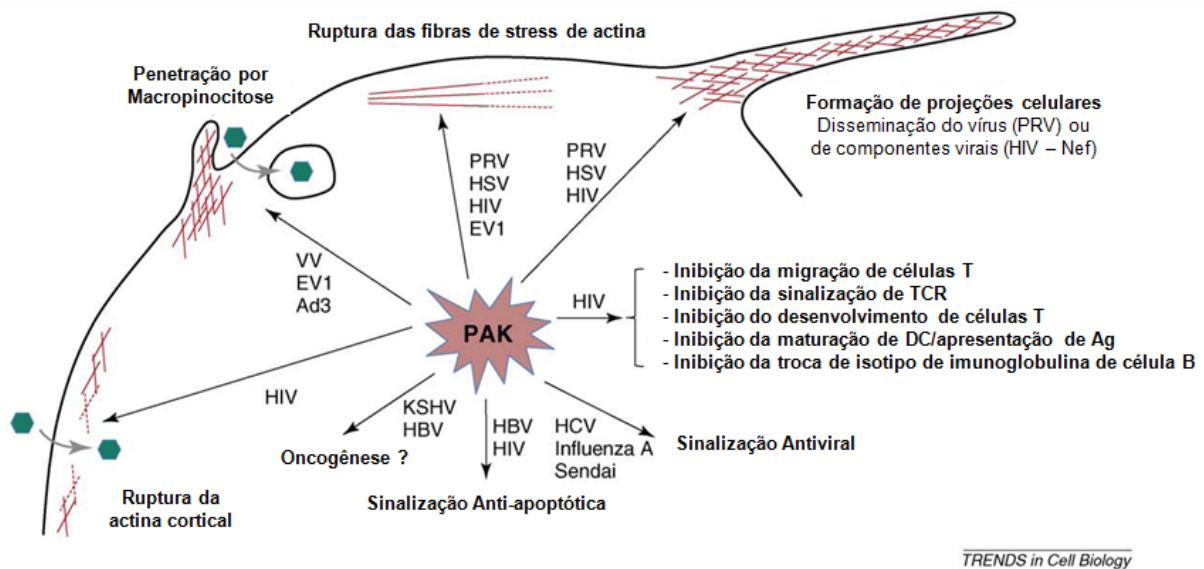
Em decorrência das inúmeras funções exercidas por PAK1, não é de se estranhar o envolvimento desta STK durante a infecção viral. Vários vírus já mostraram usurpar a via de PAK1 para promover a replicação viral (Figura 9) (Revisado por PACHECO & CHERNOFF, 2010 e VAN den BROEKE *et al.*, 2010).

O gene US3 dos *Alphaherpesvirus*, por exemplo, codifica uma STK responsável por mediar alterações no citoesqueleto de actina da célula hospedeira que são essenciais para a disseminação viral, sendo essas alterações dependentes da atividade de PAK1 e PAK2 (MURATA *et al.*, 2000; VAN den BROEKE *et al.*, 2009).

O HIV (vírus da imunodeficiência humana), por sua vez, expressa uma proteína acessória, denominada Nef, que forma um complexo de sinalização que ativa PAK1 induzindo a fosforilação de seus efetores, levando à ativação de JNK e rearranjos do citoesqueleto. Já foi observado que a ausência de PAK1 reduz a quantidade de provírus integrado, indicando possivelmente um bloqueio precoce no processo de replicação. Além disso, a modulação positiva da atividade de PAK por Nef leva a um aumento da infectividade viral, que também pode estar associado às funções anti-apoptóticas exercidas por PAK1 (NUNN *et al.*, 1996; BROWN *et al.*, 1999; FACKLER *et al.*, 2000; WOLF *et al.*, 2001; NGUYEN *et al.*, 2006).

A proteína HBx do HBV (vírus da hepatite B) é outro exemplo de proteína viral que modula vias de sinalização envolvendo PAK1. HBx estimula a translocação mitocondrial de Raf-1 através de mecanismo envolvendo PAK1, já que um requerimento para esta translocação é a fosforilação de Raf-1 na Ser338 por PAK1. Uma vez na mitocôndria, Raf-1 forma um complexo com HBx. O significado dessa interação ainda não foi esclarecido, mas pode atuar reforçando o programa anti-apoptótico nos hepatócitos infectados, contribuindo para a oncogênese hepática associada ao HBV (CHEN & SIDDIQUI, 2007).

Outro exemplo é o *Myxoma virus* (MYXV). Esse membro da família *Poxviridae* necessita da ativação de PAK1 para uma completa e eficiente replicação viral, sendo que a ausência dessa proteína ativa em células permissivas inibe a infecção produtiva desse vírus (JOHNSTON *et al.*, 2003).



TRENDS in Cell Biology

**FIGURA 9:** CONSEQUÊNCIAS DA ATIVAÇÃO DE PAK POR DIFERENTES VÍRUS.

A ativação de PAK por uma grande variedade de vírus pode levar a (i) rearranjos do citoesqueleto, como perda da actina cortical ou das fibras de *stress* de actina, macropinocitose e formação de projeções; (ii) sinalização anti-apoptótica; (iii) oncogênese; (iv) evasão imune e (v) sinalização antiviral. **PAK:** *p21-activated kinase*; **PRV:** *pseudorabies virus*; **HSV:** *herpes simplex virus*; **HIV:** *vírus da imunodeficiência humana*; **EVI:** *echovirus 1*; **HCV:** *vírus da hepatite C*; **KSHV:** *Herpesvirus associado ao Sarcoma de Kaposi*; **HBV:** *vírus da hepatite B*; **VV:** *vaccinia virus*; **Ad3:** *adenovirus 3*; **DC:** *célula dendrítica*; **TCR:** *receptor de células T*. (**Fonte:** Modificado de VAN den BROEKE et al., 2010).

Na contra-mão dessas idéias, alguns trabalhos mostram o envolvimento de PAK1 na resposta celular à infecção. Na infecção pelos vírus Influenza aviário (H7N7), Influenza humano (H1N1) e Sendai, por exemplo, a indução da resposta antiviral pelo IFN tipo I, mediada pela ativação de IRF-3, ocorre através de uma cascata de sinalização envolvendo Rac1 e PAK1 (EHRHARDT *et al.*, 2004). Na infecção pelo HCV (vírus da hepatite C), a ativação de PAK1 através de uma via envolvendo ERK, PI3K e mTOR suprime a replicação viral (ISHIDA *et al.*, 2007).

Assim, através desses exemplos, é possível observar como as inúmeras atividades exercidas por PAK1 conferem a essa STK um grande potencial de envolvimento durante a infecção viral. E neste contexto, PAK1 pode atuar promovendo ou impedindo um ciclo de multiplicação viral bem sucedido.

### 3.3.1. PAK1 e o *Orthopoxvirus* VACV:

Em minha dissertação de mestrado mostramos que PAK1 está envolvida na infecção pelo *Orthopoxvirus* VACV. Foi demonstrado, de forma superficial e preliminar, que esse envolvimento ocorre em etapas tardias da infecção viral, posteriores à geração da progênie, afetando a disseminação dos CEVs por meio das caudas de actina (ANDRADE, 2008).

Além disso, recente estudo demonstrou ainda, que PAK1 é ativado em tempos precoces da infecção pelo VACV, participando da penetração viral por macropinocitose (MERCER & HELENIUS, 2008, revisado por PACHECO & CHERNOFF, 2010 e VAN den BROEKE *et al.*, 2010).

## II. JUSTIFICATIVA:

Os vírus são agentes infecciosos constituídos, basicamente, de uma cápsula protéica, um ácido nucléico, e eventualmente, um envelope externo de natureza lipoprotéica. Essa simplicidade estrutural faz desses microrganismos parasitas intracelulares obrigatórios, necessitando de toda maquinaria energética e biossintética de suas células hospedeiras para a replicação de seu material genético e geração de sua progênie.

Sendo assim, durante a evolução, os vírus adquiriram inúmeros mecanismos para manipular as respostas e funções celulares do hospedeiro, a fim de criarem um ambiente intracelular propício que leve a um ciclo de multiplicação viral completo e eficiente (JOHNSTON *et al.*, 2003).

Uma estratégia amplamente empregada pelos vírus para o controle das funções da célula hospedeira é a intervenção nas vias de transdução de sinal. Essas vias exercem um papel fundamental para o funcionamento celular. Elas são constituídas de moléculas organizadas em cascatas, que recebem, amplificam e distribuem um sinal, extra ou intracelular, gerando múltiplas respostas celulares, tais como: regulação positiva ou negativa da expressão de centenas de genes, regulação de vias metabólicas e modulação da dinâmica do citoesqueleto e motilidade celular (revisado por MÜNTER *et al.*, 2006).

A inter-relação entre os vírus e a rede de sinalização da célula, resultado de um processo de co-evolução, torna as interações vírus-hospedeiro altamente especializadas, e tem importantes conseqüências, tanto para o tropismo viral, quanto com relação à susceptibilidade do hospedeiro à infecção (revisado por McFADDEN, 2005).

Dentre as vias manipuladas pelos vírus para mediar e facilitar o processo infeccioso podemos citar aquelas relacionadas à produção de citocinas, resposta imune do hospedeiro, apoptose e proliferação/diferenciação celulares. Essas últimas, em particular, constituem uma estratégia comumente empregada por muitos vírus, uma vez que, uma condição vital para o sucesso multiplicativo viral é a sobrevivência da célula e a disponibilidade de recursos metabólicos durante o processo infectivo (revisado por McFADDEN, 2005; JOHNSTON *et al.*, 2003). Além disso, a manipulação viral de vias sinalizadoras também pode ter como objetivo a modulação de componentes do citoesqueleto celular, regulando a internalização, o transporte e a liberação de partículas e componentes virais durante a infecção (revisado por GREBER & WAY, 2006 e MÜNTER *et al.*, 2006).

Nosso grupo, especificamente, vem estudando a complexa interação existente entre os poxvírus e suas células hospedeiras. Os membros da família *poxyviridae* produzem uma grande variedade de proteínas de ação modulatória que têm como alvo e manipulam diversas vias de sinalização intracelular. E é essa interação que capacita esses vírus a estabelecerem, em qualquer hospedeiro ou tipo celular, um ciclo de multiplicação produtivo (revisado por WERDEN & McFADDEN, 2008).

Foi demonstrado pelo nosso grupo, por exemplo, que a infecção pelos *Orthopoxvirus Vaccinia e Cowpox* leva a ativação sustentada das vias das MAPKs ERK1/2 e JNK1/2, culminado com a expressão dos fatores transcricionais c-fos, c-jun e egr-1. Essas vias desempenham importantes e distintos papéis na biologia desses dois *Orthopoxvirus*, atuando na geração, morfogênese ou liberação da progênie viral (MAGALHÃES *et al.*, 2001; ANDRADE *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2006; SOARES, 2009; PEREIRA, *et al.*, 2012; LEITE, F.G.G. & BONJARDIM, C.A. – resultados não publicados; BRASIL, B.S.A.F & BONJARDIM, C.A. – resultados não publicados). Além disso, os poxvírus em geral, têm a capacidade de ativar mitogenicamente células quiescentes, prevenir a ativação de cascatas de sinalização pró-inflamatórias, bloquear o estabelecimento de um estado antiviral mediado por interferons e inibir a apoptose através de uma variedade de mecanismos (revisado por EVERETT & McFADDEN, 2002; McFADDEN, 2005; BONJARDIM, 2005 e TAYLOR & BARRY, 2006).

A forma pela qual os poxvírus interagem com suas células hospedeiras, a fim de coordenar os distintos passos do seu complexo ciclo citoplasmático, também leva a mudanças pronunciadas na morfologia celular, coletivamente denominadas de efeito citopático (ECP). Essas mudanças estão correlacionadas com rearranjos do citoesqueleto celular, sendo que, tanto o citoesqueleto de actina, quanto o de microtúbulos, são extensamente modificados. Essas mudanças acompanham os requerimentos dos vários passos do ciclo de multiplicação e são importantes para garantir a geração da progênie, um transporte adequado e uma eficiente disseminação (revisado por GREBER & WAY, 2006; SCHEPIS *et al.*, 2006).

Tendo isso em vista, e com a intenção de caracterizar melhor componentes celulares importantes durante o ciclo de multiplicação do VACV, identificamos na serina/treonina cinase (STK) PAK1 (p21-activated kinase 1) características que a tornaram um interessante alvo a ser investigado. PAK1 está envolvida em inúmeras vias de sinalização que convergem para respostas biológicas que são relevantes durante o ciclo de multiplicação viral. Sua ativação tem como consequência a transmissão de sinais

associados à dinâmica do citoesqueleto e motilidade, regulação da apoptose, sobrevivência celular e progressão do ciclo celular (revisado por BOKOCH, 2003 e ZHAU & MANSER, 2005). Além disso, PAK1 já foi implicada na biologia de vários vírus, incluindo o VACV, para o qual PAK1 mostrou ser requerida para a penetração viral por macropinocitose (MERCER & HELENIUS, 2008, revisado por PACHECO & CHERNOFF, 2010 e VAN den BROEKE *et al.*, 2010).

Em minha dissertação de mestrado constatamos que PAK1 também está envolvida em outras etapas da infecção pelo VACV. Mostramos que a ausência de PAK1 reduz a disseminação viral, afetando, possivelmente, a indução de caudas de actina pelos CEVs (ANDRADE, 2008). Entretanto, os resultados obtidos foram preliminares e superficiais.

Assim, em vista da importância da disseminação das partículas envelopadas extracelulares na biologia dos poxvírus, acreditamos na relevância de estudos mais detalhados que possibilitassem corroborar os dados já obtidos e determinar, de forma mais precisa, o papel desempenhado por PAK1 na biologia do *Orthopoxvirus* VACV.

Dessa forma, pretendemos contribuir para um melhor entendimento da complexa interação existente entre os poxvírus e suas células hospedeiras. Esses estudos, além de revelarem características de funções celulares básicas, da resposta do hospedeiro a infecção e do tropismo viral, contribuem fornecendo informações úteis para a potencial aplicação biotecnológica dos poxvírus como vetores recombinantes ou agentes oncolíticos, bem como para o desenvolvimento de terapias efetivas dirigidas contra alvos celulares (revisado por GREBER & WAY, 2006 e SHEN & NEMUNAITIS, 2005).

### **III. OBJETIVOS:**

#### **1. OBJETIVO GERAL:**

Analisar o papel desempenhado pela serina/treonina cinase PAK1 (p21- activated kinase 1) na disseminação do *Orthopoxvirus Vaccinia*.

#### **2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

1. Verificar a ativação das vias de sinalização celular das MAPKs ERK e JNK em MEFs selvagens e nocautes para PAK1 infectados com VACV;
2. Analisar a expressão gênica viral precoce e tardia em MEFs selvagens e nocautes para PAK1;
3. Realizar cinética da produção de IMVs e EEVs em células nocautes e selvagens para PAK1 infectadas com VACV;
4. Analisar e comparar o fenótipo de placa viral nas células selvagens e nocautes para PAK1, e em células selvagens tratadas com o inibidor de PAK1 IPA-3;
5. Verificar a formação de CEVs e de caudas de actina induzidas pelo VACV, em células nocautes e selvagens para PAK1, através de microscopia de fluorescência e de varredura;
6. Verificar se a proteína viral A36R está sendo fosforilada nos MEFs nocautes para PAK1 através de transferência de Western;
7. Analisar se o complexo Arp2/3 está sendo recrutado para o sítio de polimerização de actina pelos CEVs nos MEFs nocautes para PAK1, através de microscopia confocal;
8. Analisar a localização de p-PAK1 ao longo da infecção de MEFs selvagens com VACV, avaliando se ocorre colocalização de p-PAK1 com CEVs e caudas de actina, através de microscopia confocal;

## **IV. MATERIAIS E MÉTODOS:**

### **1. LINHAGENS CELULARES:**

#### **1.1. CÉLULAS BSC-40 E VERO:**

Células epiteliais BSC-40, gentilmente cedidas pelo Dr. Bernard Moss (National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Bethesda, Maryland, USA) e VERO, obtidas da American Type Culture Collection (ATCC - Maryland, USA), ambas derivadas de rim de macaco verde (*Cercopithecus aethiops*), foram cultivadas em meio mínimo essencial (MEM) autoclavável, suplementado com 6% de soro fetal bovino (SFB) e antibióticos (Gentamicina 40µg/ml, Penicilina 200 U/ml e Anfotericina B 1,5µg/ml). Essas células, assim como as demais utilizadas neste trabalho, foram mantidas a 37°C, sob uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. A linhagem BSC-40 foi utilizada para a produção dos estoques de VACV-WR, bem como para os ensaios de titulação. A linhagem VERO foi utilizada para a produção dos estoques de VACV-F13L-GFP e VACV-ΔTK-GFP.

#### **1.2. CÉLULAS SELVAGENS (WT) E NOCAUTES (PAK1<sup>-/-</sup>) PARA PAK1:**

Fibroblastos embrionários murinos (MEFs) selvagens (WT) e nocautes para PAK1 (PAK1<sup>-/-</sup>) foram gentilmente cedidos pelo Dr. Jonathan Chernoff (Tumor Cell Biology Program, Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, USA). Estas células foram isoladas de embriões de 13,5 dias selvagens ou nocautes para o gene *pak1* e imortalizadas com o antígeno T do vírus SV40. Os MEFs WT e PAK1<sup>-/-</sup> foram cultivados em Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado com 6% de SFB e os antibióticos Gentamicina (40µg/ml) e Penicilina (200 U/ml).

### **2. VÍRUS:**

O vírus VACV-WR (Western Reserve) e o vírus VACV-F13L-GFP (VACV-WR recombinante que possui o gene F13L fundido em fase ao gene da proteína verde fluorescente - GFP) foram gentilmente cedidos pelo Dr. Bernard Moss (National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Bethesda, Maryland, USA). O VACV-ΔTK-GFP (VACV-WR recombinante que possui o cassete de GFP inserido no *locus* do gene TK, sob o controle de um promotor precoce/tardio) foi cedido pelo Dr. Peter C. Turner (College of Medicine, Gainesville, Florida, EUA). Os estoques virais foram obtidos após multiplicação em células VERO ou BSC-40 e purificação em gradiente de sacarose.

### **3. MULTIPLICAÇÃO E PURIFICAÇÃO VIRAL:**

Os estoques virais foram obtidos após infecção e propagação em células VERO ou BSC-40, semeadas em garrafas redondas e mantidas a 37°C em tambor rolante. Ao atingirem aproximadamente 95% de confluência, foram infectadas utilizando-se a MOI (multiplicidade de infecção) de 0,1 UFP (unidades formadoras de placa), em meio MEM sem SFB por 1 hora, para a adsorção do vírus. Após a adsorção foi adicionado meio MEM suplementado com 1% de SFB, sendo as células mantidas a 37°C e monitoradas ao microscópio óptico até o aparecimento de 90% de efeito citopático (ECP). Após o aparecimento do ECP, as células foram lavadas com PBS, desprendidas das garrafas com o auxílio de um bastão de borracha, coletadas, centrifugadas a 2.500 rpm por 15 minutos a 4°C (rotor A384-Sorvall RT6000B) e então congeladas para posterior purificação.

A purificação foi realizada conforme o método descrito por Joklik (1962). Resumidamente, as células coletadas foram lisadas mecanicamente com o auxílio de um “douncer”, em tampão de lise (1mM MgCl<sub>2</sub> - pH 7,6; 10mM Tris-HCl - pH 7,0; 10mM KCl), e centrifugadas a 2.500 rpm por 15 minutos a 4°C (rotor A384-Sorvall RT6000B). O sobrenadante (suspensão viral e restos celulares) foi coletado e centrifugado em colchão de sacarose a 36% a 14.000 rpm (rotor AH 629 Sorvall) por 2 horas a 4°C. O sedimento foi ressuspensionado em tampão 10mM Tris-HCl, pH 8,0, e submetido a sonicação por 2 ciclos de 30 segundos (Sonic Desmembrator-50, Fisher Scientific-USA). A seguir, a suspensão viral foi centrifugada em gradiente de sacarose variando de 25 a 40% a 12.000 rpm por 45 minutos a 4°C (rotor AH 629 Sorvall). A banda inferior, correspondente aos vírus (partículas virais completas e infectivas), foi coletada e centrifugada em tampão 10mM Tris-HCl, pH 8,0 a 20.000 rpm por 1 hora a 4°C (rotor AH 629 Sorvall), para a remoção da sacarose. O sedimento resultante foi então coletado, ressuspensionado no mesmo tampão, aliquotado e congelado a -70°C, para posterior titulação e uso nos diversos experimentos.

### **4. TITULAÇÃO VIRAL:**

A titulação dos estoques de vírus obtidos foi realizada de acordo com o método descrito por Campos e Kroon (1993). Brevemente, células BSC-40 foram semeadas em placas de 6 poços, por 10 a 16 horas, até atingirem aproximadamente 100% de confluência (cerca de  $1,0 \times 10^6$  células/câmara -  $9,6 \text{ cm}^2$ ). Duzentos microlitros de uma série de diferentes diluições, realizadas na razão de 10, da suspensão contendo o vírus a ser titulado, foram inoculados às culturas recém confluídas, sendo uma falsamente infectada,

mantida como controle celular. Após 1 hora de adsorção, foi adicionado meio contendo 1% de SFB. A revelação foi realizada 48 horas pós-infecção através da fixação das culturas com formaldeído a 3,7% em água destilada, por 30 minutos, e coloração com solução 1% (p/v) de cristal violeta em álcool a 20%, por 15 minutos. As diluições contendo entre 30 e 300 placas de lise foram utilizadas para determinação do número de UFP/ml de estoque.

## **5. DROGAS E ANTICORPOS:**

Para os ensaios de transferência de *Western* e imunofluorescência foram utilizadas as seguintes drogas e anticorpos: anti-fosfo-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204), anti-fosfo-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185), anti-PAK1, anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase (Cell Signaling Technology - Beverly, MA, USA), anti- $\beta$ -actina, anti-IgG de camundongo conjugado a peroxidase (Sigma-Aldrich Co – St. Louis, MO, USA), anti-Arp2, anti-fosfo-PAK1 (Thr 423) (Santa Cruz Biotechnology – Santa Cruz, CA, USA), anti-B5R, anti-D8L, anti-Crma, anti-A36R (gentilmente cedido pelo Dr. Bernad Moss – National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Bethesda, Maryland, USA), anti-fosfo-tirosina, anti-IgG de coelho conjugado a FITC, anti-IgG de camundongo conjugado a AlexaFluor 488, anti-IgG de camundongo ou coelho conjugado a rodamina, Faloidina conjugada a rodamina (Molecular Probes – Invitrogen – California, USA) e DAPI (Sigma-Aldrich Co - St. Louis, MO, USA). O anticorpo monoclonal 7D11 contra a proteína viral L1R (gentilmente cedido pelo Dr. Bernad Moss – National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Bethesda, Maryland, USA), foi utilizado nos ensaios para titulação do EEV (WOLFFE *et al.*, 1995). O inibidor de PAK1, IPA-3 (Sigma-Aldrich Co - St. Louis, MO, USA), foi utilizado em ensaios de fenótipo de placa.

## **6. ANÁLISE DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO E EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS VIRAIS:**

### **6.1. INFEÇÃO:**

MEFs WT e PAK1<sup>-/-</sup> foram semeados em frascos de 25 cm<sup>2</sup>, e ao atingirem cerca de 90% de confluência, foram infectados com o VACV a MOI de 5 em meio sem SFB por 1h para a adsorção viral. Após esse tempo, DMEM contendo 0,5% de SFB foi adicionado e as células incubadas por tempos variando de 5 minutos a 36 horas.

## **6.2. EXTRAÇÃO DE PROTEÍNAS TOTAIS:**

Após o tempo de infecção as células foram lavadas duas vezes com PBS gelado, adicionando-se, posteriormente, 150µl/frasco de solução de lise [1% Triton X-100; 100mM Tris-HCl pH 8,0; 0,2 mM EDTA; 20% v/v glicerol; 200 mM NaCl; 1mM vanadato de sódio; 1mM PMSF (fenilmetilsulfonilfluoreto); 5µg/ml aprotinina; 2,5µg/ml leupeptina; 1mM DTT (1,4-Ditiotreitol); 50mM NaF]. As células foram mantidas em repouso, no gelo, por 30 minutos, e então, raspadas, ressuspendidas e coletadas em tubos de 1,5 ml. O lisado foi clarificado dos restos celulares através de centrifugação a 13.500 rpm por 20 minutos a 4°C em microcentrífuga (Eppendorf 5417R).

O sobrenadante foi coletado e a concentração das proteínas totais determinada por espectrofotometria através do “Kit Bio-Rad Assay” (Bio-Rad Laboratories, USA). Os extratos protéicos foram então, alíquotados e mantidos a -70°C.

## **6.3. TRANSFERÊNCIA DE “WESTERN”:**

Tampão LB [Tris-HCl 0,5M (pH 6,8), 5% β-mercaptoetanol, 0,1% (p/v) azul de bromofenol, 20% (v/v) glicerol] foi adicionado a alíquotas de 30 µg/amostra das proteínas totais, que foram então, fervidas por cinco minutos a 99°C. As amostras foram submetidas a fracionamento em gel de poliacrilamida/SDS (PAGE) 10% a 100 Volts por aproximadamente 2 horas. A seguir, foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, (Hybond ECL™ - GE Healthcare), conforme protocolo do "Kit Bio-Rad Transferency" (Bio-Rad Laboratories, USA). Após transferência, as membranas foram coradas com “Ponceau” a 1% para visualização da eficiência da mesma, além da informação sobre a equivalência das quantidades de proteínas aplicadas nas diferentes canaletas. As membranas foram bloqueadas por 16 horas a 4°C ou 1 hora a temperatura ambiente, utilizando-se PBS/Tween 0,1% contendo 5% (p/v) de leite em pó desnatado. A seguir, as membranas foram lavadas 3 vezes em PBS/Tween 0,1% e incubadas com anticorpos primários por 24 a 48 horas, a 4°C, na diluição recomendada pelo fabricante, em PBS/Tween 0,1% contendo 5% (p/v) de albumina sérica bovina (BSA). As membranas foram novamente lavadas 3 vezes em PBS/Tween 0,1% e incubadas por 1 hora, a temperatura ambiente, com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase, na diluição recomendada pelo fabricante, em PBS/Tween 0,1%, contendo 5% de leite em pó desnatado. Após nova e última seção de lavagens em PBS/Tween 0,1%, as membranas foram incubadas com solução reveladora ECL™ ou ECL Plus™ (GE Healthcare) por 5

minutos, expostas contra filme de raios-X (Hyperfilm ECL™ - GE Healthcare), que foram revelados utilizando-se revelador e fixador (Kodak), de acordo com indicações do fabricante. As membranas reutilizadas para sondagem com diferentes anticorpos foram incubadas com o tampão de remoção (100mM β-mercaptoetanol; 2% SDS; 62,5 mM Tris-HCl pH 6,8) durante 30 minutos a 56°C. Após esse tempo foram lavadas durante 15 minutos, por 5 vezes em PBS/Tween 0,1%, coradas novamente com “ponceau” 1%, bloqueadas e incubadas com os anticorpos como descrito acima. As análises densitométricas das bandas foram realizadas através do programa LabImage 2.7.2.

## **7. CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE IMVs E EEVs:**

### **7.1. INFECÇÃO:**

MEFs WT e PAK1<sup>-/-</sup> foram semeados em placas de 6 poços (9,6 cm<sup>2</sup>) e infectados com VACV-WR. Foram realizadas infecções a MOI 5, para a análise da produção viral em si, através da construção de curvas de ciclo único; e a MOI 0,001, para análise da produção viral considerando-se a capacidade de disseminação da progênie. Após 1 hora de adsorção, o meio contendo o inóculo viral foi retirado, a monocamada lavada 2 vezes com DMEM, para a retirada dos vírus que não adsorveram, e 1 ml de DMEM, contendo 0,5% de SFB, foi adicionado. Após diferentes tempos, variando de 3 a 48 horas para infecção a MOI 5, e de 3 a 96 horas para a infecção a MOI 0,01, foi realizada a titulação dos IMVs e EEVs.

### **7.2. TITULAÇÃO DOS EEVs:**

Após os tempos de infecção, o sobrenadante da monocamada de células infectadas (contendo as partículas envelopadas extracelulares – EEVs) foi coletado e centrifugado a 2.000 rpm em microcentrífuga (Eppendorf 5417R) por 2 minutos, para a sedimentação de células desprendidas da monocamada. O sobrenadante foi incubado com 1μl do anticorpo monoclonal 7D11 por 1h, a 37°C, sob agitação. Esse anticorpo reconhece a proteína L1 presente na superfície dos IMVs, neutralizando-os e permitindo a titulação exclusivamente das partículas envelopadas (WOLFFE *et al.*, 1995). Após o período de incubação, o sobrenadante foi serialmente diluído, na razão 10, e titulado em células BSC-40 conforme o item IV.4.

### **7.3. TITULAÇÃO DOS IMVs:**

A monocamada de células infectadas foi raspada em 1 ml de PBS, coletada e adicionada ao sedimento resultante do procedimento descrito no item IV.6.2. Foram realizados 3 ciclos de congelamento e descongelamento, para a lise celular e liberação dos

IMVs. O lisado foi clarificado por centrifugação a 2.000 rpm em microcentrífuga (Eppendorf 5417R), por 2 minutos, a 4°C. O sobrenadante, contendo os IMVs foi então serialmente diluído, e os títulos virais determinados em células BSC-40 de acordo com a técnica descrita no item IV.4.

## **8. FENÓTIPO DE PLACA VIRAL:**

MEFs WT e PAK1<sup>-/-</sup> foram semeados em placas de 6 (9,6 cm<sup>2</sup>) ou 12 (3,8 cm<sup>2</sup>) poços, e ao atingirem uma confluência de cerca de 90%, foram infectados a MOI 0,001 ou com 200 µl de diluições de VACV, contendo 50 ou 500 UFP. Após o período de 1 hora de adsorção, foram adicionados 2 ml de DMEM. Após tempos variando de 12 a 96 horas pós-infecção a monocamada celular foi fixada com formaldeído a 3,7% em água destilada e corada com solução de cristal violeta a 1% (p/v) em álcool a 20%.

## **9. MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA E CONFOCAL:**

Essa técnica foi utilizada para a análise de expressão gênica viral precoce como medida indireta da penetração viral através da infecção com o VACV-ΔTK-GFP; para análise da disseminação nas placas virais através da infecção com o VACV-ΔTK-GFP e com o VACV-F13L-GFP; bem como para as análises da liberação de CEVs, formação de caudas de actina e colocalização de p-PAK1 e ARP2 com caudas de actina e CEVs.

MEFs WT e PAK1<sup>-/-</sup> foram implantados em lamínulas de 12 mm de diâmetro (Perfecta - BR) inseridas em placas de 24 poços (1,9 cm<sup>2</sup>). As células foram infectadas com VACV-WR, VACV-ΔTK-GFP ou VACV-F13-GFP a MOI 5, 0,001, ou falsamente infectadas (mock). Após 1 hora de adsorção, o meio contendo o inóculo viral foi retirado, a monocamada lavada 2 vezes com DMEM, para a retirada dos vírus que não adsorveram, e 1 ml de DMEM, contendo 0,5% de SFB, foi adicionado. Após diferentes tempos, variando de 30 minutos a 48 horas, as células foram lavadas 2 vezes com PBS, fixadas com paraformaldeído a 4% por 10 minutos, permeabilizadas com Triton X-100 a 0,2% em PBS/BSA a 3%, por 5 minutos, e bloqueadas com SFB a 2%, em PBS/BSA a 3%, durante 30 minutos. Em seguida, as células foram lavadas 3 vezes com PBS e as lamínulas transferidas para uma câmara úmida. As células foram incubadas com anticorpos primários durante 50 minutos a temperatura ambiente, lavadas 3 vezes com PBS e incubadas com os anticorpos secundários e/ou Faloidina conjugada a rodamina por 30 minutos a temperatura ambiente. A seguir, após nova sessão de lavagens, as células foram incubadas com DAPI

[Bisbenzimidazole (100 mg/ml)], diluted in PBS/Triton at 0,2%, during 10 minutes. The cells were then again washed 3 times with PBS and the slides mounted on glass slides using a drop of Mowiol (Sigma-Aldrich Co - St. Louis, MO, USA). The cells were analyzed by confocal ZEISS [Laser Scanning Microscope (LSM) 510 META], do Centro de Microscopia Eletrônica do ICB (CEMEL – ICB - UFMG). Representative images of the analyzed fields were obtained and processed through the ZEISS, LSM 510 software.

## **10. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA:**

MEFs WT e PAK1<sup>-/-</sup> were implanted on 12 mm diameter slides (Perfecta - BR) inserted in 24 wells (1,9 cm<sup>2</sup>) and infected with VACV-WR at MOI of 5, or mock-infected (mock). After 1 hour of adsorption, the medium containing the viral inoculum was removed, the monolayer washed 2 times with DMEM, for the removal of viruses that did not adsorb, and 1 ml of DMEM, containing 0,5% of SFB, was added. After 12 hours, the cells were fixed with Glutaraldehyde (Grade 1) at 2,5% in 0,1M phosphate buffer (pH 7,4) for 1h at 4°C, washed 3 times with 0,1M phosphate buffer and post-fixed with osmium tetroxide at 1% in 0,1M phosphate buffer for 1h at 4°C. Three washes of 5 minutes in 0,1M phosphate buffer were performed, and then the samples were dehydrated in ethanol series from 50 to 100% and passed through the critical point of CO<sub>2</sub> (BALZERS - modelo CPD-020 / Centro de Microscopia Eletrônica do ICB – CEMEL), for complete drying of the sample. The slides were mounted on stubs, and sputter-coated with gold in a sputter-coater (EDWARDS SCANCOAT SIX), do Laboratório de Microanálises (Departamento de Física - ICEX/UFMG). The material was sputter-coated for 90 seconds, under a current of 40 mA and at a distance of approximately 3 cm from the gold plate (estimated coating thickness of 22,5 nm). The samples were visualized by Scanning Electron Microscopy with secondary electron emission mode (Quanta 200 - FEG - FEI / 2006) do Centro de Microscopia da UFMG. Images were captured using the following parameters: focal distance: 45 to 15 mm; voltage: 15 kV; and magnification: 500 to 200000x. The images obtained were edited with the Adobe Photoshop 7.0.1 software.

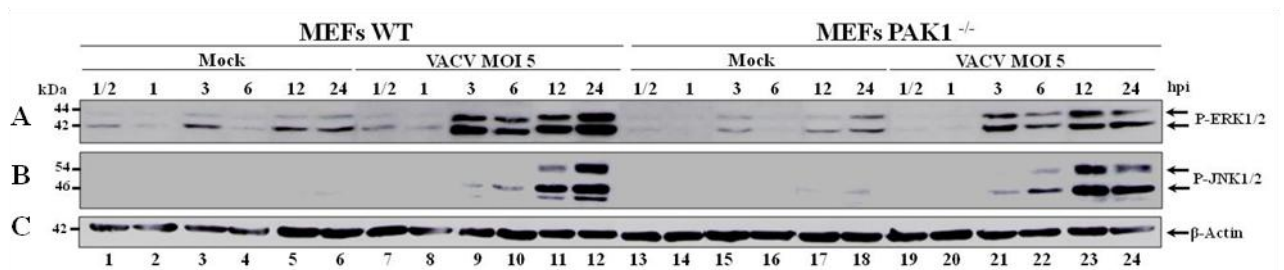
## V. RESULTADOS:

### 1. CINÉTICA DE FOSFORILAÇÃO DAS MAPKS JNK1/2 E ERK1/2 NOS MEFs WT E PAK1<sup>-/-</sup> APÓS INFECÇÃO COM VACV.

Nos últimos anos, estudos desenvolvidos pelo Grupo de Transdução de Sinal (GTS), demonstraram que a infecção pelo vírus VACV ativa de forma sustentada as vias das MAPKs durante a infecção. Foi demonstrado que a via MKK4/7-JNK1/2 é ativada a partir de 3 hpi, atingindo um pico de fosforilação de JNK1/2 em tempos tardios de 24 a 48 hpi (PEREIRA *et al.*, 2012; SOARES, 2007). A via MEK-ERK1/2 também é ativada após infecção pelo VACV, sendo que a fosforilação de ERK1/2 se inicia em tempos precoces de 5 minutos, atingindo seu pico em 24 hpi (MAGALHÃES *et al.*, 2001; ANDRADE *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2006).

Tendo isto em vista, juntamente com o fato de PAK1, uma vez ativa, ser capaz de transduzir sinais tanto à via de JNK quanto à via de ERK (revisado por BOKOCH, 2003), investigamos se esta STK estaria participando da cascata de ativação destas MAPKs após a infecção viral. Para isso, fibroblastos embrionários murinos (MEFs) selvagens (WT) e nocautes (PAK1<sup>-/-</sup>) para PAK1 foram infectados com VACV a MOI 5 por tempos variando de 30 minutos a 24 hpi. Extratos protéicos totais dessas células foram submetidos à transferência de “Western” e sondados com anticorpos fosfo-específicos para JNK1/2 ou ERK1/2.

Foi possível observar que após a infecção pelo VACV ocorre fosforilação de JNK e ERK nos MEFs WT e PAK1<sup>-/-</sup> em cinética semelhante à anteriormente observada pelo nosso grupo (Figura 10). Nota-se uma sutil redução nos níveis de fosforilação de ERK1/2 nos MEFs PAK1<sup>-/-</sup> em todos os tempos analisados (Figura 10A), diferença que não foi claramente observada para JNK1/2 (Figura 10B).



**FIGURA 10:** CINÉTICA DE FOSFORILAÇÃO DE ERK1/2 E JNK1/2 NOS MEFs WT E PAK1<sup>-/-</sup> APÓS INFECÇÃO PELO VACV.

Transferência de “Western” de 30 µg de extrato protéico total de MEFs WT ou PAK1<sup>-/-</sup>, infectados, pelos tempos indicados, com VACV a MOI 5 (canaletas 7 a 12 e 19 a 24), ou falsamente infectados (Mocks – canaletas 1 a 6 e 13 a 18). As membranas foram sondadas com anticorpo anti-fosfo-ERK1/2 (A), anti-fosfo-JNK1/2 (B) e com anti-β-actina (C), para normalização da quantidade de proteínas aplicadas em cada canaleta. A massa molecular das proteínas está indicada à esquerda em kilodaltons (kDa). Gel representativo de experimentos independentes (n = 3).

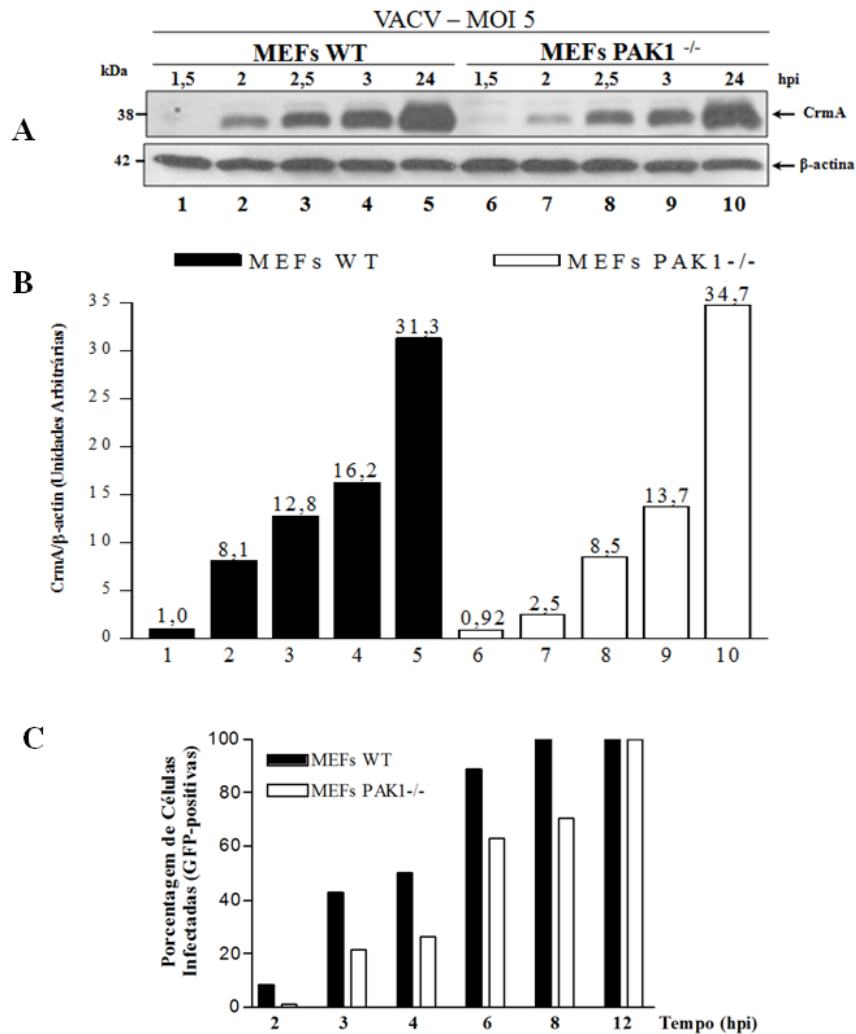
## 2. EXPRESSÃO GÊNICA VIRAL NOS MEFs WT E PAK1<sup>-/-</sup>.

Partimos para a análise de diferentes etapas do ciclo de multiplicação do VACV, a fim de determinar em qual delas PAK1 estaria exercendo um papel predominante. Iniciamos pela análise da expressão gênica viral precoce, que também fornece informação, de forma indireta, sobre a penetração viral.

Para isso, MEFs WT e PAK1<sup>-/-</sup> foram infectados com VACV a MOI 5 por tempos precoces, e extratos protéicos totais dessas células foram submetidos à transferência de “Western” e sondados com anticorpo anti a proteína precoce viral CrmA. Observamos que o nível de expressão dessa proteína nos MEFs WT é cerca de 3 vezes mais intenso que nos MEFs PAK1<sup>-/-</sup> em 2hpi (Figura 11A e 11B). Entretanto, essa diferença reduz gradativamente, até não ser mais observada.

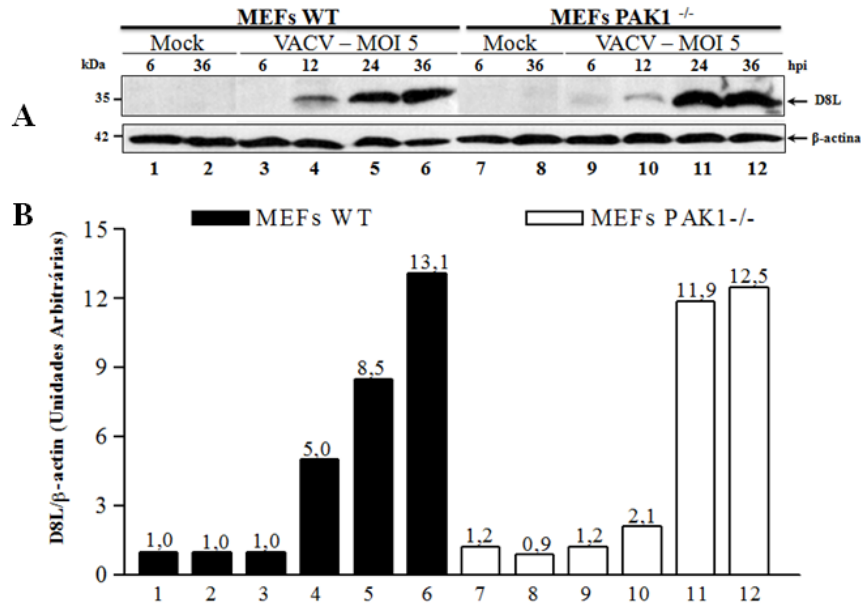
A fim de corroborar esse dado, realizamos análise semelhante por microscopia de fluorescência. MEFs WT e PAK1<sup>-/-</sup> foram infectados com VACV- $\Delta$ TK-GFP, a MOI 5, por tempos variando de 2 a 12 horas. A porcentagem de células GFP-positivas, ou seja, células nas quais os vírus penetraram e iniciaram a expressão gênica precoce, foi determinada em cada tempo analisado. Foi possível observar que nos MEFs PAK1<sup>-/-</sup> a porcentagem de células expressando GFP é bem reduzida em relação à observada nos MEFs WT nos tempos iniciais de 2 a 4 hpi. Essa diferença se reduz gradativamente, até não ser mais observada no tempo de 12 hpi (Figura 11C). Esse resultado reflete um possível atraso na penetração viral, que, entretanto, é revertido ao longo do tempo.

A seguir, analisamos a expressão gênica tardia viral. Para tal, MEFs WT e PAK1<sup>-/-</sup> foram infectados com VACV a MOI 5 por tempos variando de 6 a 36 horas, e extratos protéicos totais dessas células foram submetidos à transferência de “Western” e sondados com anticorpo anti a proteína tardia viral D8L. Nenhuma diferença significativa nos níveis de expressão dessa proteína foi observada entre os MEFs WT e PAK1<sup>-/-</sup> (Figura 12A e 12B).



**FIGURA 11:** EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS VIRAIS PRECOSES.

(A) Transferência de “Western” de 30µg de extrato protéico total de MEFs WT ou PAK1<sup>-/-</sup> semeados e infectados, pelos tempos indicados, com VACV-WR a MOI 5. As membranas foram sondadas com anticorpo anti a proteína precoce viral CrmA e, posteriormente, com anti-β-actina, para normalização da quantidade de proteínas aplicadas em cada canaleta. Massa molecular das proteínas indicada à esquerda em kilodaltons (kDa). (B) Gráfico representando a razão CrmA/β-actina, obtida através da análise densitométrica das bandas. Gel representativo de experimentos independentes (n = 2). (C) MEFs WT ou PAK1<sup>-/-</sup> foram semeados sobre lamínulas e infectados com VACV-ΔTK-GFP a MOI 5 pelos tempos indicados. As células foram fixadas, permeabilizadas e incubadas com DAPI para marcação do núcleo. As lamínulas foram montadas em lâminas de vidro utilizando-se Mowiol e a porcentagem de células infectadas (GFP-positivas) foi determinada através da contagem de pelo menos 200 células por lamínula em microscópio laser confocal ZEISS – LSM 510 META.



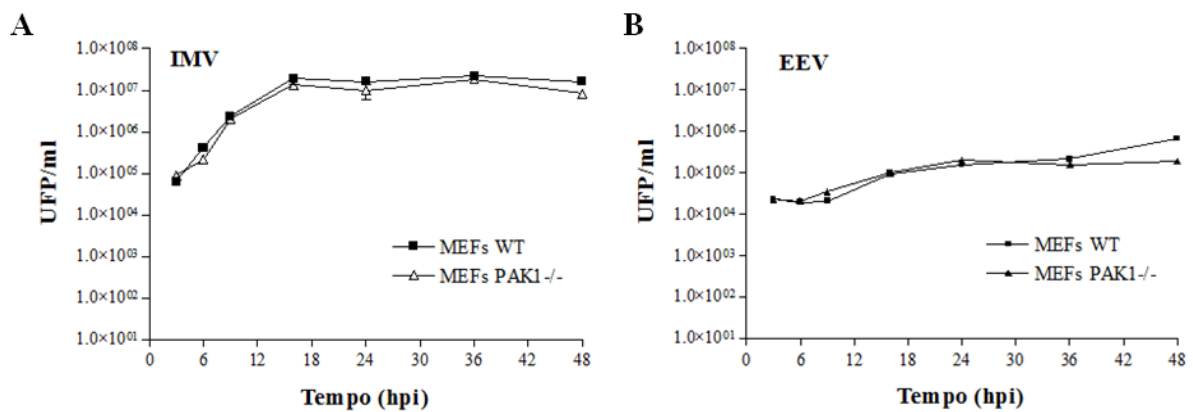
**FIGURA 12:** EXPRESSÃO DE PROTEÍNA VIRAL TARDIA.

(A) Transferência de “Western” de 30µg de extrato protéico total de MEFs WT ou PAK1<sup>-/-</sup> semeados e infectados, pelos tempos indicados, com VACV-WR a MOI 5. As membranas foram sondadas com anticorpo anti a proteína tardia viral D8L e, posteriormente, com anti-β-actina, para normalização da quantidade de proteínas aplicadas em cada canaleta. Massa molecular das proteínas indicada à esquerda em kilodaltons (kDa). (B) Gráfico representando a razão D8L/β-actina, obtida através da análise densitométrica das bandas. Gel representativo de experimentos independentes (n = 2).

### **3. CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE IMVs E EEVs NOS MEFs WT E PAK1<sup>-/-</sup> INFECTADOS COM VACV.**

Partimos para a análise da produção viral nos MEFs. Para isso, MEFs WT e PAK1<sup>-/-</sup> foram infectados com VACV a MOI 5, por tempos variando de 3 a 48h, para a construção de uma curva de produção viral em ciclo único. A monocamada de células e o sobrenadante foram processados para a titulação dos IMVs e EEVs, respectivamente.

Foi possível observar que durante todo o ciclo de multiplicação viral a quantidade de IMVs (Figura 13A) e EEVs (Figura 13B) formados foi equivalente nos MEFs WT e PAK1<sup>-/-</sup>. Esses resultados evidenciam que a ausência de PAK1 não afeta a multiplicação viral (produção de IMVs) e nem a geração e liberação de EEVs.



**FIGURA 13:** A AUSÊNCIA DE PAK1 NÃO TEM IMPACTO NA MULTIPLICAÇÃO DO VACV.

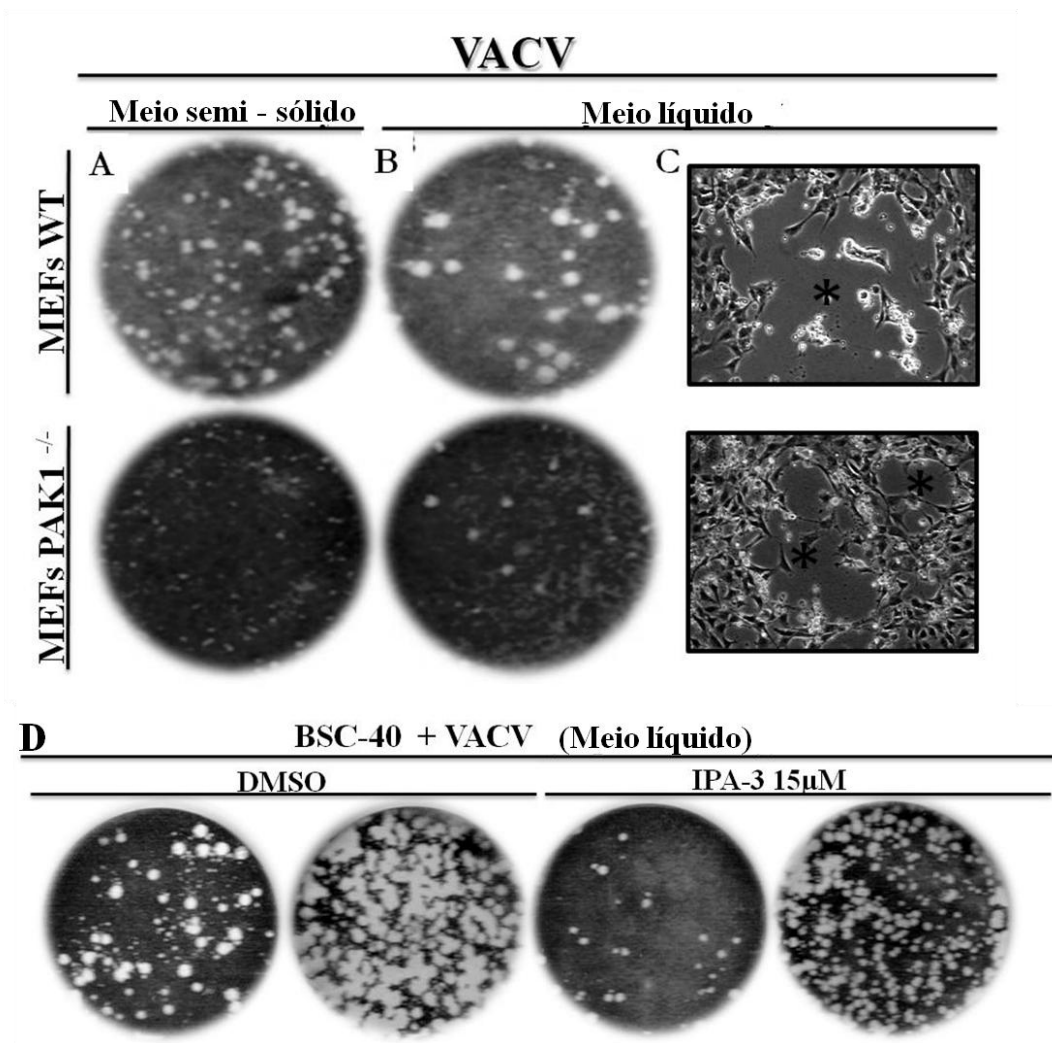
MEFs WT ou PAK1<sup>-/-</sup> foram semeados e infectados com VACV-WR a MOI 5 e após 3, 6, 9, 16, 24, 36 e 48 horas, a monocamada de células (A) e o sobrenadante (B) foram processados para titulação dos IMVs e EEVs, respectivamente. Os tempos de 16 e 24 horas foram realizados em triplicata. As titulações foram realizadas em células BSC-40 e o título determinado em UFP/ml. Resultado representativo de experimentos independentes (n = 3).

#### **4. FENÓTIPO DA PLACA VIRAL NOS MEFs WT E PAK1<sup>-/-</sup>.**

Para avaliar se a ausência de PAK1 traria conseqüências para etapas posteriores a produção viral, afetando de alguma forma a biologia do VACV, foi feita a análise do fenótipo da placa viral formada. Para isso, MEFs WT ou PAK1<sup>-/-</sup> foram infectados com diluições seriadas de VACV. Após 48 horas, as células foram fixadas com formolaldeído e coradas com cristal violeta, permitindo assim a visualização macroscópica do tamanho das placas virais formadas.

Como podemos verificar na Figura 14, o tamanho das placas do VACV foi drasticamente reduzido nos MEFs PAK1<sup>-/-</sup> (Figura 14A, 14B e 14C). O mesmo foi observado em células BSC-40 tratadas com o inibidor de PAK IPA-3 (Figura 14D).

Esses resultados indicam que a ausência de PAK1 afeta direta ou indiretamente a disseminação das formas envelopadas do VACV, que são as responsáveis pela geração da placa viral.



**FIGURA 14:** A AUSÊNCIA DE *PAK1* PROVOCA UMA REDUÇÃO NO TAMANHO DA PLACA VIRAL. (A - C) MIEFs WT and *PAK1*<sup>-/-</sup> foram infectados com diluições seriadas de VACV-WR por 48h em meio semi-sólido (A) ou meio líquido (B e C), fixadas e coradas com cristal violeta. (D) Células BSC-40 foram pré-tratadas com DMSO ou IPA-3 15µM, e infectadas com diluições seriadas de VACV-WR, em meio líquido, fixadas e coradas com cristal violeta.

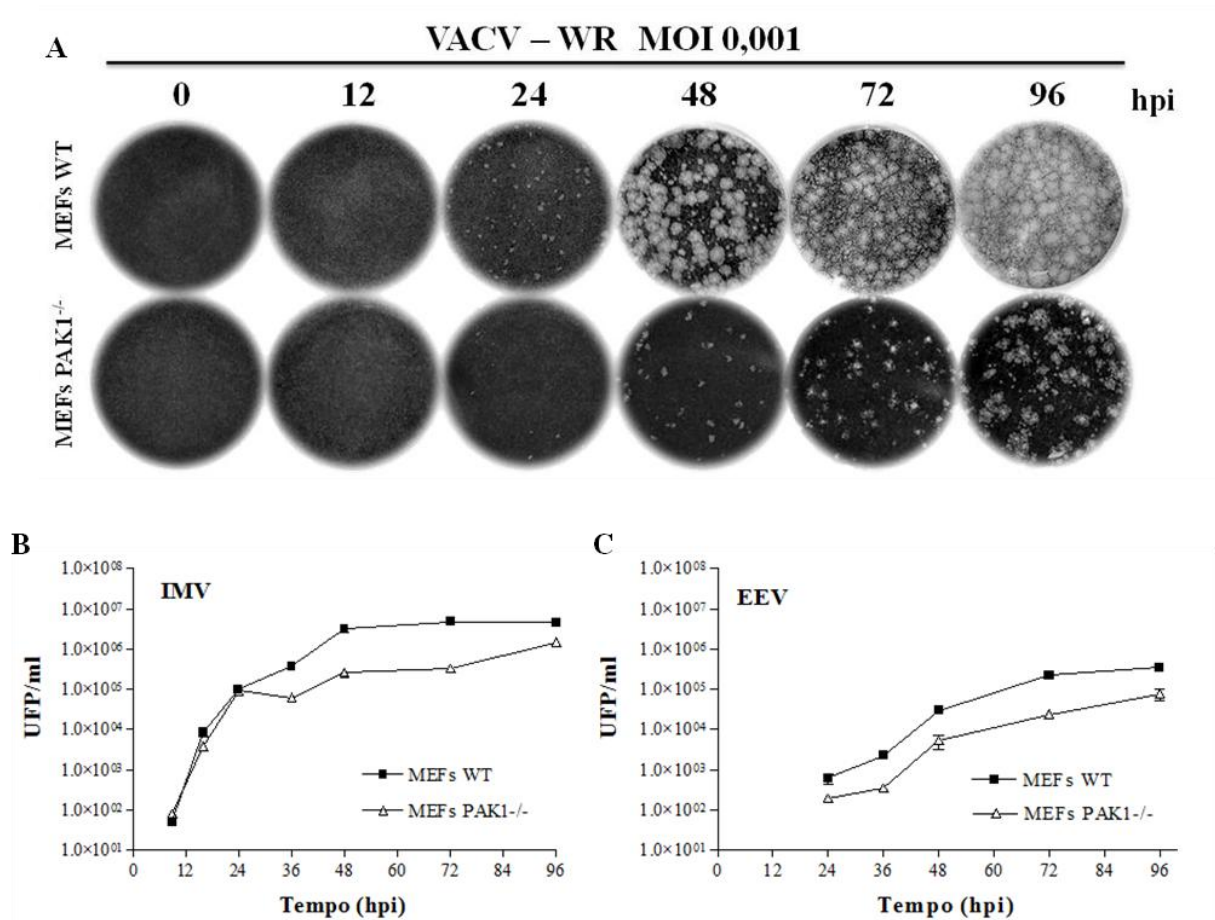
## 5. DISSEMINAÇÃO DO VACV NOS MEFs WT E PAK1<sup>-/-</sup>.

Até aqui observamos que nos MEFs PAK1<sup>-/-</sup> o fenótipo de placa é reduzido, porém, essa redução não é decorrente de problemas na penetração, expressão gênica, multiplicação ou transporte viral, uma vez que a produção de IMVs e EEVs ocorre nos MEFs PAK1<sup>-/-</sup> na mesma magnitude que nos MEFs WT. Isso sugere que a ausência de PAK1 esteja afetando a disseminação da progênie viral por meio dos CEVs.

Para obter mais informações nesse sentido, inicialmente, realizamos um ensaio de disseminação viral. Para tal, MEFs WT ou PAK1<sup>-/-</sup> foram infectados com VACV a MOI 0,001 em tempos variando de 0 a 96 hpi. Imagens macroscópicas da monocamada celular fixada e corada com cristal violeta foram obtidas, evidenciando a redução da disseminação viral na monocamada das células nocautes para PAK1 (Figura 15A), a qual já era sugerida pela grande redução do fenótipo da placa viral nessas células (Figuras 14).

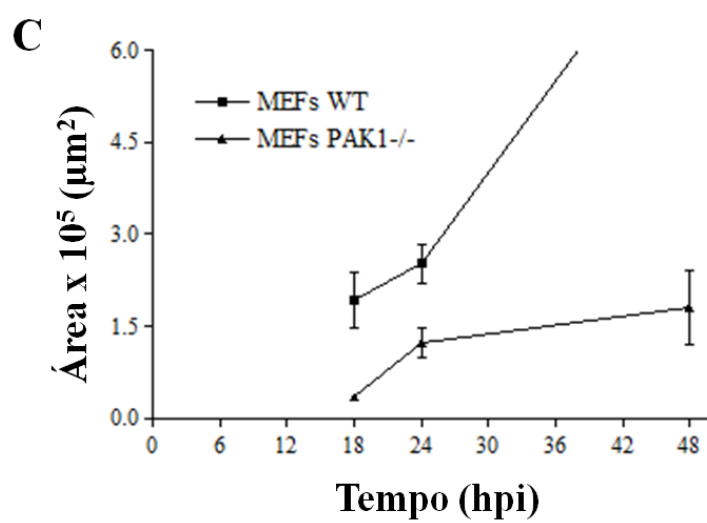
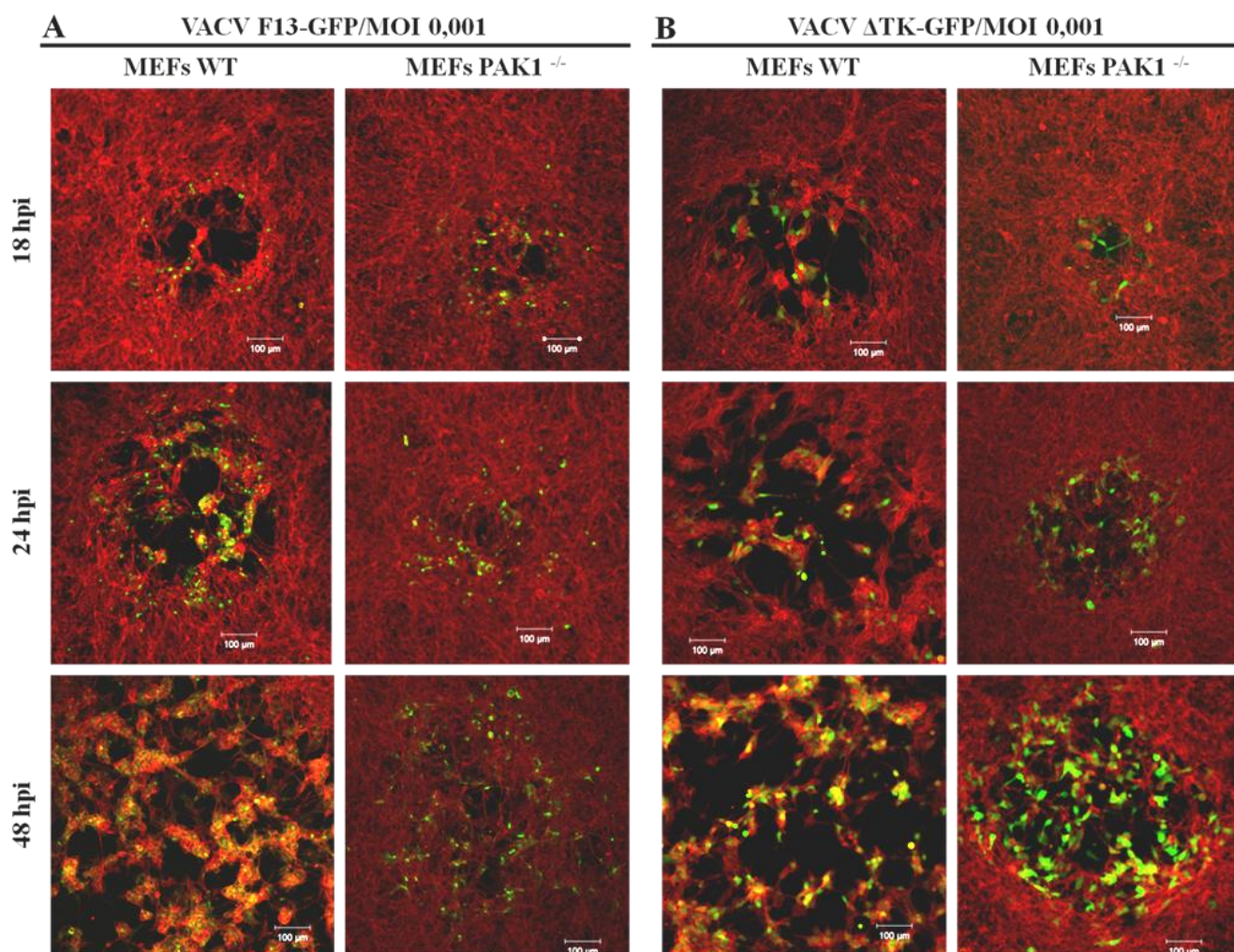
A seguir, analisamos a produção viral, desta vez em infecção a baixa MOI de 0,001. A monocamada de células e o sobrenadante foram processados para a titulação dos IMVs e EEVs, respectivamente, nos tempos de 3 a 96 hpi. Foi possível observar uma redução significativa do título viral, cerca de 1 unidade logarítmica (90%), tanto de IMVs (Figura 15B), quanto de EEVs (Figura 15C), na ausência de PAK1. A redução no título de IMVs nas células nocautes se inicia 24 hpi e se mantém até o último tempo analisado, reforçando o dado de que o problema se encontra na disseminação da progênie gerada após o primeiro ciclo de multiplicação.

A fim de avaliar detalhes da disseminação nas placas virais, experimento semelhante ao da Figura 15A foi analisado por microscopia de fluorescência, infectando-se as células com VACV-F13L-GFP (Figura 16A) ou VACV- $\Delta$ TK-GFP (Figura 16B). Nos tempos de 18, 24 e 48 hpi as células foram fixadas e o citoesqueleto de actina marcado com faloidina-rodamina. Desta forma, foi possível evidenciar agrupamentos de vírus envelopados (Figura 16A) ou células infectadas (Figura 16B) no interior das placas virais, bem como a diferença no tamanho das placas na ausência de PAK1. Verificamos que embora as placas nas células nocautes apresentem uma área bem reduzida (Figura 16C), a disseminação de vírus envelopados para as células vizinhas continua ocorrendo, mas de forma mais restrita e sem provocar a destruição da monocamada como nos MEFs WT (Figura 16A).



**FIGURA 15:** *DISSEMINAÇÃO DO VACV É AFETADA NAS CÉLULAS NOCAUTES PARA PAK1.*

(A) MEFs WT ou PAK1<sup>-/-</sup> foram semeados e infectados com VACV-WR a MOI 0,001 e após os tempos indicados, fixados com formaldeído 3,7% e corados com cristal violeta. (B e C) MEFs WT ou PAK1<sup>-/-</sup> foram semeados e infectados com VACV-WR a MOI 0,001 e após 3, 6, 9, 16, 24, 36, 48, 72 e 96 horas, a monocamada de células (B) e o sobrenadante (C) foram processados para titulação dos IMVs e EEVs, respectivamente. Os tempos de 16, 24, 48 e 96 horas foram realizados em triplicata. As titulações foram realizadas em células BSC-40 e o título determinado em UFP/ml. Resultado representativo de experimentos independentes (n = 3).



**FIGURA 16:** *DETALHE DA DISSEMINAÇÃO NAS PLACAS VIRAIS.*

(A e B) MEFs WT and PAK1<sup>-/-</sup> foram semeados sobre laminulas e infectados a MOI 0,001 com VACV F13-GFP (A) ou VACV ΔTK-GFP (B) pelos tempos indicados. As células foram fixadas, permeabilizadas e incubadas com Faloidina-rodamina (marcação do citoesqueleto de actina). As lamínulas foram montadas em lâminas de vidro utilizando-se Mowiol e imagens das placas virais foram obtidas em microscópio laser confocal ZEISS – LSM 510 META. Imagens representativas de três experimentos independentes com resultados similares. (C) Plotagem da área média das placas virais nos tempos analisados (cinco placas por tempo, por experimento). Áreas determinadas através do software ZEISS, LSM 510.

## 6. FORMAÇÃO DE CEVs E CAUDAS DE ACTINA NOS MEFs WT E PAK1<sup>-/-</sup> INFECTADOS COM VACV.

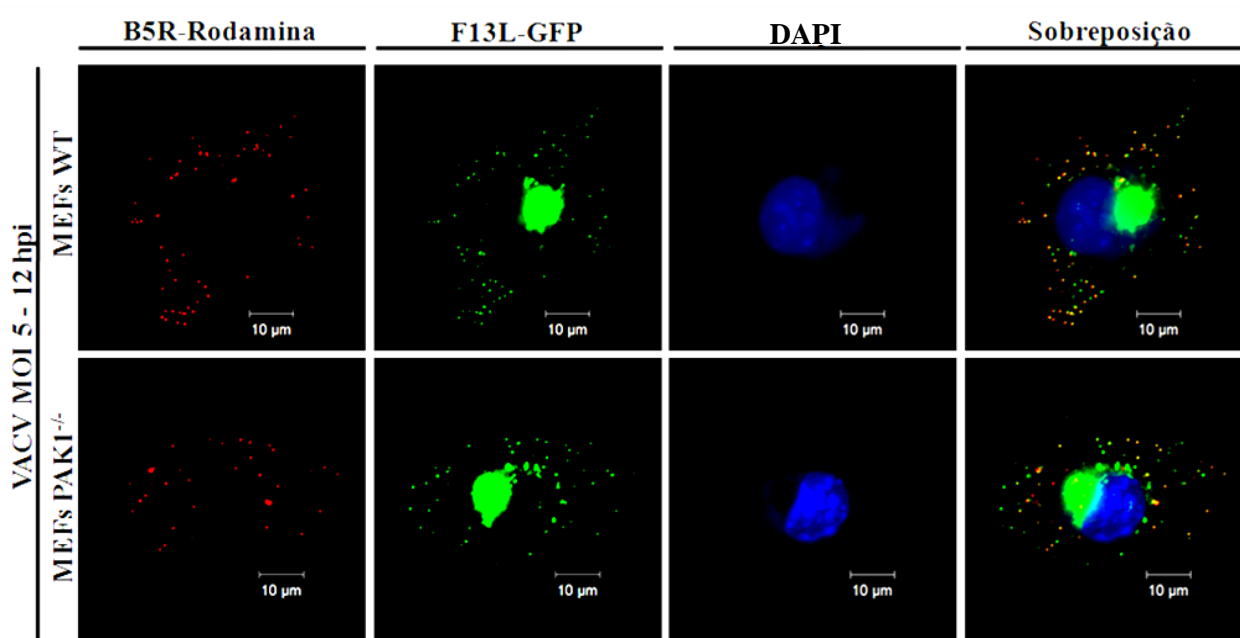
O fenótipo de placa dos poxvírus é determinado por uma eficiente disseminação célula-a-célula que, por sua vez, depende dos CEVs. Estas formas induzem a polimerização de caudas de actina, tornando mais eficaz a disseminação para as células vizinhas. Assim, uma vez que a ausência de PAK1 provoca uma redução na disseminação viral (Figuras 15 e 16), a qual não está relacionada nem a uma deficiência na penetração viral (Figura 11), nem a uma menor produção viral (Figura 13A) ou problemas no transporte e liberação de EEVs (Figura 13B), fomos investigar etapas relacionadas diretamente a formação e liberação dessas formas envelopadas associadas à célula, os CEVs.

Inicialmente, analisamos a exposição de CEVs na superfície celular nos MEFs. Para isso, infectamos as células com VACV-F13L-GFP, o que permite a visualização de partículas virais envelopadas individuais, que aparecem em padrão pontuado no citoplasma e na periferia celular, além de uma forte marcação justanuclear, correspondente ao complexo de Golgi (GEADA *et al.*, 2001). Essas células foram então marcadas com anticorpo anti a proteína de envelope viral B5R, previamente a permeabilização, possibilitando, assim, a marcação somente dos CEVs, que estão expostos na superfície celular. Observamos que a ausência de PAK1 não interfere na exposição dos CEVs, que apareceram em quantidades equivalentes nos MEFs WT e PAK1<sup>-/-</sup> (Figura 17). As imagens obtidas nesse experimento também possibilitaram observar, através da marcação de F13L, que a produção de vírus envelopados e o transporte e distribuição dessas partículas e da proteína F13, estão ocorrendo de forma aparentemente normal na ausência de PAK1 (Figura 17).

A próxima etapa foi investigar a formação das caudas de actina pelos CEVs. Essa análise foi realizada por microscopia de fluorescência através da marcação do citoesqueleto de actina com faloidina conjugada a rodamina. MEFs WT e PAK1<sup>-/-</sup> foram implantados em lamínulas e infectados com VACV-WR a MOI 5. Após os tempos de 9, 12 e 18 hpi, as células foram fixadas, marcadas com anti-B5R (CEVs), permeabilizadas e, então, marcadas com faloidina-rodamina (citoesqueleto de actina), e DAPI (núcleo). Foi possível observar grande número de células contendo caudas de actina com CEVs em suas extremidades na monocamada de MEFs WT nos 3 tempos analisados, como pode ser visto

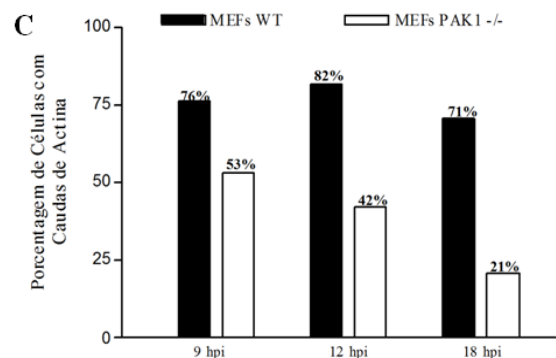
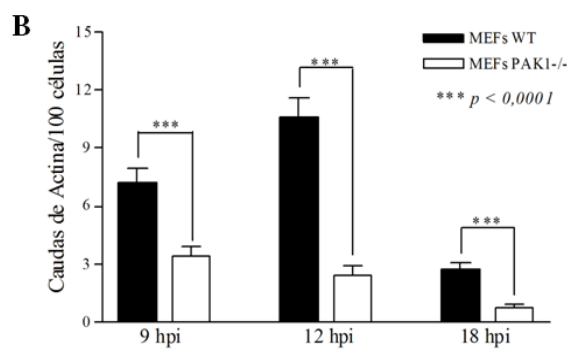
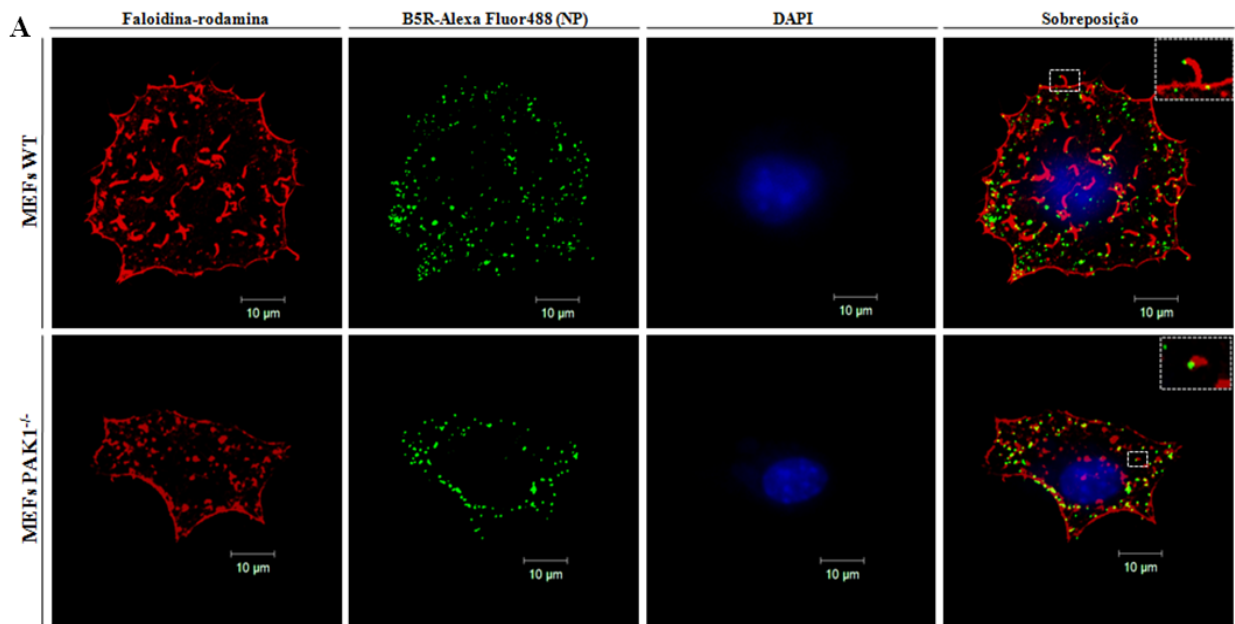
em uma imagen representativa capturada no tempo de 12h (Figura 18A). Na monocamada de MEFs PAK1<sup>-/-</sup>, entretanto, dificilmente encontrávamos caudas de actina pronunciadas e, quando apareciam, eram em menor número (Figura 18A). Análises morfométricas do número de caudas de actina por célula e da porcentagem de células com caudas de actina foram realizadas, evidenciando a diferença significativa encontrada na formação dessas estruturas nos MEFs PAK1<sup>-/-</sup> (Figura 18B e 18C).

Esses resultados foram corroborados através de microscopia eletrônica de varredura. Grande número de caudas de actina pronunciadas e com CEVs em suas extremidades foram evidenciadas na superfície de MEFs WT, 12 hpi. Já na superfície de MEFs PAK1<sup>-/-</sup>, apesar do grande número de CEVs presentes na superfície celular, as caudas de actina se mostraram bem mais escassas (Figura 19).



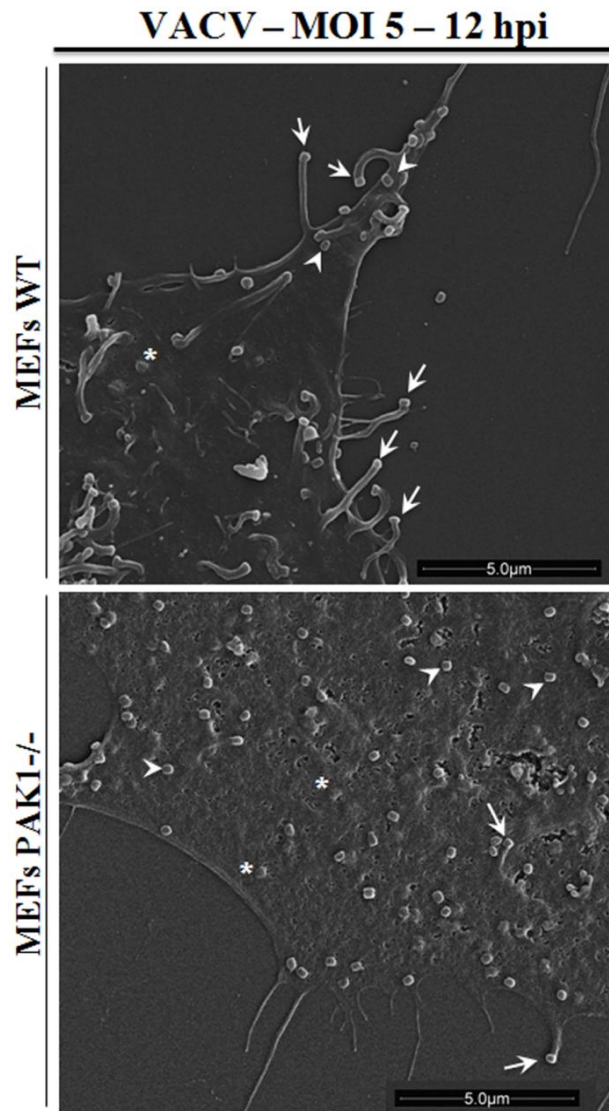
**FIGURA 17:** A AUSÊNCIA DE *PAK1* NÃO INTERFERE NA EXPOSIÇÃO DE CEVs NA SUPERFÍCIE CELULAR.

MEFs WT ou *PAK1*<sup>-/-</sup> foram semeados sobre lamínulas e infectados com VACV-F13L-GFP a MOI 5 por 12h. As células foram fixadas, incubadas com anticorpo anti a proteína de envelope viral B5R e com anticorpo secundário conjugado a Rodamina (marcação dos CEVs), e só então permeabilizadas, e incubadas com DAPI (marcação do núcleo). As lamínulas foram montadas em lâminas de vidro utilizando-se Mowiol e as imagens obtidas em microscópio laser confocal ZEISS – LSM 510 META.



**FIGURA 18:** A AUSÊNCIA DE *PAK1* INTERFERE NA FORMAÇÃO DAS CAUDAS DE ACTINA PELO VACV.

MEFs WT ou *PAK1*<sup>-/-</sup> foram semeados sobre lamínulas e infectados com VACV-WR a MOI 5 durante 9, 12 e 18 horas. As células foram fixadas, incubadas com anticorpo anti a proteína de envelope viral B5R e com anticorpo secundário conjugado a AlexaFluor-488 (marcação dos CEVs), permeabilizadas, e então marcadas com Faloidina-rodamina (marcação do citoesqueleto de actina) e DAPI (marcação do núcleo). As lamínulas foram montadas em lâminas de vidro utilizando-se Mowiol e as células analisadas em microscópio laser confocal ZEISS – LSM 510 META. (A) Imagens representativas das caudas de actina nos MEFs WT e *PAK1*<sup>-/-</sup> (12 hpi) foram obtidas e processadas através do software ZEISS, LSM 510. Caudas de actina induzidas pelo vírus evidenciadas pelo aumento das áreas delimitadas. (B e C) Análise morfológica do número de caudas de actina por célula (B) e da porcentagem de células com caudas de actina (C). Análise estatística realizada através do programa *Prism 3.0*. Resultado representativo de experimentos independentes (n = 4).



**FIGURA 19:** A AUSÊNCIA DE *PAK1* INTERFERE NA FORMAÇÃO DAS CAUDAS DE ACTINA PELO VACV.

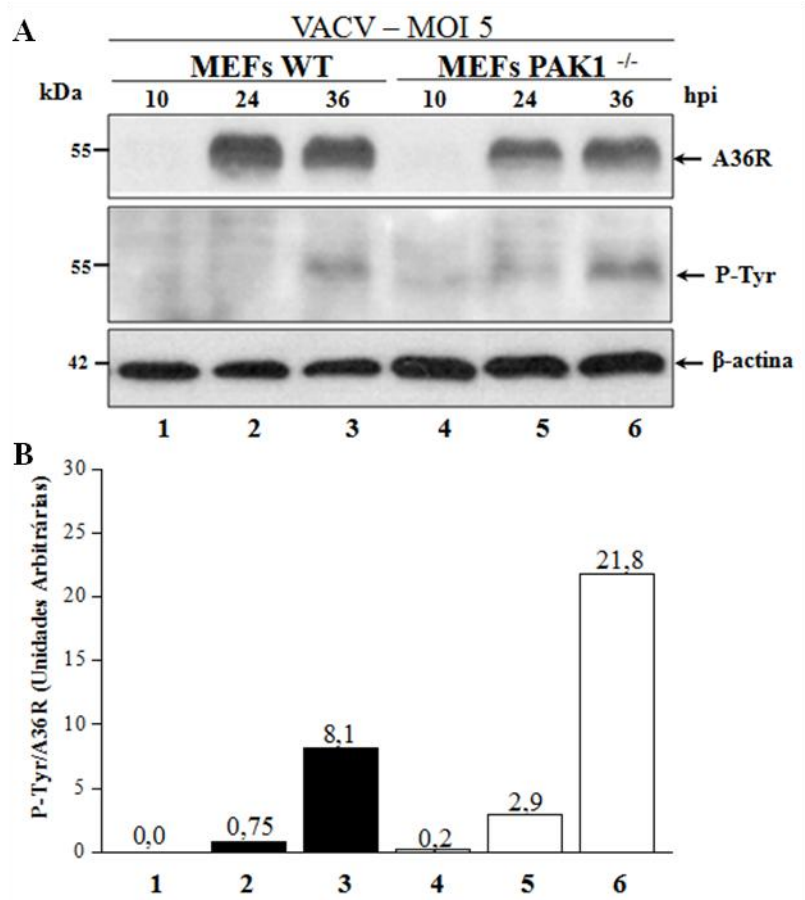
MEFs WT ou *PAK1*<sup>-/-</sup> foram semeados sobre lamínulas e infectados com VACV-WR a MOI 5 durante 12 horas. As células foram fixadas, desidratadas, metalizadas em ouro e analisadas em microscópio eletrônico de varredura (Quanta 200 - FEG – FEI) sob uma tensão de aceleração de 15 kV. Imagens representativas foram capturadas e editadas com o *software* Adobe Photoshop 7.0.1. (Setas brancas – vírus nas pontas de caudas de actina; asteriscos brancos – protuberância de partículas virais no interior da célula; cabeças de seta brancas – vírus envelopados sobre a superfície externa da célula).

## **7. FOSFORILAÇÃO DE A36R NOS MEFs WT E PAK1<sup>-/-</sup> INFECTADOS COM VACV.**

Até aqui foi possível observar que na ausência de PAK1, apesar dos CEVs serem formados e alcançarem a superfície celular, eles não estão sendo capazes de induzir eficientemente as projeções de actina responsáveis por maximizar a disseminação viral.

Um evento molecular importante que possibilita a indução das caudas de actina pelos CEVs é a fosforilação da proteína de envelope viral A36. Só após sua fosforilação as partículas virais se dissociam dos microtúbulos e se tornam capazes de recrutar a maquinaria celular responsável pela polimerização de actina.

Tendo isso em vista, partimos para a análise da fosforilação de A36 nos MEFs infectados com VACV. Para isso, MEFs WT e PAK1<sup>-/-</sup> foram infectados com VACV a MOI 5 por tempos tardios, e extratos protéicos totais dessas células foram submetidos à transferência de “Western” e sondados com anticorpo anti-A36R, e posteriormente com anti-P-Tyr. Tal procedimento permite uma análise indireta do nível de fosforilação de A36 nas células infectadas. Observamos sinal de P-Tyr referente à proteína A36 nos extratos dos MEFs WT, 36 hpi e, de forma mais intensa nos extratos dos MEFs PAK1<sup>-/-</sup>, 24 e 36 hpi (Figura 20A e 20B). Esse resultado indica que a fosforilação de A36 está ocorrendo na ausência de PAK1, e sua maior intensidade aparente pode refletir um acúmulo de CEVs na superfície celular, que não são liberados eficientemente por meio das caudas de actina.



**FIGURA 20:** A FOSFORILAÇÃO DE A36R OCORRE NAS CÉLULAS NOCAUTES PARA PAK1.

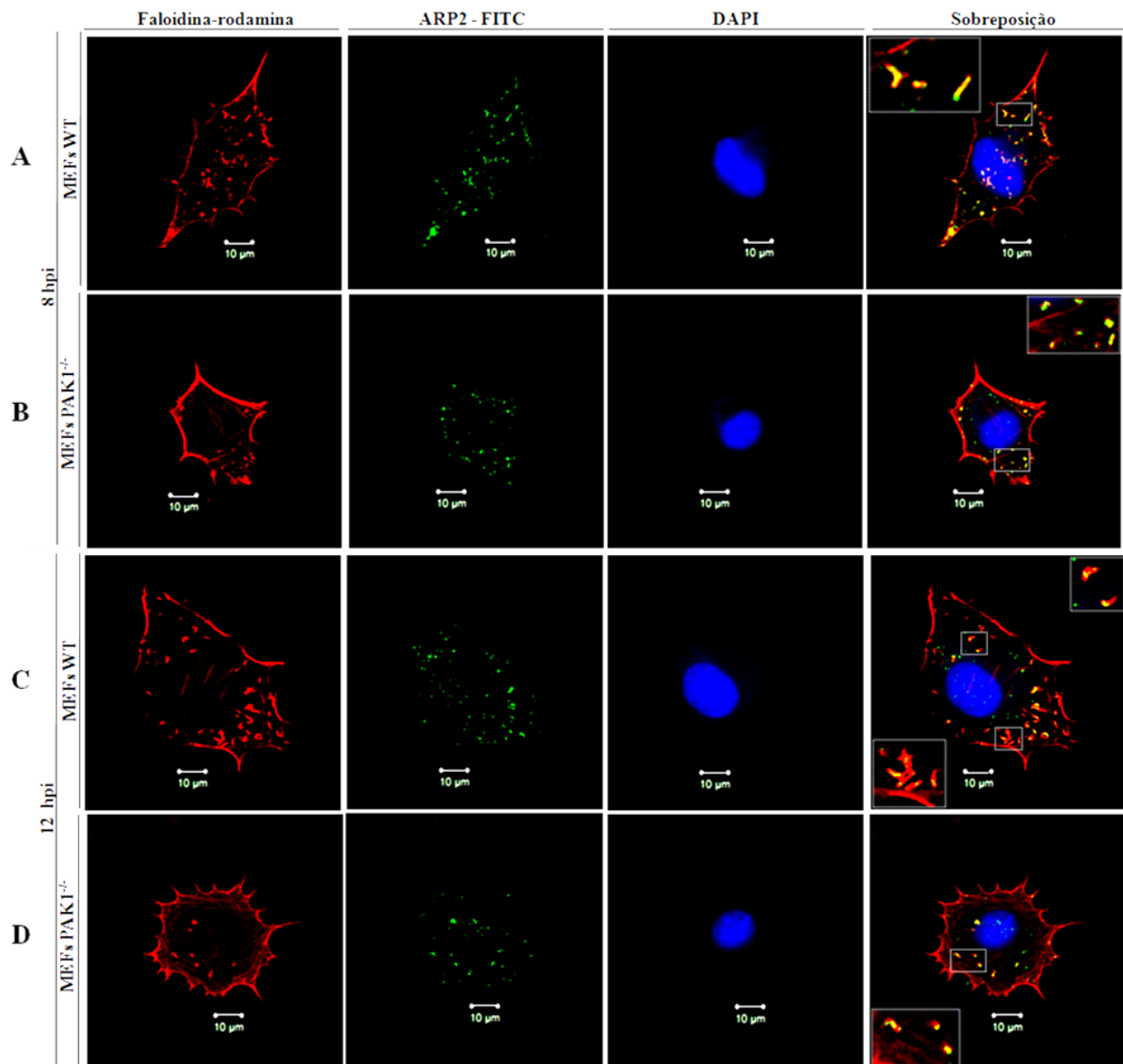
(A) Transferência de “Western” de 30µg de extrato protéico total de MEFs WT ou PAK1<sup>-/-</sup> semeados e infectados, pelos tempos indicados, com VACV-WR a MOI 5. As membranas foram sondadas com anticorpo anti a proteína de envelope viral A36R, com anticorpo anti-fosfo-tirosina e, posteriormente, com anti-β-actina, para normalização da quantidade de proteínas aplicadas em cada canaleta. Massa molecular das proteínas indicada à esquerda em kilodaltons (kDa). (B) Gráfico representando a razão P-Tyr/A36R/β-actina, obtida através da análise densitométrica das bandas. Gel representativo de experimentos independentes (n = 2).

## **8. COLOCALIZAÇÃO DE ARP2 COM CEVs E CAUDAS DE ACTINA NOS MEFs WT E PAK1<sup>-/-</sup> INFECTADOS COM VACV.**

Como a fosforilação de A36 está ocorrendo nas células nocautes para PAK1, a próxima etapa foi analisar o recrutamento do complexo celular responsável pela nucleação dos monômeros de actina e sua polimerização. O recrutamento do complexo ARP2/3 só ocorre após a fosforilação de A36 e é o responsável direto pela formação das caudas de actina induzidas pelos CEVs.

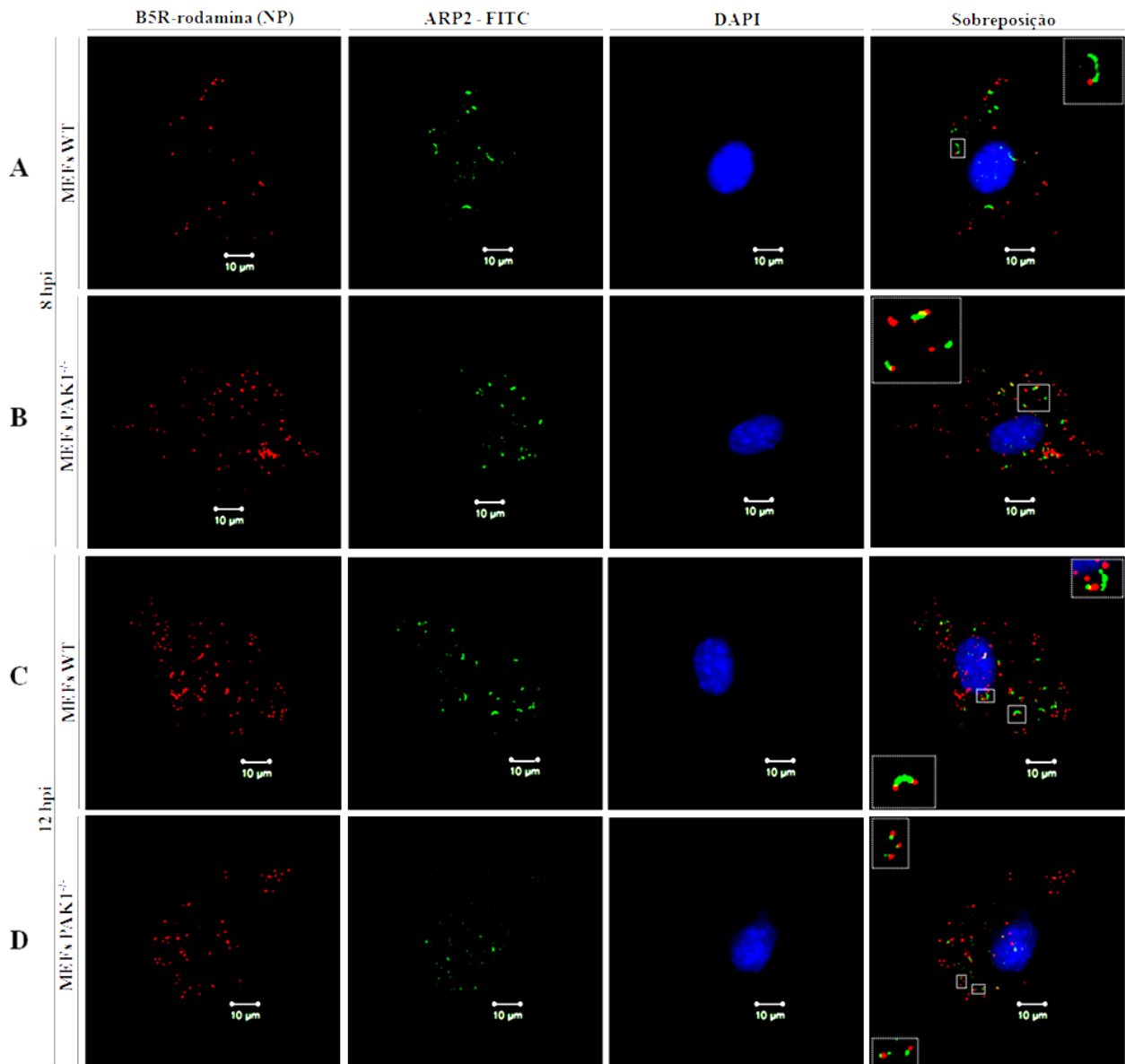
Para tal, MEFs WT e PAK1<sup>-/-</sup> foram implantados em lamínulas e infectados com VACV-WR a MOI 5. Após os tempos de 8 e 12 hpi, as células foram fixadas, marcadas com faloidina-rodamina (citoesqueleto de actina) ou anti-B5R pré-permeabilização (CEVs), anti-ARP2 e DAPI (núcleo) e analisada por microscopia confocal. Foi possível observar ARP2 colocalizando com as caudas de actina (Figura 21) e com as adjacências dos CEVs (Figura 22), tanto nos MEFs WT, quanto nos MEFs PAK1<sup>-/-</sup>. Nesse experimento também observamos as dimensões reduzidas das caudas de actina nos MEFs PAK1<sup>-/-</sup> (Figura 21B e 21D) e o reflexo disso na distribuição de ARP2 adjacente aos CEVs (Figura 22B e 22D).

Esses resultados mostram que o recrutamento do complexo ARP2/3 não é dependente da presença de PAK1 nas células.



**FIGURA 21:** A AUSÊNCIA DE PAK1 NÃO IMPEDE O RECRUTAMENTO DE ARP2 PARA OS SÍTIOS DE POLIMERIZAÇÃO DAS CAUDAS DE ACTINA INDUZIDAS PELOS CEVS.

MEFs WT ou PAK1<sup>-/-</sup> foram semeados sobre lamínulas e infectados com VACV-WR a MOI 5 durante 8 e 12 horas. As células foram fixadas, incubadas com anticorpo anti a proteína celular ARP2 e com anticorpo secundário conjugado a FITC, Faloidina-rodamina (marcação do citoesqueleto de actina) e DAPI (marcação do núcleo). As lamínulas foram montadas em lâminas de vidro utilizando-se Mowiol e as células analisadas em microscópio laser confocal ZEISS – LSM 510 META, sendo as imagens obtidas processadas através do software ZEISS, LSM 510. Colocalização de ARP2 e caudas de actina induzidas pelo vírus evidenciadas pelo aumento das áreas delimitadas. Resultado representativo de experimentos independentes (n = 2).



**FIGURA 22:** A AUSÊNCIA DE PAK1 NÃO IMPEDE O RECRUTAMENTO DE ARP2 PARA AS ADJACÊNCIAS DOS CEVs.

MEFs WT ou PAK1<sup>-/-</sup> foram semeados sobre lamínulas e infectados com VACV-WR a MOI 5 durante 8 e 12 horas. As células foram fixadas, incubadas com anticorpo anti-B5R (marcação de CEVs), permeabilizadas e marcadas com anticorpo anti a proteína celular ARP2 e com anticorpo secundário conjugado a FITC, e Dapi (marcação do núcleo). As lamínulas foram montadas em lâminas de vidro utilizando-se Mowiol e as células analisadas em microscópio laser confocal ZEISS – LSM 510 META, sendo as imagens obtidas processadas através do software ZEISS, LSM 510. Localização de ARP2 adjacente aos CEVs evidenciada pelo aumento das áreas delimitadas. Resultado representativo de experimentos independentes (n = 2).

## 9. LOCALIZAÇÃO DE P-PAK1 EM MEFs WT AO LONGO DA INFECÇÃO COM VACV.

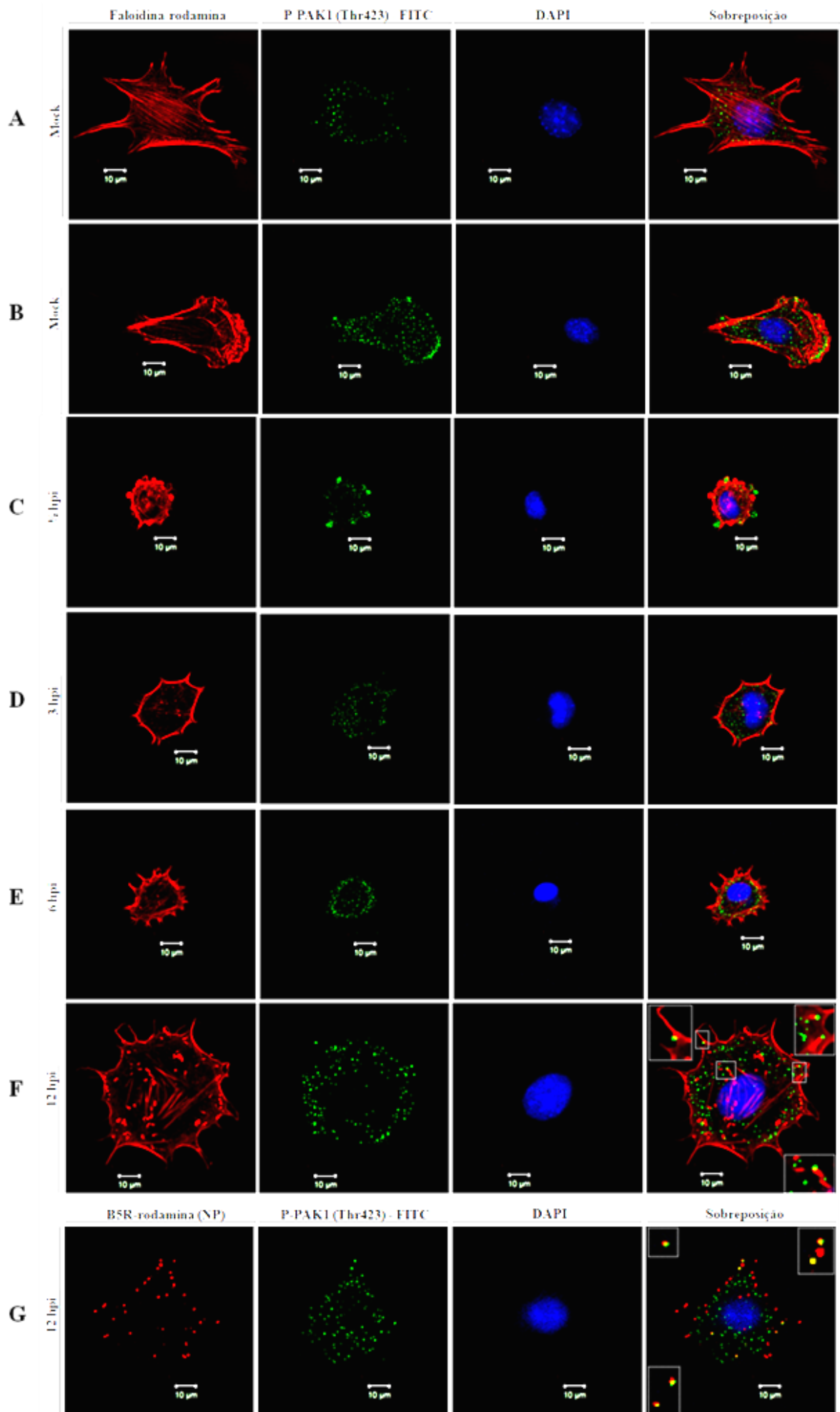
Os resultados obtidos até agora indicam que a ausência de PAK1 interfere diretamente na formação das caudas de actina responsáveis pela disseminação dos CEVs. Para reforçar essa hipótese, analisamos a localização da forma ativa de PAK1 (P-PAK1 – Thr 423) em MEFs WT ao longo da infecção pelo VACV, visando avaliar se essa proteína ativa estaria sendo recrutada para os sítios de polimerização de actina pelos CEVs.

Para isso, MEFs WT foram implantados em lamínulas e infectados com VACV-WR a MOI 5. Após os tempos de 0, ½, 3, 6 e 12 hpi, as células foram fixadas, marcadas com o anticorpo anti-P-PAK1 (Thr423), faloidina-rodamina (citoesqueleto de actina) e DAPI (núcleo) e, posteriormente, analisadas por microscopia confocal.

Nos painéis 23A e 23B, podemos observar a distribuição citoplasmática de P-PAK1 em células não infectadas, bem como a marcação mais intensa em regiões de maior dinâmica de actina presente em células com morfologia migratória (Figura 23B).

Em células infectadas, observamos a concentração da forma ativa de PAK1 nos *blebs* de membrana (Figura 23C), estruturas com elevada dinâmica de actina relacionadas ao processo de penetração viral por macropinocitose, no qual a participação de PAK1 já foi anteriormente descrita (MERCER & HELENIUS, 2008). Nos tempos de 3 e 6 hpi identificamos os morfotipos associados ao progresso da infecção viral, o re-achatamento da célula, com uma distribuição difusa de P-PAK1 pelo citoplasma (Figura 23D), e a transição para uma morfologia “estrelada”, com uma tendência a concentração de P-PAK1 na periferia celular (Figura 23E). No tempo de 12 hpi, foi possível observar a colocalização de P-PAK1 nas pontas das caudas de actina induzidas pelo vírus (Figura 23F), reforçando a idéia de que essa STK está participando diretamente desse processo.

Adicionalmente, realizamos a marcação de MEFs WT, nos tempos de 6, 9 e 12 hpi, com anti-B5R e anti-P-PAK1, para confirmar a colocalização da forma ativa de PAK1 com os CEVs (Figura 23G – imagem representativa em 12 hpi). A análise morfométrica revelou uma frequência de colocalização CEVs :: P-PAK1 de 10% em todos os tempos (n = 15 células).



**FIGURA 23:** *P-PAK1 COLOCALIZA COM AS CAUDAS DE ACTINA E COM CEVs NOS MEFs WT.*

MEFs WT ou PAK1<sup>-/-</sup> foram semeados sobre lamínulas, falsamente infectados (Mock – painéis A e B) ou infectados com VACV-WR a MOI 5 durante ½, 3, 6 e 12 horas (Painéis C a G). As células foram fixadas, incubadas com anticorpo anti-P-PAK1 (Thr 423) e com anticorpo secundário conjugado a FITC, Faloidina-rodamina (marcação do citoesqueleto de actina) ou anti-B5R pré-permeabilização (marcação dos CEVs) e DAPI (marcação do núcleo). As lamínulas foram montadas em lâminas de vidro utilizando-se Mowiol e as células analisadas em microscópio laser confocal ZEISS – LSM 510 META, sendo as imagens obtidas processadas através do software ZEISS, LSM 510. Colocalização de P-PAK1 e caudas de actina ou CEVs evidenciadas pelo aumento das áreas delimitadas (Painéis F e G).

## VI. DISCUSSÃO:

O sucesso multiplicativo viral depende do balanço existente entre a resposta do hospedeiro à infecção e uma eficiente manipulação do ambiente intracelular que irá torná-lo adequado e permissível à replicação e à geração da progênie viral.

Diversos estudos já mostraram a importância da manipulação de vias de sinalização pelos vírus para garantir e proporcionar esse ambiente favorável a replicação (YANG & GABUZDA, 1999; JOHNSTON *et al.*, 2003; McFADDEN, 2005; WANG *et al.*, 2006). Muitas dessas vias estão relacionadas à modulação do citoesqueleto celular, que tem importante atuação desde o processo de penetração viral até o momento de liberação da progênie (SNAPPER *et al.*, 2001; PELKMANS, 2005; FACKLER *et al.*, 2006; HENRY *et al.*, 2006; VAN DEN BROEKE, 2009; ROTTNER & STRADAL, 2009; WEISSWANGE *et al.*, 2009).

No caso dos poxvirus, que possuem um ciclo de multiplicação citoplasmático, essa manipulação do citoesqueleto é constante ao longo de todo o ciclo e se faz visível pelas alterações morfológicas que a célula sofre ao longo do ciclo viral (RIETDORF *et al.*, 2001; SCAPLEHORN *et al.*, 2002; WARD & MOSS, 2004; WARD, 2005; GREBER & WAY, 2006; SCHEPIS *et al.*, 2006; SCHRAMM *et al.*, 2006; NEWSOME *et al.*, 2006; PEREIRA *et al.*, 2012).

A serina/treonina cinase PAK1 está biologicamente envolvida em diversas vias relacionadas à modulação e dinâmica do citoesqueleto, além de inúmeras outras funções. (SELLS *et al.*, 1997, 1999; BOKOCH, 2003; VADLAMUDI *et al.*, 2004; LEISNER *et al.*, 2005; YANG *et al.*, 2005; KUMAR *et al.*, 2006). Essa proteína já mostrou estar ativa e participar do ciclo de multiplicação de diversos vírus, desempenhando papéis tanto ligados a modulação do citoesqueleto quanto mediando sinalização relacionada à apoptose, resposta imune e proliferação celular (FACKLER *et al.*, 2000; NGUYEN *et al.*, 2006; PACHECO & CHERNOFF, 2010; VAN DEN BROEKE *et al.*, 2010). Quanto aos poxvírus, já foi descrito que PAK1 atua nas alterações precoces do citoesqueleto de actina que vão propiciar a penetração viral através do mecanismo de macropinocitose (MERCER & HELENIUS, 2008 and 2010, reviewed by PACHECO & CHERNOFF, 2010 and VAN DEN BROEK *et al.*, 2010; SCHMIDT *et al.*, 2011).

Aqui, analisamos o reflexo da ausência de PAK1 ao longo de todo o ciclo de multiplicação do VACV. Para isso, foram usados Fibroblastos Embrionários Murinos

(MEFs) selvagens (WT) e nocautes (PAK1<sup>-/-</sup>) para PAK1 (TEN KLOOSTER *et al.*, 2006). Essas células foram derivadas de embriões de camundongos C57Bl/6 de 13,5 dias selvagens ou nocautes, sendo estes últimos gerados pela substituição de região a montante (*upstream*) do gene de PAK1 por um cassete de Neomicina (Jonathan Chernoff [Tumor Cell Biology Program, Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, USA] - comunicação pessoal).

PAK1, quando ativa, participa de inúmeras vias de sinalização celular. Dentre elas, estão as cascatas das MAPKs ERK1/2 e JNK1/2. PAK1 pode participar da via de ERK, sendo capaz de fosforilar tanto a MAPKKK Raf-1 (Ser 338) quanto a MAPKK MEK1 (Ser 298). A fosforilação de MEK1 e Raf-1 por PAK1 controlam distintos mecanismos de ativação de ERK em diferentes contextos celulares (BEESER *et al.*, 2005; PARK, *et al.*, 2007). PAK1 também pode atuar como efetora da sinalização de Rac/Cdc42, enviando sinais à via de JNK1/2, possivelmente através da ativação da MAPKKK MEKK (revisado por BRAGODIA & CERIONE, 1999 e BOKOCH, 2003). Desta forma, inicialmente foi analisado se PAK1 estaria participando da cascata de sinalização que leva a ativação das MAPKs ERK e JNK ao longo do ciclo de multiplicação do VACV. Observamos que a ativação de ERK e JNK ocorre nos MEFs selvagens e nocautes na mesma cinética já observada anteriormente (Figura 10) (MAGALHÃES *et al.*, 2001; ANDRADE *et al.*, 2004; PEREIRA *et al.*, 2012). Apesar de existir uma pequena redução nos níveis de fosforilação de ERK nos MEFs PAK1<sup>-/-</sup> (Figura 10), esta parece não ser significativa a ponto de interferir com a transmissão do sinal ao longo da cascata. Assim, embora PAK1 possa estar, em algum grau, envolvida na cascata de fosforilação de ERK após infecção pelo VACV, não o faz de forma relevante a prejudicar a ativação das moléculas efetoras desta via.

Partimos para a análise dos eventos ao longo do ciclo de multiplicação viral. Inicialmente, corroboramos a participação de PAK1 na etapa de penetração viral, uma vez que foi possível observar expressão reduzida de proteínas precoces virais em tempos precoces na ausência de PAK1 (Figura 11). Entretanto, ao estender a análise por tempos intermediários e tardios, observamos que essa redução consiste em um atraso, uma vez que os níveis de expressão se tornam equivalentes à medida que a infecção avança (Figura 11). Isto sugere que o VACV, na ausência de PAK1 e, por conseguinte, de penetração eficiente por macropinocitose (MERCER & HELENIUS, 2008), ainda assim consegue penetrar nas células e prosseguir seu ciclo de multiplicação, o que é viabilizado pela capacidade dos poxvírus de usar distintos mecanismos de penetração (CARTER *et al.*, 2005; TOWNSLEY

*et al.*, 2006 e 2007; MERCER *et al.*, 2010). Essa ideia é corroborada pelo fato de que mesmo na ausência de PAK1 os níveis de expressão de proteínas virais tardias e a produção de IMVs e EEVs ocorrem na mesma magnitude que nas células selvagens (Figuras 12 e 13). A análise da produção de IMVs e EEVs foi feita através de ensaios de multiplicação em ciclo único (multiplicidade de infecção – MOI - 5). Infecções com alta MOI garantem a adsorção de pelo menos uma partícula viral por célula, sendo que o ciclo de multiplicação ocorre de forma concomitante em toda monocamada celular. Essa abordagem permite avaliar a eficiência da produção viral em si, uma vez que não são fornecidas informações com relação à capacidade de disseminação das partículas geradas. Assim, observamos que a ausência de PAK1 e o atraso que ela provoca na penetração viral, não têm impacto na produção viral. Além disso, foi possível avaliar que não existe nenhum problema aparente em etapas imediatamente posteriores a produção dos IMVs, como a geração e/ou transporte dos IEVs, uma vez que EEVs são liberados normalmente pelos MEFs nocautes para PAK1.

Esses resultados contrastam com os obtidos para outro membro da família *Poxviridae*, o *Myxoma virus* (MYXV), para o qual a ativação de PAK1 é requerida por mediar cascatas de sinalização que atuam em algum aspecto precoce da replicação viral. Na ausência de ativação de PAK1, ocorre um bloqueio da replicação viral, que coincide temporalmente com o desnudamento secundário, replicação do DNA e/ou transição da expressão gênica precoce para a tardia (JOHNSTON *et al.*, 2003).

Sabemos que a produção de IMVs é somente uma parte do ciclo de multiplicação dos poxvírus, e que o sucesso multiplicativo viral depende da formação das partículas envelopadas, EEVs e CEVs, que vão garantir uma disseminação viral máxima e eficiente. Os IMVs, apesar de responderem pela disseminação a novos hospedeiros, devido a sua relativa resistência e estabilidade, não são adequados a disseminação dentro do hospedeiro, pois são partículas altamente imunogênicas. Além disso, por serem liberados apenas com a lise celular, são pouco representativos no sobrenadante de culturas infectadas e não contribuem significativamente para a disseminação *in vitro*, como fazem as formas EEV e CEV. Essas formas envelopadas, por sua vez, possuem um envelope externo que dificulta o reconhecimento pelo sistema imune, sendo os principais responsáveis pela disseminação dentro do hospedeiro. O EEV é responsável pela disseminação de longo-alcance (sistêmica) e o CEV pela disseminação célula-a-célula (PAYNE, 1980; SMITH *et al.*, 2002; SMITH & LAW, 2004; ROBERTS & SMITH, 2008). Como o processo de geração dessas partículas e de disseminação depende fortemente da manipulação viral do

citoesqueleto celular, partimos para análises que indicariam a possível participação de PAK1 em eventos posteriores à produção dos IMVs.

Iniciamos com a observação do fenótipo de placa viral, que se mostrou bastante reduzido tanto nas células nocautes para PAK1, quanto em células BSC-40 tratadas com inibidor químico de PAK – IPA-3 (Figura 14). Estendemos a análise do fenótipo de placa, a fim de obter mais informações acerca da capacidade de disseminação nos MEFs PAK1<sup>-/-</sup>. Para isso, realizamos ensaios de multiplicação utilizando baixa MOI. Dessa forma, teríamos células primariamente infectadas e cuja progênie viral seria a responsável por disseminar a infecção para as demais células da monocamada. Observamos que a ausência de PAK1 teve um grande impacto na disseminação do VACV em monocamada celular (Figuras 15 e 16), levando a uma queda de cerca de 90% (1 unidade logarítmica) na produção de IMVs e EEVs (Figura 15) e mostrando uma forte limitação a expansão da placa viral após 24h (Figura 16).

Sabe-se que o tamanho das placas é determinado principalmente pela disseminação eficiente de CEVs célula a célula por meio das caudas de actina e que tamanho reduzido de placa e menor disseminação estão fortemente correlacionados a problemas na geração de CEVs e/ou na indução das caudas de actina (McINTOSH *et al.*, 1996; MATHEW *et al.*, 1998; ROPER *et al.*, 1998; ZHANG *et al.*, 2000; SMITH, 2002; KATZ *et al.*, 2003). Com isso em mente, seguimos com análises direcionadas a essas etapas do ciclo de multiplicação. Observamos que na ausência de PAK1, a exposição de CEVs na superfície celular e a fosforilação de A36R, pré-requisitos para a formação das caudas de actina, não são prejudicadas (Figuras 17, 18, 19 e 20). Entretanto, vimos que nas células nocautes para PAK1, as caudas de actina são bem menos freqüentes e menores em comprimento do que nas células selvagens (Figuras 18 e 19).

Fenótipos semelhantes são vistos em diversas circunstâncias envolvendo eventos posteriores à fosforilação de A36 e exposição dos CEVs na superfície celular, como o recrutamento de rede de sinalização que culmina com a polimerização da actina no sítio subjacente aos CEVs. As principais proteínas celulares envolvidas nesse processo e que são recrutadas mediante fosforilação de A36 são Nck, Grb2, WIP e N-WASP, que por fim permitem o recrutamento do complexo ARP2/3, responsável direto pela nucleação dos monômeros de actina e formação das caudas (RIETDORF *et al.*, 2001; SCAPLEHORN *et al.*, 2002; WARD & MOSS, 2004; MÜNTER *et al.*, 2006; NEWSOME *et al.*, 2006). A princípio observamos que o recrutamento dessa cascata estava ocorrendo normalmente nas

células selvagens e nocautes para PAK1, através da presença e colocalização de ARP2 com os CEVs e com as caudas de actina (Figuras 21 e 22).

Uma possível interferência direta na formação ou estabilização das caudas de actina na ausência de PAK1 é uma hipótese plausível, uma vez que PAK1 possui sítios de interação com as proteínas adaptadoras Nck e Grb2, recrutadas para esse processo, além de ter a subunidade p41 Arc, do complexo Arp2/3, como seu substrato direto (WANG, 1996; BOKOCH, 2003; ZHOU *et al.*, 2003; PUTO *et al.*, 2003; VADLAMUDI *et al.*, 2004; KUMAR *et al.*, 2006). Partimos então para a visualização de PAK1 ativa (P-PAK1 Thr423) ao longo do ciclo de infecção do VACV nos MEFs selvagens. Observamos e corroboramos sua presença nos *blebs*, estruturas características do processo de penetração por macropinocitose, da qual PAK1 participa (MERCER & HELENIUS, 2008), uma tendência a se dirigir para a superfície celular à medida que a infecção progride, e por fim, sua colocalização com as caudas de actina e subjacente aos CEVs (Figura 23). Essa colocalização sugere fortemente a participação dessa serina/treonina cinase na cascata de sinalização responsável pela polimerização de actina e formação das caudas. Esse processo necessita de estudo moleculares e dinâmicos mais detalhados, mas é possível sugerir que na ausência de PAK1, todo o complexo é recrutado e as caudas são formadas, entretanto, a subunidade regulatória p41-Arc do complexo ARP2/3 não está sendo fosforilada, trazendo consequências para a eficiência da disseminação dos CEVs por meio das caudas de actina.

Por fim, este trabalho é mais um exemplo de como os poxvírus manipulam e interagem de forma complexa e dinâmica com vias de sinalização celular e com o citoesqueleto, mostrando como a interação vírus - célula hospedeira é crítica em determinar a eficiência de um ciclo de multiplicação viral, e como a ausência de proteínas com atividades diversificadas, como PAK1, pode interferir em diferentes etapas desse processo.

## VII. CONCLUSÕES:

- ⇒ A ausência de PAK1 não altera a cinética de ativação das MAPKs JNK e ERK após infecção com VACV, e não interfere na transdução do sinal ao longo dessas vias;
- ⇒ A ausência de PAK1 provoca um atraso na expressão gênica precoce viral, refletindo, possivelmente, uma deficiência na penetração viral por macropinocitose, evento que ocorre na dependência dessa STK. Entretanto, observamos que esse atraso é insignificante em relação à progressão do ciclo de multiplicação viral como um todo, levando-nos a crer que o vírus recorre à outra via de penetração em tempo hábil de reverter o problema ocasionado pela indisponibilidade de PAK1;
- ⇒ A ausência de PAK1 reduz drasticamente o fenótipo de placa e a disseminação viral, mas não afeta eventos anteriores, como expressão gênica viral precoce e tardia, produção de IMVs, transporte, envelopamento e liberação de EEVs;
- ⇒ A ausência de PAK1 não interfere com o transporte de CEVs até a superfície, nem com os eventos moleculares que se seguem, como fosforilação de A36 e recrutamento da maquinaria celular responsável pela polimerização de actina. Entretanto, a formação de caudas de actina é significativamente reduzida em células nocautes para PAK1, indicando uma possível participação direta dessa STK no processo de polimerização da actina, uma vez que a forma ativa de PAK1 (P-PAK1 Thr423) foi vista colocalizando com os CEVs e nas pontas das caudas de actina em MEFs WT infectados com VACV.

## **VIII. PERSPECTIVAS:**

- ⇒ Produzir um VACV recombinante expressando PAK1 de forma indutível, que servirá para as seguintes análises:
  - ✓ Corroborar os resultados obtidos utilizando um sistema único;
  - ✓ Realizar co-imunoprecipitação de PAK1 e p41-ARC;
  - ✓ Analisar o perfil de fosforilação de p41-ARC na presença e ausência de PAK1;
  - ✓ Estudar o processo de formação das caudas de actina de forma dinâmica, a fim de se estabelecer de forma mais precisa o impacto da ausência de PAK e fosforilação de p41-Arc na formação das caudas de actina e disseminação dos CEVs.

## IX. ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NO PERÍODO:

### ⇒ *ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERÍODICOS:*

1. Soares, J. A. P.; Leite, F.G.G.; Andrade, L. G.; Torres, A.A.; de Sousa, L.P.; Barcelos, L.S.; Teixeira, M.M.; Ferreira, P.C.P.; Kroon, E.G.; Souto-pádrón, T.; Bonjardim, C.A. **Activation of the pi3k/akt Pathway Early During *Vaccinia* and *Cowpox virus* Infection is Required for Both Host Survival and Viral Replication.** Journal of virology, v.83, p.6883-6899, 2009.

### ⇒ *RESUMOS PUBLICADOS EM ANAIS DE CONGRESSOS:*

1. Mügge, F. L. B. ; Andrade, L. G ; Ferreira, P. C. P ; Kroon, E. G. ; Bonjardim, C. A. . **The protein kinase PAK1 is associated with the dissemination of both *Vaccinia* and *Cowpox virus*.** In: XXI National Meeting of Virology, 2010, Gramado. Virus Reviews and Research. Rio de Janeiro, 2010. v. 15. p. 133-133.
2. Mugge, F.L.B.; Andrade,L.G.; Ferreira, P.C.P.; Kroon, E.G.; Bonjardim,C.A. **The Protein Kinase Pak1 Seems To Be Required During *Cowpox virus* Infection.** In: XVIII Semana de Iniciação Científica, 2009, Belo Horizonte. XVIII Semana de Iniciação Científica, 2009.
3. Andrade,L.G.; Ferreira, P.C.P.; Kroon, E.G.; Bonjardim,C.A. **The Serine/Threonine Kinase PAK1 Plays a Role in Actin-based Motility of *Vaccinia virus*.** In: XX National Meeting of Virology, 2009, Brasília. Virus Reviews & Research, 2009. v.14. p 64-64.
4. Mugge, F.L.B.; Andrade,L.G.; Ferreira, P.C.P.; Kroon, E.G.; Bonjardim,C.A. **The Protein Kinase PAK1 Seems to be Required During *Cowpox virus* Infection.** In: XX National Meeting of Virology, 2009, Brasília. Virus Reviews & Research, 2009. v.14. p.74-74.
5. Andrade,L.G.; Ferreira, P.C.P.; Kroon, E.G.; Bonjardim,C.A. **The Serine/Threonine Kinase PAK1 Plays a Role in *Vaccinia virus* Enveloped Particles Dissemination.** In: XIX Encontro Nacional de Virologia, 2008, Caxambu. Virus Reviews & Research. 2008. v.13.

⇒ **APRESENTAÇÃO ORAL/PÔSTER EM SIMPÓSIOS E CONGRESSOS:**

1. Andrade,L.G.; Ferreira, P.C.P.; Kroon, E.G.; Bonjardim,C.A. **The Serine/Threonine Kinase PAK1 Plays a Role in Actin-based Motility of Vaccinia virus.** *Apresentação Oral no XX National Meeting of Virology, 2009, Brasília.*
2. Andrade,L.G.; Ferreira, P.C.P.; Kroon, E.G.; Bonjardim,C.A. **A Proteína Cinase PAK1 está Envolvida na Disseminação das Partículas Envelopadas do Vaccinia virus.** *Apresentação Oral no V Fórum de Microbiologia – ICB/UFMG, 2009.*
3. Andrade,L.G.; Ferreira, P.C.P.; Kroon, E.G.; Bonjardim,C.A. **The Serine/Threonine Kinase PAK1 Plays a Role in Vaccinia virus Enveloped Particles Dissemination.** *Apresentação de Pôster no XIX Encontro Nacional de Virologia, 2008, Caxambu.*
4. Andrade,L.G.; Ferreira, P.C.P.; Kroon, E.G.; Bonjardim,C.A. **O Envolvimento da Proteína Cinase PAK1 na Infecção pelos Orthopoxvírus Vaccinia e Cowpox.** *Apresentação Oral no IV Fórum de Microbiologia – ICB/UFMG, 2008.*

⇒ **PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS:**

1. XX National Meeting of Virology. Brasília, 2009 (Congresso).
2. V Fórum de Microbiologia. Belo Horizonte, 2009 (Encontro).
3. XIX Encontro Nacional de Virologia. Caxambu, 2008 (Congresso).
4. I Simpósio de Genética e Biotecnologia da UFMG. 2008 (Simpósio).
5. IV Fórum de Microbiologia. Belo Horizonte, 2008 (Encontro).

## **X. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:**

Abrahão, J.S., Oliveira, T.M., Campos, R.K., Madureira, M.C., Kroon, E.G., Lobato, Z.I. (2009). Bovine vaccinia outbreaks: detection and isolation of vaccinia virus in milk samples. *Foodborne Pathog Dis* **6**(9),1141-6.

Abrahão, J.S., Silva-Fernandes A.T., Lima, L.S., Campos, R.K., Guedes, M.I., Cota, M.M., Assis, F.L., Borges, I.A., Souza-Júnior, M.F., Lobato, Z.I., Bonjardim, C.A., Ferreira, P.C., Trindade, G.S., Kroon, E.G. (2010). Vaccinia virus infection in monkeys, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis* **16**(6),976-9.

Adam, L., Vadlamudi, R., Mandal, M., Chernoff, J., and Kumar, R. (2000). Regulation of microfilament reorganization and invasiveness of breast cancer cells by kinase dead p21-activated kinase-1. *J Biol Chem* **275**(16), 12041-50.

Alcami, A., Symons, J. A., and Smith, G. L. (2000). The vaccinia virus soluble alpha/beta interferon (IFN) receptor binds to the cell surface and protects cells from the antiviral effects of IFN. *J Virol* **74**(23), 11230-9.

Andrade, A. A., Silva, P. N., Pereira, A. C., De Sousa, L. P., Ferreira, P. C., Gazzinelli, R. T., Kroon, E. G., Ropert, C., and Bonjardim, C. A. (2004). The vaccinia virus-stimulated mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway is required for virus multiplication. *Biochem J* **381**(Pt 2), 437-46.

Andrade, L.G. (2008). O Envolvimento da Proteína Cinase PAK1 na Infecção pelos *Orthopoxvirus Vaccinia* e *Cowpox*. *Dissertação de Mestrado*. Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

Bagrodia, S., and Cerione, R. A. (1999). Pak to the future. *Trends Cell Biol* **9**(9), 350-5.

Beeser, A., Jaffer, Z. M., Hofmann, C., and Chernoff, J. (2005). Role of group A p21-activated kinases in activation of extracellular-regulated kinase by growth factors. *J Biol Chem* **280**(44), 36609-15.

- Benn, J., and Schneider, R. J. (1994). Hepatitis B virus HBx protein activates Ras-GTP complex formation and establishes a Ras, Raf, MAP kinase signaling cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(22), 10350-4.
- Blasco, R., and Moss, B. (1992). Role of cell-associated enveloped vaccinia virus in cell-to-cell spread. *J Virol* **66**(7), 4170-9.
- Bokoch, G. M. (2003). Biology of the p21-activated kinases. *Annu Rev Biochem* **72**, 743-81.
- Bonjardim, C. A. (2005). Interferons (IFNs) are key cytokines in both innate and adaptive antiviral immune responses--and viruses counteract IFN action. *Microbes Infect* **7**(3), 569-78.
- Bonjardim, C. A., Ferreira, P. C. & Kroon, E. G. (2009). Interferons: signaling, antiviral and viral evasion. *Immunol Lett* **122**, 1-11.
- Brown, A., Wang, X., Sawai, E., and Cheng-Mayer, C. (1999). Activation of the PAK-related kinase by human immunodeficiency virus type 1 Nef in primary human peripheral blood lymphocytes and macrophages leads to phosphorylation of a PIX-p95 complex. *J Virol* **73**(12), 9899-907.
- Brown, J. L., Stowers, L., Baer, M., Trejo, J., Coughlin, S., and Chant, J. (1996). Human Ste20 homologue hPAK1 links GTPases to the JNK MAP kinase pathway. *Curr Biol* **6**(5), 598-605.
- Campos, M. A. S. and Kroon, E. G. (1993). Critical period for irreversible block of vaccinia virus replication. *Rev Microbiol.* **24**, 104-110.
- Carter, G. C., Law, M., Hollinshead, M., and Smith, G. L. (2005). Entry of the vaccinia virus intracellular mature virion and its interactions with glycosaminoglycans. *J Gen Virol* **86**(Pt 5), 1279-90.
- Chen, J., and Siddiqui, A. (2007). Hepatitis B virus X protein stimulates the mitochondrial translocation of Raf-1 via oxidative stress. *J Virol* **81**(12), 6757-60.

- Chen, S. Y., Lu, J., Shih, Y. C., and Tsai, C. H. (2002). Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A regulates c-Jun protein through extracellular signal-regulated kinase. *J Virol* **76**(18), 9556-61.
- Chong, C., Tan, L., Lim, L., and Manser, E. (2001). The mechanism of PAK activation. Autophosphorylation events in both regulatory and kinase domains control activity. *J Biol Chem* **276**(20), 17347-53.
- Condit, R. C., and Niles, E. G. (2002). Regulation of viral transcription elongation and termination during vaccinia virus infection. *Biochim Biophys Acta* **1577**(2), 325-36.
- Condit, R. C., Moussatche, N., and Traktman, P. (2006). In a nutshell: structure and assembly of the vaccinia virion. *Adv Virus Res* **66**, 31-124.
- Coras, B., Essbauer, S., Pfeffer, M., Meyer, H., Schroder, J., Stolz, W., Landthaler, M., and Vogt, T. (2005). Cowpox and a cat. *Lancet* **365**(9457), 446.
- da Fonseca, F. G., Silva, R. L., Marques, J. T., Ferreira, P. C., and Kroon, E. G. (1999). The genome of cowpox virus contains a gene related to those encoding the epidermal growth factor, transforming growth factor alpha and vaccinia growth factor. *Virus Genes* **18**(2), 151-60.
- da Fonseca, F. G., Trindade, G. S., Silva, R. L., Bonjardim, C. A., Ferreira, P. C., and Kroon, E. G. (2002). Characterization of a vaccinia-like virus isolated in a Brazilian forest. *J Gen Virol* **83**(Pt 1), 223-8.
- Damaso, C. R., Esposito, J. J., Condit, R. C., and Moussatche, N. (2000). An emergent poxvirus from humans and cattle in Rio de Janeiro State: Cantagalo virus may derive from Brazilian smallpox vaccine. *Virology* **277**(2), 439-49.
- Dave, R. S., McGettigan, J. P., Qureshi, T., Schnell, M. J., Nunnari, G., and Pomerantz, R. J. (2006). siRNA targeting vaccinia virus double-stranded RNA binding protein [E3L] exerts potent antiviral effects. *Virology* **348**(2), 489-97.

- DiPerna, G., Stack, J., Bowie, A. G., Boyd, A., Kotwal, G., Zhang, Z., Arvikar, S., Latz, E., Fitzgerald, K. A., and Marshall, W. L. (2004). Poxvirus protein N1L targets the I-kappaB kinase complex, inhibits signaling to NF-kappaB by the tumor necrosis factor superfamily of receptors, and inhibits NF-kappaB and IRF3 signaling by toll-like receptors. *J Biol Chem* **279**(35), 36570-8.
- Doceul, V., Hollinshead, M., van der Linden, L. & Smith, G. L. (2010). Repulsion of superinfecting virions: a mechanism for rapid virus spread. *Science* **327**, 873-6.
- Dubochet, J., Adrian, M., Richter, K., Garces, J., and Wittek, R. (1994). Structure of intracellular mature vaccinia virus observed by cryoelectron microscopy. *J Virol* **68**(3), 1935-41.
- Dummler, B., Ohshiro, K., Kumar, R. & Field, J. (2009). Pak protein kinases and their role in cancer. *Cancer Metastasis Rev* **28**, 51-63.
- Ehrhardt, C., Kardinal, C., Wurzer, W. J., Wolff, T., von Eichel-Streiber, C., Pleschka, S., Planz, O., and Ludwig, S. (2004). Rac1 and PAK1 are upstream of IKK-epsilon and TBK-1 in the viral activation of interferon regulatory factor-3. *FEBS Lett* **567**(2-3), 230-8.
- Erbs, P., Findeli, A., Kintz, J., Cordier, P., Hoffmann, C., Geist, M., and Balloul, J. M. (2008). Modified vaccinia virus Ankara as a vector for suicide gene therapy. *Cancer Gene Ther* **15**(1), 18-28.
- Eswaran, J., Soundararajan, M., Kumar, R. & Knapp, S. (2008). UnPAKING the class differences among p21-activated kinases. *Trends Biochem Sci* **33**, 394-403.
- Everett, H., and McFadden, G. (2002). Poxviruses and apoptosis: a time to die. *Curr Opin Microbiol* **5**(4), 395-402.
- Fackler, O. T., Lu, X., Frost, J. A., Geyer, M., Jiang, B., Luo, W., Abo, A., Alberts, A. S., and Peterlin, B. M. (2000). p21-activated kinase 1 plays a critical role in cellular activation by Nef. *Mol Cell Biol* **20**(7), 2619-27.

- Fackler, O.T., Kräusslich, H-G. (2006). Interactions of human retroviruses with the host cell cytoskeleton. *Curr opin microbial.* **9**(4),409-15.
- Feng, D. Y., Sun, Y., Cheng, R. X., Ouyang, X. M., and Zheng, H. (2005). Effect of hepatitis C virus nonstructural protein NS3 on proliferation and MAPK phosphorylation of normal hepatocyte line. *World J Gastroenterol* **11**(14), 2157-61.
- Fenner, F. (2000). Adventures with poxviruses of vertebrates. *FEMS Microbiol Rev* **24**(2), 123-33.
- Fenner, F., Wittek, R., Dumbell, K.R. (1989) *The Orthopoxviruses*. 1<sup>a</sup> ed. Academic Press. San Diego, California, 432p.
- Frost, J. A., Khokhlatchev, A., Stippec, S., White, M. A., and Cobb, M. H. (1998). Differential effects of PAK1-activating mutations reveal activity-dependent and -independent effects on cytoskeletal regulation. *J Biol Chem* **273**(43), 28191-8.
- Frost, J. A., Swantek, J. L., Stippec, S., Yin, M. J., Gaynor, R., and Cobb, M. H. (2000). Stimulation of NFkappa B activity by multiple signaling pathways requires PAK1. *J Biol Chem* **275**(26), 19693-9.
- Gada, M.M., Galindo, I., Lorenzo, M.M., Perdiguero, B., Blasco, R. (2001). Movements of vaccinia virus intracellular enveloped virions with GFP tagged to the F13L envelope protein. *J Gen Virol.* **82**(Pt 11), 2747-60.
- Geddes, A. M. (2006). The history of smallpox. *Clin Dermatol* **24**(3), 152-7.
- Gedey, R., Jin, X. L., Hinthong, O., and Shisler, J. L. (2006). Poxviral regulation of the host NF-kappaB response: the vaccinia virus M2L protein inhibits induction of NF-kappaB activation via an ERK2 pathway in virus-infected human embryonic kidney cells. *J Virol* **80**(17), 8676-85.
- Greber, U. F., and Way, M. (2006). A superhighway to virus infection. *Cell* **124**(4), 741-54.

- Harte, M. T., Haga, I. R., Maloney, G., Gray, P., Reading, P. C., Bartlett, N. W., Smith, G. L., Bowie, A., and O'Neill, L. A. (2003). The poxvirus protein A52R targets Toll-like receptor signaling complexes to suppress host defense. *J Exp Med* **197**(3), 343-51.
- Henry, T., Gorvel, J.-P., & Méresse, S. (2006). Molecular motors hijacking by intracellular pathogens. *Cell microbiol* **8**(1), 23-32.
- Hofmann, C., Shepelev, M., and Chernoff, J. (2004). The genetics of Pak. *J Cell Sci* **117**(Pt 19), 4343-54.
- Husain, M., Weisberg, A. S., and Moss, B. (2007). Resistance of a vaccinia virus A34R deletion mutant to spontaneous rupture of the outer membrane of progeny virions on the surface of infected cells. *Virology* **366**(2), 424-32.
- Ishida, H., Li, K., Yi, M., and Lemon, S. M. (2007). p21-activated kinase 1 is activated through the mammalian target of rapamycin/p70 S6 kinase pathway and regulates the replication of hepatitis C virus in human hepatoma cells. *J Biol Chem* **282**(16), 11836-48.
- Jin, S., Zhuo, Y., Guo, W., and Field, J. (2005). p21-activated Kinase 1 (Pak1)-dependent phosphorylation of Raf-1 regulates its mitochondrial localization, phosphorylation of BAD, and Bcl-2 association. *J Biol Chem* **280**(26), 24698-705.
- Johnston, J. B., Barrett, J. W., Chang, W., Chung, C. S., Zeng, W., Masters, J., Mann, M., Wang, F., Cao, J., and McFadden, G. (2003). Role of the serine-threonine kinase PAK-1 in myxoma virus replication. *J Virol* **77**(10), 5877-88.
- Joklik, W. K. (1962). The purification of four strains of poxvirus. *Virology* **18**, 9-18.
- Katz, E., Ward, B. M., Weisberg, A. S., and Moss, B. (2003). Mutations in the vaccinia virus A33R and B5R envelope proteins that enhance release of extracellular virions and eliminate formation of actin-containing microvilli without preventing tyrosine phosphorylation of the A36R protein. *J Virol* **77**(22), 12266-75.
- Kiosses, W. B., Daniels, R. H., Otey, C., Bokoch, G. M., and Schwartz, M. A. (1999). A role for p21-activated kinase in endothelial cell migration. *J Cell Biol* **147**(4), 831-44.

Knaus, U. G., and Bokoch, G. M. (1998). The p21Rac/Cdc42-activated kinases (PAKs). *Int J Biochem Cell Biol* **30**(8), 857-62.

Kolch, W. (2000). Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* **351 Pt 2**, 289-305.

Kumar, R., Gururaj, A. E., and Barnes, C. J. (2006). p21-activated kinases in cancer. *Nat Rev Cancer* **6**(6), 459-71.

Laliberte, J.P., Weisberg, A.S., Moss, B. (2011). The membrane fusion step of vaccinia virus entry is cooperatively mediated by multiple viral proteins and host cell components. *PLoS Pathog* **7**(12), e1002446.

Law, M., Carter, G. C., Roberts, K. L., Hollinshead, M., and Smith, G. L. (2006). Ligand-induced and nonfusogenic dissolution of a viral membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(15), 5989-94.

Lee, S. H., Eom, M., Lee, S. J., Kim, S., Park, H. J., and Park, D. (2001). BetaPix-enhanced p38 activation by Cdc42/Rac/PAK/MKK3/6-mediated pathway. Implication in the regulation of membrane ruffling. *J Biol Chem* **276**(27), 25066-72.

Leisner, T. M., Liu, M., Jaffer, Z. M., Chernoff, J., and Parise, L. V. (2005). Essential role of CIB1 in regulating PAK1 activation and cell migration. *J Cell Biol* **170**(3), 465-76.

Leite, J. A., Drumond, B. P., Trindade, G. S., Lobato, Z. I., da Fonseca, F. G., dos, S. J., Madureira, M. C., Guedes, M. I., Ferreira, J. M., Bonjardim, C. A., Ferreira, P. C., and Kroon, E. G. (2005). Passatempo virus, a vaccinia virus strain, Brazil. *Emerg Infect Dis* **11**(12), 1935-8.

Lu, W., Katz, S., Gupta, R., and Mayer, B. J. (1997). Activation of Pak by membrane localization mediated by an SH3 domain from the adaptor protein Nck. *Curr Biol* **7**(2), 85-94.

Luo, H., Yanagawa, B., Zhang, J., Luo, Z., Zhang, M., Esfandiarei, M., Carthy, C., Wilson, J. E., Yang, D., and McManus, B. M. (2002). Coxsackievirus B3 replication is reduced by

inhibition of the extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway. *J Virol* **76**(7), 3365-73.

Magalhaes, J. C., Andrade, A. A., Silva, P. N., Sousa, L. P., Ropert, C., Ferreira, P. C., Kroon, E. G., Gazzinelli, R. T., and Bonjardim, C. A. (2001). A mitogenic signal triggered at an early stage of vaccinia virus infection: implication of MEK/ERK and protein kinase A in virus multiplication. *J Biol Chem* **276**(42), 38353-60.

Mathew, E., Sanderson, C. M., Hollinshead, M., and Smith, G. L. (1998). The extracellular domain of vaccinia virus protein B5R affects plaque phenotype, extracellular enveloped virus release, and intracellular actin tail formation. *J Virol* **72**(3), 2429-38.

McFadden, G. (2005). Poxvirus tropism. *Nat Rev Microbiol* **3**(3), 201-13.

McIntosh, A. A., and Smith, G. L. (1996). Vaccinia virus glycoprotein A34R is required for infectivity of extracellular enveloped virus. *J Virol* **70**(1), 272-81.

Medaglia, M.L., Pessoa, L.C., Sales, E.R., Freitas, T.R., Damaso, C.R. (2009). Spread of cantagalo virus to northern Brazil. *Emerg Infect Dis* **15**(7),1142-3.

Menard, R. E., and Mattingly, R. R. (2003). Cell surface receptors activate p21-activated kinase 1 via multiple Ras and PI3-kinase-dependent pathways. *Cell Signal* **15**(12), 1099-109.

Mercer, J. & Helenius, A. (2008). Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells. *Science* **320**, 531-5.

Mercer, J. & Helenius, A. (2009). Virus entry by macropinocytosis. *Nat Cell Biol* **11**, 510-20.

Molli, P. R., Li, D. Q., Murray, B. W., Rayala, S. K. & Kumar, R. (2009). PAK signaling in oncogenesis. *Oncogene* **28**, 2545-55.

Moss, B. (1996). Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(21), 11341-8.

Moss, B. (2001) *Poxviridae: the viruses and their replication*. In *Fields Virology*, pp. 2849-2883. Edited by D.M. Knipe & R.C. Conaway. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

Moss, B. (2006). Poxvirus entry and membrane fusion. *Virology* **344**(1), 48-54.

Münter, S., Way, M., and Frischknecht, F. (2006). Signaling during pathogen infection. *Sci STKE* **2006**(335), re5.

Murata, T., Goshima, F., Daikoku, T., Takakuwa, H., and Nishiyama, Y. (2000). Expression of herpes simplex virus type 2 US3 affects the Cdc42/Rac pathway and attenuates c-Jun N-terminal kinase activation. *Genes Cells* **5**(12), 1017-27.

Nagasse-Sugahara, T. K., Kisielius, J. J., Ueda-Ito, M., Curti, S. P., Figueiredo, C. A., Cruz, A. S., Silva, M. M., Ramos, C. H., Silva, M. C., Sakurai, T., and Salles-Gomes, L. F. (2004). Human vaccinia-like virus outbreaks in Sao Paulo and Goias States, Brazil: virus detection, isolation and identification. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **46**(6), 315-22.

Newsome, T. P., Weisswange, I., Frischknecht, F., and Way, M. (2006). Abl collaborates with Src family kinases to stimulate actin-based motility of vaccinia virus. *Cell Microbiol* **8**(2), 233-41.

Nguyen, D. G., Wolff, K. C., Yin, H., Caldwell, J. S., and Kuhen, K. L. (2006). "UnPAKing" human immunodeficiency virus (HIV) replication: using small interfering RNA screening to identify novel cofactors and elucidate the role of group I PAKs in HIV infection. *J Virol* **80**(1), 130-7.

Nunn, M. F., and Marsh, J. W. (1996). Human immunodeficiency virus type 1 Nef associates with a member of the p21-activated kinase family. *J Virol* **70**(9), 6157-61.

Pacheco, A. & Chernoff, J. (2010). Group I p21-activated kinases: emerging roles in immune function and viral pathogenesis. *Int J Biochem Cell Biol* **42**, 13-6.

- Papakonstanti, E. A., and Stournaras, C. (2002). Association of PI-3 kinase with PAK1 leads to actin phosphorylation and cytoskeletal reorganization. *Mol Biol Cell* **13**(8), 2946-62.
- Park, E. R., Eblen, S. T., and Catling, A. D. (2007). MEK1 activation by PAK: a novel mechanism. *Cell Signal* **19**(7), 1488-96.
- Parrini, M. C., Camonis, J., Matsuda, M. & de Gunzburg, J. (2009). Dissecting activation of the PAK1 kinase at protrusions in living cells. *J Biol Chem* **284**, 24133-43.
- Pastoret, P. P., and Vanderplasschen, A. (2003). Poxviruses as vaccine vectors. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **26**(5-6), 343-55.
- Payne, L. G. (1980). Significance of extracellular enveloped virus in the in vitro and in vivo dissemination of vaccinia. *J Gen Virol* **50**(1), 89-100.
- Pelkmans, L. (2005). Viruses as probes for systems analysis of cellular signalling, cytoskeleton reorganization and endocytosis. *Curr opin microbiol* **8**(3), 331-7.
- Pereira, A.C., Leite, F.G., Brasil, B.S., Soares-Martins, J.A., Torres, A.A., Pimenta, P.F., Souto-Padrón, T., Traktman, P., Ferreira, P.C., Kroon, E.G., Bonjardim, C.A. (2012). A vaccinia virus-driven interplay between the MKK4/7-JNK1/2 pathway and cytoskeleton reorganization. *J Virol* **86**(1),172-84.
- Puto, L. A., Pestonjamas, K., King, C. C., and Bokoch, G. M. (2003). p21-activated kinase 1 (PAK1) interacts with the Grb2 adapter protein to couple to growth factor signaling. *J Biol Chem* **278**(11), 9388-93.
- Quixabeira-Santos, J.C., Medaglia, M.L., Pescador, C.A., Damaso, C.R. (2011). Animal movement and establishment of vaccinia virus Cantagalo strain in Amazon biome, Brazil. *Emerg Infect Dis* **17**(4),726-9.
- Rahaus, M., Desloges, N., and Wolff, M. H. (2004). Replication of varicella-zoster virus is influenced by the levels of JNK/SAPK and p38/MAPK activation. *J Gen Virol* **85**(Pt 12), 3529-40.

Rietdorf, J., Ploubidou, A., Reckmann, I., Holmstrom, A., Frischknecht, F., Zettl, M., Zimmermann, T., and Way, M. (2001). Kinesin-dependent movement on microtubules precedes actin-based motility of vaccinia virus. *Nat Cell Biol* **3**(11), 992-1000.

Roberts, K. L., & Smith, G. L. (2008). Vaccinia virus morphogenesis and dissemination. *Trends microbiol* **16**(10), 472-9.

Roberts, K. L. et al. (2009). Acidic residues in the membrane-proximal stalk region of vaccinia virus protein B5 are required for glycosaminoglycan-mediated disruption of the extracellular enveloped virus outer membrane. *J Gen Virol* **90**, 1582-91.

Roper, R. L., Wolffe, E. J., Weisberg, A., and Moss, B. (1998). The envelope protein encoded by the A33R gene is required for formation of actin-containing microvilli and efficient cell-to-cell spread of vaccinia virus. *J Virol* **72**(5), 4192-204.

Rottner, K., & Stradal, T. E. B. (2009). Poxviruses taking a ride on actin: new users of known hardware. *Cell host & microbe* **6**(6), 497-9.

Sanderson, C. M., and Smith, G. L. (1998). Vaccinia virus induces Ca<sup>2+</sup>-independent cell-matrix adhesion during the motile phase of infection. *J Virol* **72**(12), 9924-33.

Sanderson, C. M., and Smith, G. L. (1999). Cell motility and cell morphology: how some viruses take control. *Expert Rev Mol Med* **1999**, 1-16.

Sanderson, C. M., Way, M., and Smith, G. L. (1998). Virus-induced cell motility. *J Virol* **72**(2), 1235-43.

Sandgren, K.J., Wilkinson, J., Miranda-Saksena, M., McInerney, G.M., Byth-Wilson, K., Robinson, P.J., Cunningham, A.L. (2010). A differential role for macropinocytosis in mediating entry of the two forms of vaccinia virus into dendritic cells. *PLoS Pathog* **6**, e1000866.

Scaplehorn, N., Holmstrom, A., Moreau, V., Frischknecht, F., Reckmann, I., and Way, M. (2002). Grb2 and Nck act cooperatively to promote actin-based motility of vaccinia virus. *Curr Biol* **12**(9), 740-5.

Schepis, A., Schramm, B., de Haan, C. A., and Locker, J. K. (2006). Vaccinia virus-induced microtubule-dependent cellular rearrangements. *Traffic* **7**(3), 308-23.

Schmidt, F. I., Bleck, C. K. E., Helenius, A., & Mercer, J. (2011). Vaccinia extracellular virions enter cells by macropinocytosis and acid-activated membrane rupture. *EMBO J* **26**;30(17),3647-61.

Schramm, B., de Haan, C. A., Young, J., Doglio, L., Schleich, S., Reese, C., Popov, A. V., Steffen, W., Schroer, T., and Locker, J. K. (2006). Vaccinia-virus-induced cellular contractility facilitates the subcellular localization of the viral replication sites. *Traffic* **7**(10), 1352-67.

Schurmann, A., Mooney, A. F., Sanders, L. C., Sells, M. A., Wang, H. G., Reed, J. C., and Bokoch, G. M. (2000). p21-activated kinase 1 phosphorylates the death agonist bad and protects cells from apoptosis. *Mol Cell Biol* **20**(2), 453-61.

Seet, B. T., Johnston, J. B., Brunetti, C. R., Barrett, J. W., Everett, H., Cameron, C., Sypula, J., Nazarian, S. H., Lucas, A., and McFadden, G. (2003). Poxviruses and immune evasion. *Annu Rev Immunol* **21**, 377-423.

Sells, M. A., Boyd, J. T., and Chernoff, J. (1999). p21-activated kinase 1 (Pak1) regulates cell motility in mammalian fibroblasts. *J Cell Biol* **145**(4), 837-49.

Sells, M. A., Knaus, U. G., Bagrodia, S., Ambrose, D. M., Bokoch, G. M., and Chernoff, J. (1997). Human p21-activated kinase (Pak1) regulates actin organization in mammalian cells. *Curr Biol* **7**(3), 202-10.

Senkevich, T. G., Ojeda, S., Townsley, A., Nelson, G. E., and Moss, B. (2005). Poxvirus multiprotein entry-fusion complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(51), 18572-7.

Sharma-Walia, N., Krishnan, H. H., Naranatt, P. P., Zeng, L., Smith, M. S., and Chandran, B. (2005). ERK1/2 and MEK1/2 induced by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (human herpesvirus 8) early during infection of target cells are essential for expression of viral genes and for establishment of infection. *J Virol* **79**(16), 10308-29.

Shen, Y., and Nemunaitis, J. (2005). Fighting cancer with vaccinia virus: teaching new tricks to an old dog. *Mol Ther* **11**(2), 180-95.

Silva, P. N., Soares, J. A., Brasil, B. S., Nogueira, S. V., Andrade, A. A., de Magalhaes, J. C., Bonjardim, M. B., Ferreira, P. C., Kroon, E. G., Bruna-Romero, O., and Bonjardim, C. A. (2006). Differential role played by the MEK/ERK/EGR-1 pathway in orthopoxviruses vaccinia and cowpox biology. *Biochem J* **398**(1), 83-95.

Silva-Fernandes, A.T., Travassos, C.E., Ferreira, J.M., Abrahão, J.S., Rocha, E.S., Viana-Ferreira, F., dos Santos, J.R., Bonjardim, C.A., Ferreira, P.C., Kroon, E.G. (2009). Natural human infections with Vaccinia virus during bovine vaccinia outbreaks. *J Clin Virol* **44**(4),308-13.

Singh, R. R., Song, C., Yang, Z., and Kumar, R. (2005). Nuclear localization and chromatin targets of p21-activated kinase 1. *J Biol Chem* **280**(18), 18130-7.

Smith, G. L., and Law, M. (2004). The exit of vaccinia virus from infected cells. *Virus Res* **106**(2), 189-97.

Smith, G. L., and McFadden, G. (2002). Smallpox: anything to declare? *Nat Rev Immunol* **2**(7), 521-7.

Smith, G. L., Murphy, B. J., and Law, M. (2003). Vaccinia virus motility. *Annu Rev Microbiol* **57**, 323-42.

Smith, G. L., Vanderplasschen, A., and Law, M. (2002). The formation and function of extracellular enveloped vaccinia virus. *J Gen Virol* **83**(Pt 12), 2915-31.

Snapper, S. B., Takeshima, F., Antón, I., Liu, C. H., Thomas, S. M., Nguyen, D., Dudley, D., et al. (2001). N-WASP deficiency reveals distinct pathways for cell surface projections and microbial actin-based motility. *Nat cell biol* **3**(10), 897-904.

Soares, J. A. et al. (2009). Activation of the PI3K/Akt pathway early during vaccinia and cowpox virus infections is required for both host survival and viral replication. *J Virol* **83**, 6883-99.

Soares, J.A.P. (2007). Os Orthopoxvirus Cowpox e Vaccinia regulam temporalmente a ativação das vias sinalizadoras MKK/JNK/JUN e PI3K/AKT. Implicações para a biologia viral. *Tese de Doutorado*. Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

Stack, J., Haga, I. R., Schroder, M., Bartlett, N. W., Maloney, G., Reading, P. C., Fitzgerald, K. A., Smith, G. L., and Bowie, A. G. (2005). Vaccinia virus protein A46R targets multiple Toll-like-interleukin-1 receptor adaptors and contributes to virulence. *J Exp Med* **201**(6), 1007-18.

Tang, Y., Yu, J., and Field, J. (1999). Signals from the Ras, Rac, and Rho GTPases converge on the Pak protein kinase in Rat-1 fibroblasts. *Mol Cell Biol* **19**(3), 1881-91.

Taylor, J. M., and Barry, M. (2006). Near death experiences: poxvirus regulation of apoptotic death. *Virology* **344**(1), 139-50.

ten Klooster, J. P., Jaffer, Z. M., Chernoff, J., and Hordijk, P. L. (2006). Targeting and activation of Rac1 are mediated by the exchange factor beta-Pix. *J Cell Biol* **172**(5), 759-69.

Thiel, D. A., Reeder, M. K., Pfaff, A., Coleman, T. R., Sells, M. A., and Chernoff, J. (2002). Cell cycle-regulated phosphorylation of p21-activated kinase 1. *Curr Biol* **12**(14), 1227-32.

Townsley, A. C., and Moss, B. (2007). Two distinct low-pH steps promote entry of vaccinia virus. *J Virol* **81**(16), 8613-20.

Townsley, A. C., Weisberg, A. S., Wagenaar, T. R., and Moss, B. (2006). Vaccinia virus entry into cells via a low-pH-dependent endosomal pathway. *J Virol* **80**(18), 8899-908.

Trindade, G. S., da Fonseca, F. G., Marques, J. T., Diniz, S., Leite, J. A., De Bodt, S., Van der Peer, Y., Bonjardim, C. A., Ferreira, P. C., and Kroon, E. G. (2004). Belo Horizonte virus: a vaccinia-like virus lacking the A-type inclusion body gene isolated from infected mice. *J Gen Virol* **85**(Pt 7), 2015-21.

Trindade, G. S., Emerson, G. L., Carroll, D. S., Kroon, E. G., and Damon, I. K. (2007<sup>a</sup>). Brazilian vaccinia viruses and their origins. *Emerg Infect Dis* **13**(7), 965-72.

Trindade, G. S., Lobato, Z. I., Drumond, B. P., Leite, J. A., Trigueiro, R. C., Guedes, M. I., da Fonseca, F. G., dos Santos, J. R., Bonjardim, C. A., Ferreira, P. C., and Kroon, E. G. (2006). Short report: Isolation of two vaccinia virus strains from a single bovine vaccinia outbreak in rural area from Brazil: Implications on the emergence of zoonotic orthopoxviruses. *Am J Trop Med Hyg* **75**(3), 486-90.

Trindade, G.S., da Fonseca, F. G., Marques, J. T., Nogueira, M. L., Mendes, L. C., Borges, A. S., Peiro, J. R., Pituco, E. M., Bonjardim, C. A., Ferreira, P. C., and Kroon, E. G. (2003). Aracatuba virus: a vaccinia-like virus associated with infection in humans and cattle. *Emerg Infect Dis* **9**(2), 155-60.

Trindade, G.S., Drumond, B. P., Guedes, M. I., Leite, J. A., Mota, B. E., Campos, M. A., da Fonseca, F. G., Nogueira, M. L., Lobato, Z. I., Bonjardim, C. A., Ferreira, P. C., and Kroon, E. G. (2007<sup>b</sup>). Zoonotic vaccinia virus infection in Brazil: clinical description and implications for health professionals. *J Clin Microbiol* **45**(4), 1370-2.

Trindade, G.S., Guedes, M.I., Drumond, B.P., Mota, B.E., Abrahão, J.S., Lobato, Z.I., Gomes, J.A., Corrêa-Oliveira, R., Nogueira, M.L., Kroon, E.G., da Fonseca, F.G. (2009). Zoonotic vaccinia virus: clinical and immunological characteristics in a naturally infected patient. *Clin Infect Dis* **1;48**(3), e37-40.

Ulaeto, D., Grosenbach, D., and Hruby, D. E. (1996). The vaccinia virus 4c and A-type inclusion proteins are specific markers for the intracellular mature virus particle. *J Virol* **70**(6), 3372-7.

Vadlamudi, R. K., Li, F., Barnes, C. J., Bagheri-Yarmand, R., and Kumar, R. (2004). p41-Arc subunit of human Arp2/3 complex is a p21-activated kinase-1-interacting substrate. *EMBO Rep* **5**(2), 154-60.

Valderrama, F., Cordeiro, J. V., Schleich, S., Frischknecht, F., and Way, M. (2006). Vaccinia virus-induced cell motility requires F11L-mediated inhibition of RhoA signaling. *Science* **311**(5759), 377-81.

Van den Broeke, C. et al. (2009). Alphaherpesvirus US3-mediated reorganization of the actin cytoskeleton is mediated by group A p21-activated kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 8707-12.

Van den Broeke, C., Radu, M., Chernoff, J. & Favoreel, H. W. (2010). An emerging role for p21-activated kinases (Paks) in viral infections. *Trends Cell Biol* **20**, 160-9.

Wang, F., Ma, Y., Barrett, J. W., Gao, X., Loh, J., Barton, E., Virgin, H. W., and McFadden, G. (2004). Disruption of Erk-dependent type I interferon induction breaks the myxoma virus species barrier. *Nat Immunol* **5**(12), 1266-74.

Wang, G., Barrett, J. W., Stanford, M., Werden, S. J., Johnston, J. B., Gao, X., Sun, M., Cheng, J. Q., and McFadden, G. (2006). Infection of human cancer cells with myxoma virus requires Akt activation via interaction with a viral ankyrin-repeat host range factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**(12), 4640-5.

Ward, B. M., and Moss, B. (2004). Vaccinia virus A36R membrane protein provides a direct link between intracellular enveloped virions and the microtubule motor kinesin. *J Virol* **78**(5), 2486-93.

Ward, B. M. (2005). The longest micron; transporting poxviruses out of the cell. *Cell microbiol* **7**(11), 1531-8.

Weisswange, I., Newsome, T. P., Schleich, S., & Way, M. (2009). The rate of N-WASP exchange limits the extent of ARP2/3-complex-dependent actin-based motility. *Nature* **458**(7234), 87-91.

Werden, S. J., and McFadden, G. (2008). The role of cell signaling in poxvirus tropism: The case of the M-T5 host range protein of myxoma virus. *Biochim Biophys Acta* **1784**(1), 228-37.

Wolf, D., Witte, V., Laffert, B., Blume, K., Stromer, E., Trapp, S., d'Aloja, P., Schurmann, A., and Baur, A. S. (2001). HIV-1 Nef associated PAK and PI3-kinases stimulate Akt-independent Bad-phosphorylation to induce anti-apoptotic signals. *Nat Med* **7**(11), 1217-24.

Wolffe, E. J., Vijaya, S., and Moss, B. (1995). A myristylated membrane protein encoded by the vaccinia virus L1R open reading frame is the target of potent neutralizing monoclonal antibodies. *Virology* **211**(1), 53-63.

Wong, W. R., Chen, Y. Y., Yang, S. M., Chen, Y. L., and Horng, J. T. (2005). Phosphorylation of PI3K/Akt and MAPK/ERK in an early entry step of enterovirus 71. *Life Sci* **78**(1), 82-90.

Yang, X., and Gabuzda, D. (1999). Regulation of human immunodeficiency virus type 1 infectivity by the ERK mitogen-activated protein kinase signaling pathway. *J Virol* **73**(4), 3460-6.

Yang, Z., Vadlamudi, R. K., and Kumar, R. (2005). Dynein light chain 1 phosphorylation controls macropinocytosis. *J Biol Chem* **280**(1), 654-9.

Ye, D.Z., Jin, S., Zhuo, Y., Field, J. (2011). p21-Activated kinase 1 (Pak1) phosphorylates BAD directly at serine 111 in vitro and indirectly through Raf-1 at serine 112. *PLoS One* **6**(11), e27637.

Zhang, W. H., Wilcock, D., and Smith, G. L. (2000). Vaccinia virus F12L protein is required for actin tail formation, normal plaque size, and virulence. *J Virol* **74**(24), 11654-62.

Zhao, Z. S., and Manser, E. (2005). PAK and other Rho-associated kinases--effectors with surprisingly diverse mechanisms of regulation. *Biochem J* **386**(Pt 2), 201-14.

Zhou, G. L., Zhuo, Y., King, C. C., Fryer, B. H., Bokoch, G. M., and Field, J. (2003). Akt phosphorylation of serine 21 on Pak1 modulates Nck binding and cell migration. *Mol Cell Biol* **23**(22), 8058-69.