

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Microbiologia
Laboratório de Vírus
Grupo de Transdução de Sinal/Orthopoxvírus

Tese de Doutorado

**Modulação da via das MAPKs pelo *Vaccinia virus*: envolvimento da
proteína viral B14 e papel das proteínas celulares JNK e Spir-1**

Alice Abreu Torres

Belo Horizonte, Janeiro de 2016

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Microbiologia
Laboratório de Vírus
Grupo de Transdução de Sinal/Orthopoxvírus

Modulação da via das MAPKs pelo *Vaccinia virus*: envolvimento da proteína viral B14 e papel das proteínas celulares JNK e Spir-1

Alice Abreu Torres

Tese apresentada como requisito para a obtenção do título de doutor em Ciências Biológicas (Microbiologia) no Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Antônio Bonjardim

Belo Horizonte, Janeiro de 2016

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Cláudio, pela confiança e orientação durante o desenvolvimento deste trabalho, pelo incentivo e pelas sábias palavras nos momentos difíceis, bem como pela convivência ao longo dos meus quase 10 anos de Laboratório de Vírus;

À Profa. Erna, À Profa. Giliane, ao Prof. Paulo e ao Prof. Jônatas, pelos bons conselhos e discussões ao longo dessa caminhada, pela disponibilidade em ajudar, pelo compromisso em manter o laboratório um lugar agradável e de aprendizado para os alunos;

Ao Prof. Geoffrey L. Smith, por ter aberto as portas do seu laboratório na Universidade de Cambridge, durante meu ano de doutorado sanduíche, e ter me dado a oportunidade de vivenciar como se faz ciência fora do Brasil;

À Profa. Marisa B. Bonjardim por ter me apresentado ao Laboratório de Vírus e pela agradável convivência fora dele;

À Ângela, ao João, à Ildinha, à Andreza e a Gisele, que foram os verdadeiros responsáveis pelo bom andamento e funcionamento do laboratório durante esses últimos anos;

Aos Dr. Breno Silva, Dr. José Carlos Magalhães, Dra. Catherine Ropert e Dr. Jônatas Abrahão, pela disponibilidade em compor a banca examinadora; e ao Dr. Danilo Bretas, pela ajuda como relator;

Ao Prof. Aristóbolo e a Fernanda, pela ajuda na realização dos ensaios de gene repórter;

À Dra. Flávia G. Gomes Leite, pela ótima “mãe” que foi, responsável por me ensinar tudo que eu sei sobre células, vírus e transdução de sinal, e por ter se tornado uma verdadeira fonte de inspiração. Pela amiga que é hoje em dia e pela ótima companhia, seja em terras brasileiras ou inglesas;

Ao Dr. Jonas D. Albarnaz, pela colaboração fundamental na realização deste trabalho, tanto na realização de experimentos, quanto na discussão de resultados e consultas sobre dúvidas. Ao namorado Jonas, por compreender todas as minhas angústias e ter me dado forças pra continuar nos momentos mais complicados, pelo carinho, amizade e amor que tem dedicado a mim, mesmo de longe. Você foi metade das minhas mãos na execução deste trabalho, e acabou por conseguir roubar meu coração!

Aos demais GTS, de hoje (Luís, Mari, Hugo, Camila, Claudiney, Nídia e Jônatas) e de ontem (Bruninho, Léo, vovó Lina, Jamas, Breno, Lú Garcia, Marcelão, André da Bahia, Rafa, Eric, Aline, Thaís, Paloma, Camila, entre tantos outros...), pelos ensinamentos, pelo companheirismo, pelas discussões nas reuniões GTS e pela ajuda durante o desenvolvimento deste trabalho;

Às pretties que me abandonaram no laboratório, Gisele Olinto, Marcela Menezes, Marieta Assis e Flávia Viana, pela amizade que perdura até hoje, com direito a muitas risadas e risoto, quando conseguimos nos reunir;

Aos demais amigos Labvirianos antigos, pelas gargalhadas e lágrimas compartilhadas, tornando o Laboratório a nossa segunda casa, e principalmente, pelas boas lembranças que vou sempre carregar comigo;

Aos amigos Labvirianos de hoje, por fazerem das nossas obrigações diárias, momentos de descontração, pela convivência agradável no laboratório, nos almoços e nos cafés. À Lud, Grazi, Rafa, Paulo e Julinha, por terem tornado o meu último de ano de doutorado menos pesado e mais prazeroso, por dividirem comigo as dúvidas e aflições sobre “2016”, e pelas risadas compartilhadas no nosso dia a dia;

Aos amigos do Smith lab, que tornaram meu ano em Cambridge “lovely”, regado a muitos pub, salsa, “tea time” e principalmente, muito trabalho e discussões;

À Zamira, minha flatmate, pela companhia durante o ano em Cambridge, e pela amiga que se tornou;

À Dra. Lorena Falabela, ou Ló, amiga dos tempos da bio, pelas conversas durante o almoço, pela ajuda e pelos conselhos;

Aos demais amigos da bio (em especial ao René, Lígia, Má, Renatinha e Vivis), colegas do departamento e outros amigos, por sempre torcerem por mim;

Aos meus familiares, por serem sempre um exemplo;

As minhas irmãs, por serem sempre a minha força, inspiração e coragem;

Aos meus pais, pelo amor, por acreditarem em mim e pelo apoio incondicional, mesmo sem entenderem nada do que eu estudo. Essa tese é dedicada a vocês!

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	IV
SUMÁRIO.....	VII
LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	X
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XII
RESUMO.....	XV
ABSTRACT.....	XVI
I. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	1
1. Os Poxvírus.....	1
1.1. Histórico e Perspectivas.....	1
1.2. Família Poxviridae.....	2
2. Aspectos Gerais da Biologia dos Poxvírus.....	4
2.1. Morfologia.....	4
2.2. Genoma.....	6
2.3. Ciclo de multiplicação dos Poxvírus.....	8
2.3.1. Formação das caudas de actina induzidas pelo VACV..	12
3. Interação Vírus-Hospedeiro.....	14
3.1. MAPK/AP-1 e sua regulação pelo VACV.....	15
3.1.1. MAPK (Proteínas Cinases Ativadas Por Mitógenos).....	15
3.1.1.2. Cinases c-Jun amino terminal (JNK1/2).....	18
3.1.2. AP-1.....	19
3.1.3. Spir-1.....	21
3.1.4. Modulação das MAPKs pelo VACV.....	25
3.2. NF-κB e mecanismos de evasão do VACV.....	28
3.2.1. NF-κB.....	28
3.2.2. Inibição da via de NF-κB pelo VACV.....	31
3.2.2.1. Família de proteínas do tipo Bcl-2.....	31
3.2.2.2. Proteínas do tipo Bcl-2 que inibem NF-κB.....	33
II. JUSTIFICATIVA.....	37
III. OBJETIVOS.....	39
1. Objetivo Geral	39
2. Objetivos Específicos.....	39
IV. MATERIAL E MÉTODOS.....	40

1. Células.....	40
1.1. Células BSC-40 e BSC -1	40
1.2. Células HeLa.....	40
1.3. Células HEK293T.....	40
1.4. Células selvagem e deficiente para JNK1/2	40
1.5. Células selvagem e deficiente para Spir-1.....	41
1.6. Células RK-13.....	41
2. Vírus.....	41
2.1. Produção dos estoques virais.....	41
2.2. Purificação viral.....	42
2.3. Titulação viral.....	42
3. Anticorpos e drogas.....	43
4. Silenciamento de Spir-1 por siRNA.....	43
5. Infecção.....	44
6. Extração de Proteínas Totais.....	44
7. Transferência de Western.....	45
8. Imunoprecipitação.....	45
9. Ensaio de Fenótipo de Placa de Lise Viral.....	46
10. Ensaio de Gene Repórter.....	46
11. Microscopia de Fluorescência.....	48
12. Análise Estatística.....	49
V. RESULTADOS.....	50
1. Caracterização da modulação das MAPKs pelo VACV.....	50
1.1. Padronização do Ensaio de Gene Repórter para AP-1.....	50
1.2. Avaliação da regulação de AP-1 por proteínas do VACV.....	53
1.3. Análise da contribuição de B14 para a ativação da via das MAPKs/AP-1.....	59
2. Avaliação do papel da MAPK JNK e do nucleador de actina Spir-1 na formação de caudas de actina induzidas pelo VACV.....	68
2.1. Análise da interação da MAPK JNK com Spir-1 durante a infecção.....	68
2.2. Avaliação do papel de Spir-1 na multiplicação do VACV.....	71
2.3. Avaliação do papel de Spir-1 na disseminação do VACV.....	73

2.4. Análise da contribuição da MAPK JNK e de Spir-1 para o tamanho das caudas de actina induzidas pelo VACV.....	80
VI. DISCUSSÃO.....	82
1. Caracterização da modulação das MAPKs pelo VACV.....	83
2. Avaliação do papel da MAPK JNK e do nucleador de actina Spir-1 na formação de caudas de actina induzidas pelo VACV.....	91
VII. CONCLUSÕES.....	96
VIII. PERSPECTIVAS.....	97
IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Tabela 1. Plasmídeos utilizados nos ensaios de imunoprecipitação e gene repórter.....	47
Figura 1. Morfologia da partícula viral dos Orthopoxvirus.....	5
Figura 2. Representação esquemática do genoma dos Orthopoxvirus.....	7
Figura 3. Ciclo de Multiplicação do VACV.....	10
Figura 4. Formação das caudas de actina pelo VACV.....	13
Figura 5. Esquema da via das MAPKs.....	16
Figura 6. Fator transcricional AP-1.....	20
Figura 7. Domínios da proteína Spir-1.....	22
Figura 8. Mecanismo de nucleação de actina por Spir-1.....	22
Figura 9. Modulação das MAPKs pelo VACV.....	26
Figura 10. Ativação da via de NF- κ B.....	29
Figura 11. Inibição da via de NF- κ B pelo VACV.....	32
Figura 12. AP-1 é induzido pelo PMA em células HeLa e HEK.....	51
Figura 13. AP-1 é induzido pela proteínas A52, B14 e K7 do VACV, em células HeLa e HEK.....	54
Figura 14. AP-1 é diferencialmente induzido por mutantes de VACV.....	58
Figura 15. B14 induz a ativação de AP-1 de maneira dose-dependente.....	60
Figura 16. B14 é necessário para a máxima ativação de AP-1 após infecção pelo VACV, independente da moi utilizada.....	62
Figura 17. A Ativação de AP-1 induzida por B14 é dependente das MAPKs ERK e JNK.....	64
Figura 18. Contribuição de B14 para ativação das MAPKs após a transfecção.....	65
Figura 19. Contribuição de B14 para ativação das MAPKs após a infecção.....	67
Figura 20. JNK associa com o nucleador de actina Spir-1 durante a infeção pelo VACV.....	69
Figura 21. A multiplicação do VACV não é afetada em células deficientes para Spir-1.....	72

Figura 22. A placa de lise viral é afetada em células deficientes para Spir-1.....	74
Figura 23. O número de caudas de actina é reduzido em MEFs deficientes para Spir-1.....	75
Figura 24. O silenciamento de Spir-1 em células HeLa não afeta a multiplicação do VACV.....	77
Figura 25. O silenciamento de Spir-1 afeta a formação de caudas de actina em células HeLa.....	79
Figura 26. O comprimento das caudas de actina é afetado na ausência de JNK e Spir-1.....	81

LISTA DE ABREVIATURAS

AP-1: Proteína Ativadora-1

ARP: Proteína Relacionada a Actina

ASK: Cinase Reguladora Da Sinalização De Apoptose

ATF: Fator de Ativação Transcricional

ATP: Adenosina Trifosfato

Bcl-2: Linfoma de Célula B 2

BSA: Albumina Bovina Sérica

c-Fos: Fator de Transcrição c-Fos

c-Jun: Fator de Transcrição c-Jun

CDC: Centro de Controle e Prevenção de Doenças (EUA)

Cdc42: Proteína de Controle de divisão Celular 42

CEV: Vírus Envelopado associado à Célula

CO₂: dióxido de carbono

CPXV: *Cowpox virus*

CRE: Elemento de Resposta a cAMP

CREB: Proteína de ligação a CRE

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DMEM: Meio Mínimo de Eagle, modificado por Dulbecco

DNA: Ácido Desoxirribonucléico

DTT: Ditioneitol

ECP: Efeito Citopático

EDTA: Ácido Etilenodiaminotetracético

EEV: Vírus Envelopado Extracelular

EGF: Fator de Crescimento Epidérmico

Egr-1: Gene de Resposta Precoce ao Crescimento

ERK: Proteína Cinase Ativada por Sinal Extracelular

EUA: Estados Unidos da América

GAG: Proteínas Glicosaminoglicanas

GAPDH: Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase

GFP: Proteína Verde Fluorescente

GTP: Guanosina trifosfato

GTPase: Enzima Hidrolisadora de GTP

H.p.i.: Horas pós-infecção
HA: Hemaglutinina
HCV: Hepatitis C virus
HOIL-1:IRP2 Ubiquitina Ligase Heme-Oxidada 1
HOIP-1: Proteína De Interação a HOIL1
IEV: Vírus Envelopado Intracelular
IFN: Interferon
IL: Interleucina
IMV: Vírus Maduro Intracelular
IP: Imunoprecipitação
IRAK: Cinase Associada Ao Receptor De IL-1
IRF: Fator Regulador de Interferon
ITR: Inversões Terminais Repetitivas
IV: Vírus Imaturos
IκB: Inibidores de κB
JNK: Proteína Cinase c-Jun Amino-Terminal
Kb: Kilobases
kDA: Kilodalton
LPS: Lipolissacarídeo
LUBAC: Complexo De Montagem De Cadeia De Ubiquitina Linear
LZD: Domínios Zipper De Leucina
M.O.I: Multiplicidade de Infecção
MAF: Fibrosarcoma Musculoaponeurótica
MAPK: Proteína Cinase Ativada por Mitógenos
MEF: Fibroblasto Embrionário de Camundongo
MEM: Meio Essencial Mínimo
MPXV: *Monkeypox virus*
MVA: *Vaccinia Modificado Ankara*
MyD88:Fator De Diferenciação Mielóide 88
NCK: Região Não Catalítica De Tirosina Cinase
NEMO: Modulador Essencial De NF-κB
NF-κB: Fator Nuclear κB
OMS: Organização Mundial de Saúde

ORF: Janela Aberta de Leitura
PAK1: Proteína Quinase 1 ativada por p21
PAMP: Padrões Moleculares Associados a Patógenos
PBS: Solução Salina Tamponada com Fosfato
pfu: Unidade Formadora de Placa
PMA: Forbol 12-Miristato 13-Acetato
PRR: Receptores De Reconhecimento De Padrões Moleculares
RNA: Ácido Ribonucléico
RNA_m: RNA Mensageiro
RPM: Rotações por Minuto
SAPK: Proteína Cinase Ativada por Estresse
SDS: Duodecil Sulfato de Sódio
SFB: Soro Fetal Bovino
SHARPIN: Proteína De Interação Ao Domínio RH Associado a SHANK
siRNA: RNA de interferência
TAK: Cinase Ativada pelo Fator Transformante de Crescimento- β
TAP: Purificação em Sequência por Afinidade
TLR: Receptor do Tipo Toll
TNF: Fator de Necrose Tumoral
TPL-2: Locus Da Progressão De Tumor 2
TRAF: Fator Associado Ao Receptor Do Fator De Necrose Tumoral
TRE: Elemento de Reposta a TPA
UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais
UV: Luz Ultra Violeta
VACV: *Vaccinia virus*
VARV: *Variola virus*
VGF: Fator de Crescimento do *Vaccinia virus*
VZV: *Varicela-Zoster virus*
WASP: Proteína da Síndrome de Wiskott–Aldrich;
WIP: Proteína de Interação com WASP
WR: Western Reserve
WT: “*Wild type*” (selvagem)

RESUMO

O sucesso da replicação do genoma dos vírus e da geração de sua progênie depende tanto da subversão das vias sinalizadoras celulares a favor desses microrganismos, como da evasão das respostas antivirais do hospedeiro. Assim, sabe-se que o *Vaccinia virus* (VACV) é capaz de ativar a via das MAPKs/AP-1, e codifica diversas proteínas imunomodulatórias, incluindo inibidores de NF-κB, em prol da sua multiplicação e disseminação. Ao contrário de NF-κB, pouco ainda se sabe sobre a regulação das MAPK/AP-1 pelo VACV. Sabendo que ambos os fatores transcricionais podem ser ativados por proteínas em comum, nós avaliamos o papel de seis proteínas que inibem NF-κB, expressas pelo VACV (A46, A49, A52, B14, K7 e N1), na modulação de MAPK/AP-1. Nossos resultados demonstraram a contribuição de A52, B14 e K7 na ativação de AP-1, tanto expressas isoladamente, quanto em células infectadas com VACV deletados para os genes A52R, B14R (VACV-delB14) e K7R, respectivamente. Em seguida, focamos o nosso estudo em B14, uma vez que essa proteína pareceu ter a maior capacidade de estimular AP-1. B14 parece contribuir para ativação das MAPKs durante a infecção pelo VACV, mais especificamente de JNK e de seus substratos c-Jun e ATF-2, cujos níveis de fosforilação foram reduzidos durante a infecção com VACV-delB14 quando comparado ao VACV selvagem. Sobre o papel biológico de JNK para o ciclo de multiplicação do VACV, sabe-se que essa MAPK não é importante para sua multiplicação, mas para sua disseminação, afetando a reorganização do citoesqueleto e o número de caudas de actina induzidas durante a infecção. Para melhor entender o mecanismo pelo qual JNK estaria regulando a formação dessas caudas, investigamos o papel do nucleador de actina Spir-1, a qual pode atuar como substrato de JNK. Por co-imunoprecipitação, mostramos que JNK e Spir-1 se associam durante a infecção. Além disso, assim como observado para JNK, a multiplicação viral não foi afetada em fibroblastos embrionários murinos (MEFs) deficientes em Spir-1 e em células HeLa transfectadas com siRNA de Spir-1, mas a formação das caudas de actina pelo VACV foi reduzida nesses dois modelos celulares quando comparados aos MEFs selvagens ou células HeLa transfectadas com siRNA controle, respectivamente. Também observamos que a deficiência tanto de JNK como de Spir-1 leva a uma redução no tamanho dessas caudas de actina. Em conjunto, nossos resultados acrescentam o envolvimento de novos componentes virais na modulação da vias das MAPKs pelo VACV, e também ajudam a esclarecer mecanismos adicionais pelos quais a via de JNK pode contribuir para o sucesso da multiplicação viral.

Palavras-chave: *Vaccinia virus*; MAPK/AP-1; B14; Spir-1; cauda de actina

ABSTRACT

A successful viral replication relies both on cell signaling pathways subversion and evasion from host antiviral responses. Therefore, in favor of its replication and spread, Vaccinia virus (VACV) is well known for its ability to activate MAPK/AP-1 pathway, as well as to encode several immunomodulatory proteins including many NF- κ B inhibitors. Unlike NF- κ B, little is known about the MAPK/AP-1 modulation during VACV infection. Knowing that both transcriptional factors share upstream activators, we have decided to investigate whether six known VACV inhibitors of NF- κ B (A46, A49, A52, B14, K7 and N1) also have a role on MAPK/AP-1 modulation. Our results showed that A52, B14 and K7 proteins were able to activate the AP-1, both during cell transfection and infection with VACV knockout for A52R, B14R (VACV-delB14) and K7R genes, respectively. We focused our study on the viral protein B14 once it had the major ability of AP-1 stimulation. B14 is able to activate the MAPK during VACV infection, specifically JNK and its substrates c-Jun and ATF-2, since the phosphorylation of these three proteins is reduced during infection with VACV-delB14 when compared to wild-type VACV. It is known that JNK is not important for VACV replication, however, it does participate in cytoskeletal reorganization, viral spread and actin tail formation. In order to elucidate how JNK regulates actin tail formation, we have decided to investigate the role of the actin nucleator Spir-1, a known substrate of JNK. By coimmunoprecipitation, we revealed that both proteins associate during VACV infection. Furthermore, as observed with JNK, viral spread, but not to viral replication, was affected in murine embryonic fibroblasts (MEFs) deficient in Spir-1 or HeLa cells transfected with Spir-1 siRNA when compared to wild-type MEFs and cells transfected with control siRNA, respectively. Also, our results suggested that deficiency of JNK or Spir-1 leads to a reduction in VACV-induced actin tails size. Taken together, these data have added new viral players that participate in the modulation of MAPKs during VACV infection, as well as have contributed to clarify additional mechanisms by which JNK can contribute to the viral spread.

Key words: *Vaccinia virus*; MAPK/AP-1; B14; Spir-1; actin tail

I. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Os Poxvírus

1.1. Histórico e Importância

Os poxvírus foram de grande importância no surgimento e desenvolvimento da imunologia e vacinologia, criadas dois séculos atrás pelos estudos científicos do médico inglês Edward Jenner sobre a prevenção da varíola (HILLEMANN, 2000). A varíola, doença causada pelo *Variola virus* (VARV), matou centenas de milhares de pessoas desde o primeiro surto registrado no Egito Antigo, cerca de 3000 anos atrás, até sua extinção. Após a campanha de vacinação em massa da Organização Mundial de Saúde, o último caso de varíola natural foi diagnosticado em 1977, e a mesma foi considerada erradicada pela OMS em 1980 (SMITH & McFADDEN, 2002; MAHALINGAM et al., 2004; TAN, 2004; McFADDEN, 2005).

A erradicação da varíola só foi possível devido aos esforços para se controlar a doença no início do século XVIII. Jenner notou que ordenhadores que entravam em contato com vacas acometidas de Varíola bovina (ocasionada pelo *Cowpox virus* - CPXV - outro *Orthopoxvirus*), permaneciam protegidos da Varíola humana, descobrindo assim que a infecção por um *Orthopoxvirus* mais brando podia conferir proteção cruzada contra o VARV (TAN, 2004; BULLER & BRAY, 2004). Durante o século XIX, o uso da vacina de Jenner contra a varíola se espalhou pelo mundo. Em 1939, Alan Downie, ao analisar o vírus contido nas amostras vacinais, percebeu que este era diferente do CPXV original, denominando a nova espécie de *Vaccinia virus* (VACV) (SMITH & McFADDEN, 2002).

O VACV tornou-se modelo para os primeiros estudos biológicos e bioquímicos dos vírus, evidenciando a grande importância dos poxvírus no desenvolvimento da virologia. Também foi o primeiro vírus animal a ser purificado, visualizado por microscopia eletrônica, cultivado em cultura de tecidos e utilizado como modelo em ensaios de titulação. Além disso, o VACV foi também o primeiro vírus a ser utilizado como vetor de expressão, sendo atualmente foco de muitos estudos para sua utilização como vetor vacinal contra diversos patógenos, como agente oncolítico e para expressão de proteínas recombinantes (MOSS, 1996; FENNER, 2000; MOSS, 2013). Além disso, os ataques terroristas de 11 de

setembro de 2001, nos Estados Unidos da América, aumentaram a preocupação sobre o uso do VARV como arma biológica, direcionando o foco dos estudos para o desenvolvimento de novas drogas antivirais e vacinas mais seguras (SMITH & McFADDEN, 2002; McFADDEN, 2005).

Nas últimas décadas, destaca-se a re-emergência de zoonoses humanas causadas por *Orthopoxvirus*. Em 2003, ocorreu um surto de monkeypox em humanos nos EUA, o qual foi decorrente da importação de roedores da África, local onde ocorre infecções em humanos, portadores de *Monkeypox virus* (MPXV) (CDC Update, 2003; McFADDEN, 2005). Além disso, desde 1963 e, principalmente, na década de 90, tem sido relatada a circulação de *Orthopoxvirus* classificados como amostras brasileiras do VACV, em diversos surtos no Brasil, inclusive com transmissão a humanos e com grande impacto na economia de subsistência (FONSECA et al., 1998; DAMASO et al., 2000; TRINDADE et al., 2003; NAGASSE-SUGAHARA et al., 2004; LEITE et al., 2005; LOBATO et al., 2005; TRINDADE et al., 2006; TRINDADE et al., 2007; MEDEIROS-SILVA et al., 2010; ABRAHÃO et al., 2009; ASSIS et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2013; ABRAHÃO et al., 2015). Casos de infecção pelo CPXV também têm sido reportados na Europa, como, por exemplo, em um menina de 11 anos na Bavária no ano 2000 (WIENECKE et al., 2000) e em 2011, 8 casos de pessoas que contrariam esse vírus em Munique (VOGEL et al., 2011).

Com a emergência de novas infecções por poxvírus, é importante que a pesquisa básica sobre estes vírus continue existindo, buscando um melhor entendimento de sua biologia, das interações vírus-hospedeiro, bem como da imunologia e patogênese associadas (SMITH & McFADDEN, 2002; MAHALINGAM et al., 2004).

1.2. Família *Poxviridae*

A família *Poxviridae* compreende vírus grandes e complexos de DNA dupla fita linear, cujas extremidades então covalentemente ligadas, e que possuem a capacidade de realizar todo seu ciclo de replicação no citoplasma das células hospedeiras, sejam elas células de vertebrados ou invertebrados. A família é dividida em duas subfamílias denominadas *Chordopoxvirinae* e *Entomopoxvirinae*,

nas quais os membros infectam, respectivamente, vertebrados e insetos. A subfamília *Chordopoxvirinae* reúne dez gêneros: *Orthopoxvirus*, *Parapoxvirus*, *Avipoxvirus*, *Capripoxvirus*, *Crocodylidpoxvirus*, *Leporipoxvirus*, *Suipoxvirus*, *Molluscipoxvirus*, *Yatapoxvirus* e um gênero ainda não estabelecido, que inclui o *Squirrelpox vírus* (MOSS, 2013).

Dentro da subfamília *Chordopoxvirinae*, o gênero mais bem estudado é o *Orthopoxvirus*. Diversos vírus pertencentes a este gênero são capazes de infectar seres humanos, incluindo o *Variola virus*, que teve seu último caso natural descrito em 1977; o *Vaccinia virus*, que foi utilizado na campanha de vacinação contra a varíola e é o protótipo do gênero *Orthopoxvirus*; o *Monkeypox virus*, que circula principalmente em animais selvagens da África; e o *Cowpox vírus*, que é um vírus de roedores endêmico da Europa e que pode ser adquirido também por hospedeiros acidentais como vacas ou gatos (FENNER et al., 1989; FENNER, 2000; MOSS, 2013; SCHATZMAYR et al., 2011).

Sobre o VACV, apesar de ser o alvo da maior parte dos estudos sobre os Poxvírus, ainda não se sabe sua origem e o seu hospedeiro natural (SMITH & LAW, 2004; MOSS, 2013), tendo sido detectado no Brasil em macacos da Amazônia e roedores peridomiciliares (ABRAHÃO et al., 2009; ABRAHÃO et al., 2010), o que sugere sua ampla circulação entre os animais.

2. Aspectos Gerais da Biologia dos *Orthopoxvirus*

2.1. Morfologia

Os *Orthopoxvirus* são grandes quando comparados aos outros vírus, e possuem forma ovóide ou de tijolo, com dimensões em torno de 350nm de comprimento por 270nm de largura no caso do VACV. Na partícula viral estão presentes proteínas tubulares externas, uma membrana, um cerne, que contém o genoma, constituído por DNA linear de dupla fita ligado covalentemente nas extremidades, e dois corpúsculos laterais, de natureza protéica (Figura 1) (MOSS, 2013).

O cerne, a estrutura mais interna do vírus, é um disco ovalado, bicôncavo e envolto por uma camada composta de pequenas subunidades protéicas cilíndricas denominada paliçada. No interior do cerne encontra-se o material genético, ao qual estão associados polipeptídios em uma estrutura denominada nucleossoma (SODEIK & KRIJNSE-LOCKER, 2002).

Algumas formas virais apresentam ainda uma membrana adicional, denominada envelope, sendo este o componente mais externo do vírus. Assim, podem ser distinguidas quatro partículas virais: vírion intracelular maduro (IMV); vírion intracelular envelopado (IEV); vírion envelopado associado à célula (CEV); e vírion extracelular envelopado (EEV) (SMITH et al., 2002).

O IMV possui uma única membrana e constitui a maior parte da progênie viral, sendo liberado somente quando ocorre a lise celular. O IEV representa o IMV envolto circundado por duas bicamadas lipídicas adicionais derivadas do complexo de Golgi, encontrado intracelularmente, sendo não infeccioso. O CEV ou EEV consistem do IEV excitado, podendo ser encontrado tanto aderido à superfície celular (CEV), quanto livre no meio extracelular (EEV) (SMITH et al., 2002; MOSS, 2006; CONDIT et al., 2006).

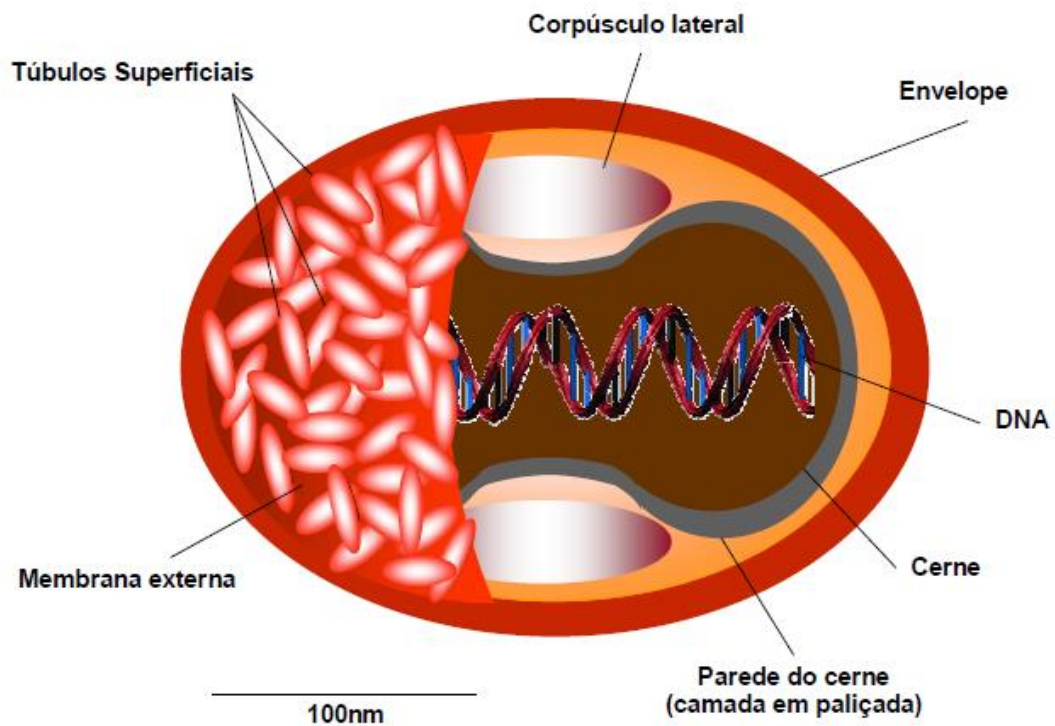


Figura1. Morfologia da partícula viral dos *Orthopoxvirus*.

Esquema representativo da partícula IMV de um típico *Orthopoxvirus*, evidenciando os seus elementos estruturais principais: o cerne, a estrutura mais interna onde está contido o genoma; os corpúsculos laterais, disposto nas duas concavidades do cerne; a membrana externa e o envelope, o componente mais externo do vírus, de natureza lipoprotéica. Fonte: adaptado de FENNER, 1989.

2.2. Genoma

Os *Orthopoxvirus* possuem genoma de DNA dupla fita linear, com o tamanho aproximado de 200 kb no caso do VACV, apresentando 200 ORFs (fases de leitura abertas) conhecidas (MOSS, 2013). Recentemente, o estudo do perfil dos RNAm do VACV ligados aos ribossomos, demonstrou a existência de novos sítios de iniciação da transcrição relacionadas a proteínas pequenas, provavelmente referente a ORFs ainda não conhecidas (YANG et al., 2015). As extremidades das duas fitas de DNA são covalentemente ligadas por estruturas do tipo grampo de cabelo (“hairpin”). Por si só, o genoma dos poxvírus não é infeccioso uma vez que são necessárias enzimas, como a RNA polimerase, presentes no interior da partícula viral, para que o genoma seja expresso (MOSS, 2013).

Na porção mais central do genoma são encontrados os genes essenciais para a replicação e montagem da partícula viral, sendo estes mais conservados entre os membros da família (Figura 2) (CONDIT & NILES, 2002; SMITH & McFADDEN, 2002). Já na extremidade do genoma, são encontradas sequências terminais repetidas e invertidas (ITRs), sendo estas idênticas, mas com orientações opostas. Os genes encontrados nessas extremidades são mais variáveis entre as espécies, sendo denominados não-essenciais. Em sua maioria, esses genes estão relacionados com o espectro de hospedeiro, virulência e imunomodulação (Figura 2) (LEFKOWITZ et al., 2006; MOSS, 2013).

A convenção utilizada para nomear os genes do VACV consiste na sua localização nos fragmentos que são gerados após a digestão do genoma viral com a endonuclease HindIII. Estes fragmentos são denominados por letras e o nome do gene consiste da letra do fragmento de restrição no qual está localizado, seguida do número do mesmo e da letra L ou R, indicando o sentido de transcrição do gene para esquerda (Left) ou direita (Rigth), respectivamente. Para denominar as proteínas codificadas por estes genes, retiram-se as letras L ou R do nome do gene (MOSS, 2013).

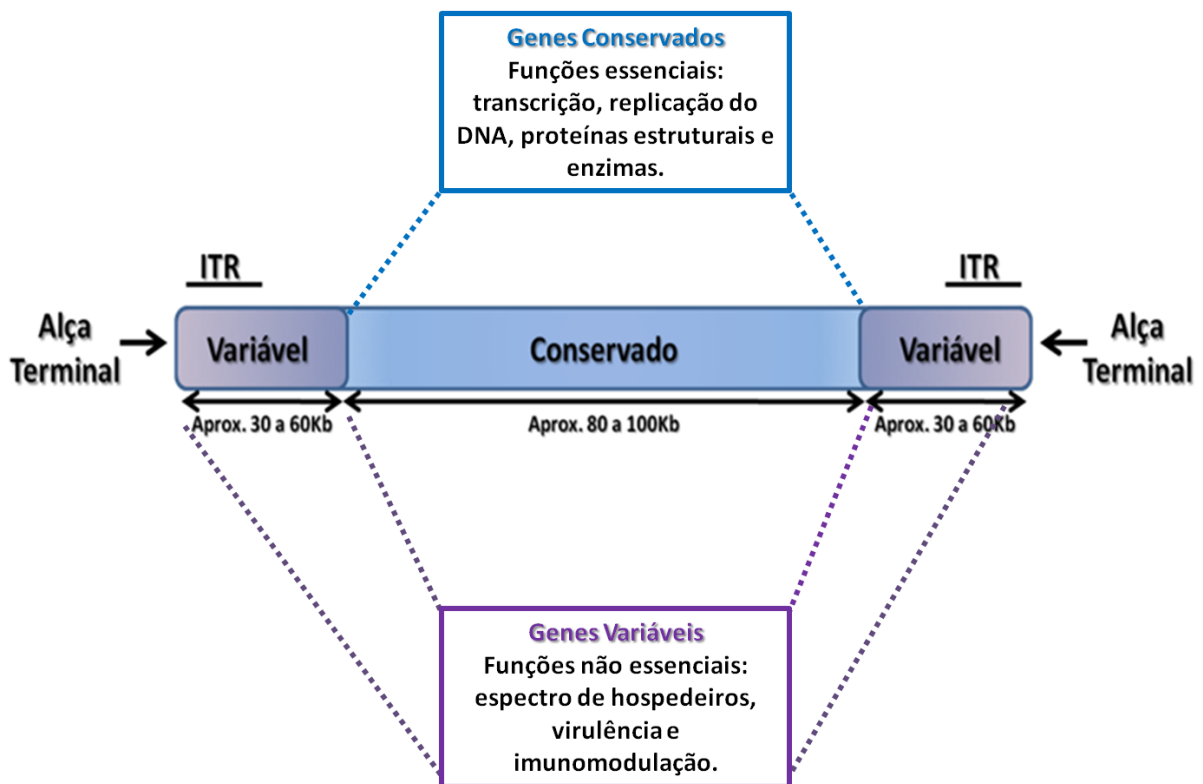


Figura 2. Representação esquemática do genoma dos *Orthopoxvirus*.

O genoma possui, em média, 200 Kb e pode ser dividido em uma região central conservada, que codifica principalmente proteínas essenciais para a multiplicação viral e nas regiões terminais, que são mais variáveis e codificam proteínas não essenciais para a multiplicação viral. Estas últimas também contêm as regiões terminais invertidas e repetidas (ITRs). Fonte: Adaptado de SMITH & McFADDEN, 2002.

2.3. Ciclo de multiplicação dos *Orthopoxvirus*

Assim como acontece para outros vírus, a infecção inicia-se com a adsorção da partícula viral à superfície celular. Todavia, os *Orthopoxvirus* diferem da maioria dos vírus por não possuírem um único ligante específico de interação com receptores celulares. Assim, a possibilidade de utilização de diferentes receptores, bem como a existência de duas formas infecciosas com topologias distintas, IMV e EEV, dificulta o entendimento da ligação dos poxvírus às células hospedeiras (SMITH et al., 2003). No entanto, ambas as formas, após a adsorção e durante a penetração, perdem o envelope e/ou membrana externa, liberando o cerne viral no citoplasma. Este processo, denominado desnudamento primário, não é afetado por inibidores de transcrição ou de síntese proteica. Após entrar no citoplasma, o cerne viral é transportado da periferia celular através de microtúbulos até o local onde é iniciada a síntese de mRNA virais (MOSS, 2013).

Existem evidências de que pelo menos três proteínas de superfície do IMV podem facilitar a adesão do VACV à célula hospedeira através da ligação às glicosaminoglicanas (GAGs) celulares e que esta interação, apesar de não ser essencial, possui um importante papel na adsorção viral (SMITH et al., 2003; MOSS, 2013). Também foi demonstrado que glicoesfingolipídios são importantes para a infecciosidade do VACV, sugerindo a participação dessas moléculas como um receptor celular alternativo para a ligação desse vírus (PERINO et al., 2011). Após a adsorção, acredita-se que o IMV penetre por diferentes vias, que incluem fusão direta da membrana externa da partícula viral com a membrana plasmática ou macropinocitose (CARTER et al., 2005; HUANG et al., 2008; MERCER & HELENIUS, 2008; RIZOPOULOS et al., 2015). Já a penetração do EEV ocorreria através de endocitose independente da via mediada por clatrina ou caveolina, ou por macropinocitose, sendo necessária a acidificação dos vacúolos endocíticos para romper o envelope do EEV. Uma vez exposta, ocorreria a fusão da membrana externa com a vesícula endocítica e a posterior liberação do cerne no citoplasma da célula hospedeira (MOSS, 2006; ROBERTS & SMITH, 2008; MERCER & HELENIUS, 2008; SCHMIDT et al., 2011; RIZOPOULOS et al., 2015).

Os processos de replicação do genoma e morfogênese dos poxvírus são regulados temporalmente ao longo do ciclo de multiplicação, sendo identificadas

três classes de genes: genes precoces, genes intermediários e genes tardios. Esse tipo de programa genético é conhecido como mecanismo em cascata, uma vez que os produtos gênicos de cada estágio regulam o próximo estágio (MOSS, 2013). Essa transição é também mediada pela degradação dos mRNA, no qual participam as proteínas virais D9 e D10, além da exonuclease celular Xrn1, permitindo a terminação da transcrição de uma determinada classe de genes (PARRISH, 2007; PARRISH, 2008; BURGESS & MOHR, 2015; LIU et al., 2015).

Dentro do cerne da partícula viral está presente um sistema completo necessário à transcrição precoce, possibilitando, assim, a síntese do mRNA viral precoce logo após o desnudamento primário. Os mRNAs precoces fornecem enzimas e fatores necessários para a síntese do DNA viral e para a transcrição dos genes intermediários, além de proteínas envolvidas no bloqueio da resposta antiviral do hospedeiro (MOSS, 2013). Em seguida, ocorre o desnudamento secundário, com a degradação das nucleoproteínas que constituem o cerne e a consequente liberação do DNA viral no citoplasma da célula hospedeira. A ATPase viral D5, codificada por um gene precoce, possui um papel essencial nesse processo (KILCHER et al., 2014). O DNA liberado então funciona como molde para a replicação do genoma e subseqüentes estágios de transcrição. Os poxvírus codificam todas as proteínas essenciais para replicação do DNA viral, sendo descritas até o momento, sete proteínas envolvidas neste processo (MOSS, 2013; BOYLE et al., 2015). A transcrição dos genes intermediários é responsável pela produção de enzimas e fatores de transcrição dos genes tardios, que por sua vez, geram proteínas estruturais e fatores de transcrição dos genes precoces, além de proteínas envolvidas na morfogênese e evasão imune (CONDIT & NILES, 2002; MOSS, 2013).

A seguir ocorre a morfogênese das partículas infecciosas. Os sítios citoplasmáticos onde ocorrem a replicação do DNA e montagem das partículas virais são denominados “fábricas virais”, sendo essas áreas do citoplasma

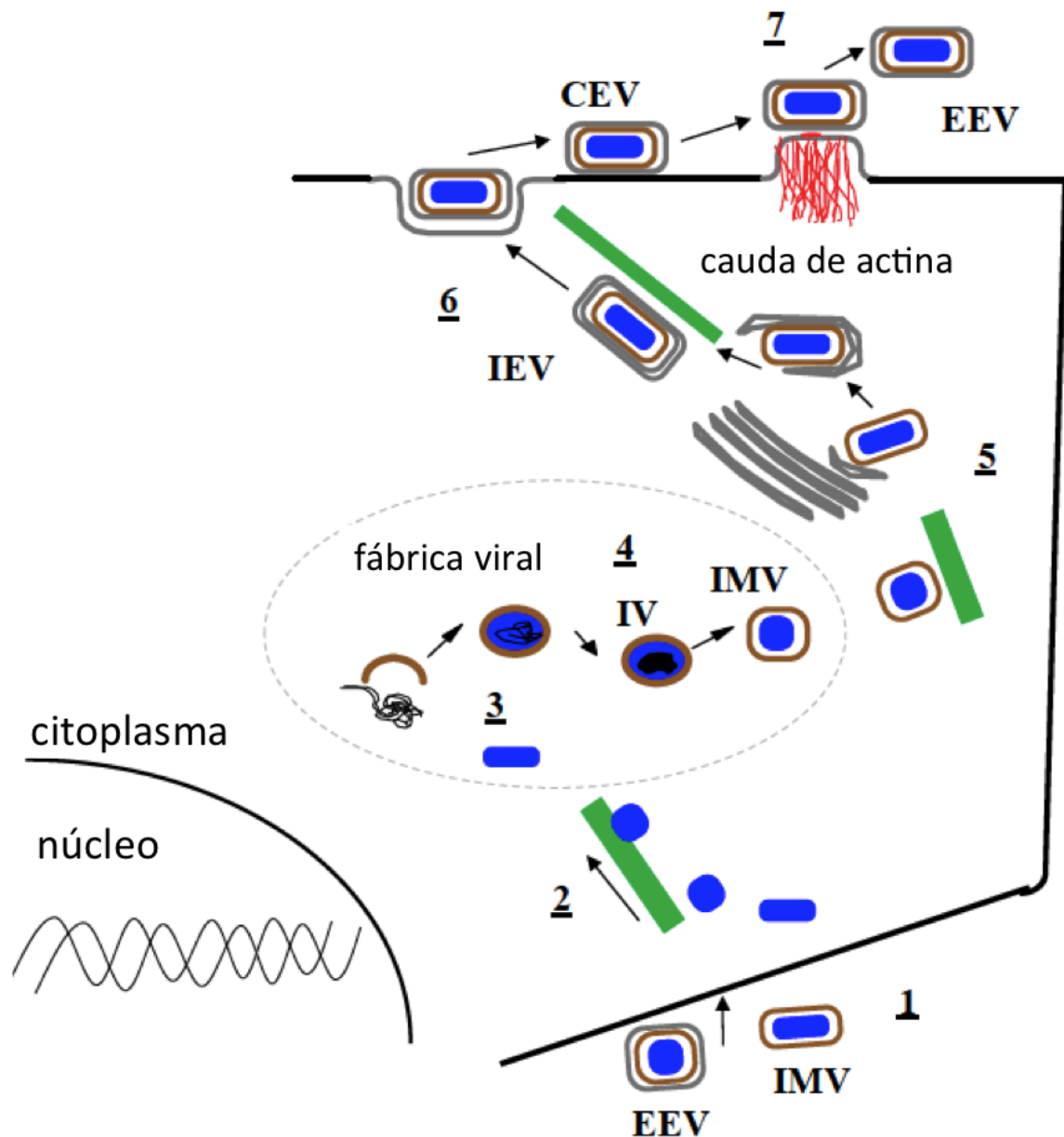


Figura 3. Ciclo de Multiplicação do VACV.

Após a adsorção e penetração do IMV ou EEV (1), ocorre o desnudamento primário e o cerne viral é transportado por microtúbulos até uma região perinuclear, denominada fábrica viral (2). Em seguida, ocorre o desnudamento secundário e consequente replicação do genoma (3). Os vírus imaturos (IVs) são então formados e processados, dando origem ao IMV (4). Alguns IMVs adquirem membranas adicionais, formando o IEV (5). Os IEVs se movem até a superfície celular (6), onde são liberados como CEVs, após a indução da formação de caudas de actina, ou EEVs (7). Fonte: Adaptado de ROBERTS & SMITH, 2008.

eletrondensas à microscopia eletrônica (MOSS, 2013). As primeiras estruturas distintas morfológicamente são as chamadas crescentes, compostas de lipídeos e proteínas virais. As crescentes aumentam de tamanho, adquirem forma circular, tornando-se os vírions imaturos (IV), que possuem componentes do cerne viral (ROBERTS & SMITH, 2008; MOSS, 2013). Em seguida, ocorre a transição de IV para os IMVs. Nesse processo, há a clivagem proteolítica das proteínas do cerne, com conseqüente mudança da forma da partícula, de circular para o formato de tijolo. Para a maior parte de progênie viral, a morfogênese se encerra nesse ponto, e os IMVs são liberados somente após a lise da célula (ROBERTS & SMITH, 2008; MOSS, 2013).

Uma pequena parte dos IMVs montados, entre 5 e 20%, deixam as fábricas virais e adquirem duas membranas adicionais da rede do trans-Golgi ou de endossomos, formando os IEVs (McFADDEN, 2005; SMITH & LAW, 2004). Os IEVs são então transportadas até a periferia celular, através de microtúbulos, com participação das proteínas virais A36, F12 e E2 (ROBERTS & SMITH, 2008; CARPENTIER et al., 2015). Quando atingem a superfície celular, o envelope dos IEVs se funde a membrana plasmática, formando o vírus envelopado associado à célula (CEV), que é então expelido da célula através da indução da formação de protrusões digitiformes, conhecidas como caudas de actina, ou então liberado na forma de vírus envelopado extracelular (EEV). O balanço entre a formação de EEVs e CEVs depende tanto da célula hospedeira quanto da amostra do vírus (SMITH & LAW, 2004; McFADDEN, 2005; ROBERTS & SMITH, 2008).

As três formas infecciosas dos poxvírus desempenham funções distintas na disseminação viral. Ao passo que o CEV medeia a disseminação célula-a-célula, o EEV é importante para a disseminação sistêmica no organismo do hospedeiro e o IMV, dada a sua maior estabilidade, realiza a disseminação entre hospedeiros (SMITH et al., 2002; MCFADDEN, 2005).

2.3.1. Formação das caudas de actina induzidas pelo VACV

A formação das caudas de actina induzidas durante a infecção pelo VACV é dependente de proteínas virais presentes no envelope externo do IEV: A33, A34, A56, B5 e A36, sendo esta última a mais importante. A36 é fosforilada por tirosina cinases celulares da família Src/Abl, levando então ao desligamento de A36 da cinesina-1, interação que contribui para o movimento intracelular do IEV via microtúbulos até a superfície da célula (NEWSOME et al., 2004; NEWSOME et al., 2006; LEITE & WAY, 2015). A36 fosforilada induz o recrutamento da proteína adaptadora NCK, que é essencial para a formação das caudas de actina. NCK, por sua vez, recruta o complexo N-WASP:WIP (WASP – proteína da síndrome de Wiskott–Aldrich; WIP – proteína de interação com WASP), e consequente recrutamento e ativação do complexo ARP2/3, que desencadeia então o processo de polimerização de actina sob a partícula. GRB2, clatrina e a RhoGTPase CDC42 também são recrutados a essa maquinaria, aumentando o número e a estabilidade das caudas formadas (Figura 4) (MOREAU et al., 2000; SCAPLEHORN et al., 2002; MÜNTER et al., 2006; HUMPHRIES et al., 2012, HUMPHRIES et al., 2014, LEITE E WAY, 2015). ANDRADE et al., 2016 (em preparação), demonstraram que a cinase ativada por p21 -1 (PAK1) pode contribuir com a formação das caudas de actina, através da regulação da proteína p41-Arc, uma subunidade do complexo ARP2/3 (Figura 4).

Recentemente, foi descrito que a formina FHOD1, outra proteína celular nucleadora de actina, coopera com o complexo ARP2/3 durante a formação das caudas de actina induzidas pelo VACV (Figura 4). Após sua ativação pela GTPase Rac1, FHOD1 promove a polimerização de filamentos de actina que servem de base para a polimerização de filamentos de actina ramificados por ARP2/3 (ALVAREZ e AGAISSE, 2013). As caudas então formadas são responsáveis pela propulsão do CEV da célula infectada. A liberação do CEV da ponta da cauda de actina, por sua vez, é dependente apenas das proteínas tirosinas cinases da família Abl (REEVES et al., 2005).

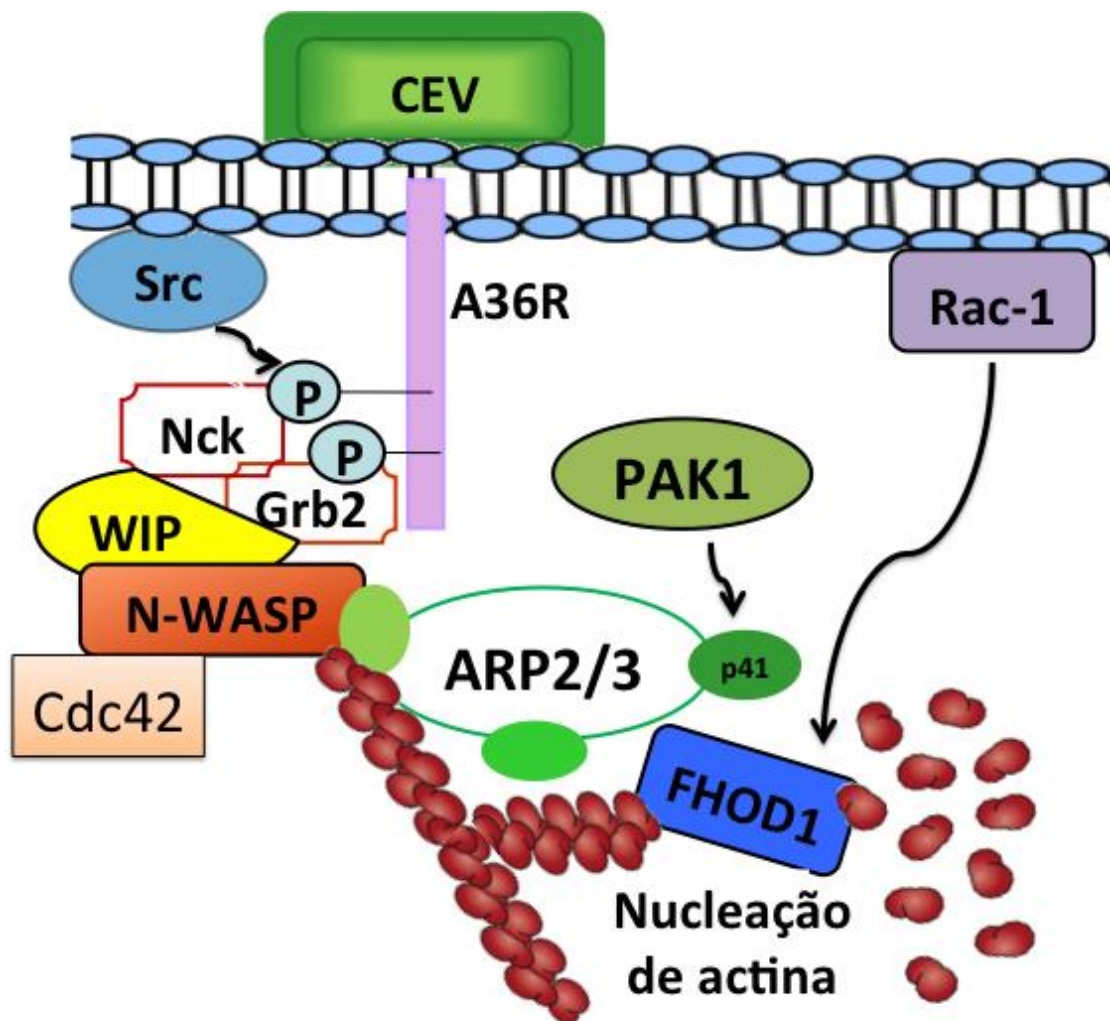


Figura 4. Formação das caudas de actina pelo VACV.

A fosforilação da proteína viral A36 por tirosinas cinases celulares da família Src/Abl, induz ao recrutamento da proteína adaptadora NCK. NCK recruta então o complexo N-WASP:WIP, e conseqüente recrutamento e ativação do complexo ARP2/3, que desencadeia então o processo de polimerização de actina sobre a partícula. GRB2, clatrina e CDC42 também são recrutados a essa maquinaria, aumentando o número e a estabilidade das caudas formadas. PAK-1 também pode participar desse processo, através da regulação da proteína p41-Arc, uma subunidade do complexo ARP2/3, contribuindo para o número de caudas formadas. Por último, FHOD1, após ativação por Rac1, coopera com o complexo ARP2/3, facilitando a formação das caudas de actina pelo VACV. Fonte: Modificado de SMITH et al., 2003.

3. Interação Vírus-Hospedeiro

Diversos estudos acerca da interação vírus-hospedeiro demonstram a estrita dependência dos vírus em relação à maquinaria de biossíntese celular para obterem sucesso no seu ciclo de multiplicação, principalmente devido ao tamanho limitado do seu genoma. Além disso, logo após a infecção viral, a resposta imune do hospedeiro pode bloquear sua disseminação/multiplicação e levar a sua eliminação, fazendo necessário com que os vírus disponham de mecanismos para escapar dessa defesa do hospedeiro, mantendo a célula viável até a geração da progênie (SOARES et al., 2009; MOSS, 2013).

Sendo assim, ao longo da coevolução com seus hospedeiros, os vírus desenvolveram estratégias altamente eficientes para a manipulação das diversas vias sinalizadoras celulares de forma a criar um ambiente intracelular mais propício a sua multiplicação. A ativação e/ou bloqueio das diversas cascatas sinalizadoras do hospedeiro refletem no sucesso da multiplicação e disseminação viral. Tais vias desempenham um papel central na regulação das mais diversas funções celulares, como sobrevivência, crescimento, apoptose, migração e tráfego intracelular (GREBER, 2002; LUDWIG et al., 2003; MÜNTER et al., 2006)

De maneira geral, as células hospedeiras identificam uma infecção viral através de receptores de reconhecimento de padrões moleculares (PRR), que podem estar presente tanto na superfície celular, quanto em vesículas endossômicas ou no citoplasma. Os PRRs detectam infecções através de moléculas únicas características do mundo microbiano como os PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos), como por exemplo, DNA dupla-fita com baixo nível de metilação, LPS, flagelina, etc. A ligação dos PAMPs aos seus receptores desencadeia a indução de diversas respostas celulares, tais como a ativação dos fatores de transcrição IRF3/IRF7 (fator regulatório do interferon), NF- κ B (fator nuclear κ B) e AP-1 (proteína ativadora). Esses fatores são então translocados para o núcleo, e induzem à transcrição de genes codificadores de interferons (IFN) tipo I, citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas. Essas proteínas vão atuar para conter a infecção viral através do recrutamento e ativação de células imunes mais especializadas para o sítio da infecção, limitando a replicação viral e induzindo a

resposta imune adaptativa (BONJARDIM et al., 2009; UNTERHOLZNER, 2013; SMITH et al., 2013).

3.1. MAPK/AP-1 e sua regulação pelo VACV

3.1.1. MAPK (Proteínas Cinases Ativadas por Mitógenos)

A via das Proteínas Cinases Ativadas por Mitógenos (MAPKs) é composta por uma família de cinases transdutoras de sinais da membrana celular até o núcleo, em resposta a uma variedade de estímulos, incluindo fatores de crescimento, estresse, hormônios e infecções virais, entre outros (KYRIAKIS & AVRUCH, 2001, 2012; WADA & PENNINGER, 2004; DHANASEKARAN & JOHNSON, 2007; BONJARDIM, 2016 – em preparação).

Estas cascatas contêm pelo menos três proteínas cinases em série que culmina na ativação de uma MAPK funcional. Assim, uma MAPK cinase cinase (MAPKKK), é ativada através de fosforilação e/ou interação com GTPases associadas à membrana, e por sua vez fosforila resíduos de serina e treonina de uma MAPK cinase (MAPKK), que, por sua vez, ativa uma MAPK através da fosforilação de resíduos de tirosina e treonina. Essa MAPK então pode fosforilar outras proteínas citoplasmáticas e/ou se translocar para o núcleo, regulando diretamente a atividade de fatores de transcrição e, assim, controlando a expressão gênica (Figura 5) (PEARSON et al., 2001; KYRIAKIS & AVRUCH, 2001, 2012, MORRISON, 2012, BONJARDIM, 2016 –em preparação).

É reconhecido que a superfamília das MAPKs possui várias vias de sinalizações distintas, entre elas a das proteínas cinases reguladas por sinais extracelulares (ERK1/2) e a das proteínas cinases ativadas por estresse (SAPKs): cinases c-Jun N-terminal (JNK) e das cinases p38 (COWAN & STOREY, 2003). ERK1 e ERK2 são MAPKs bem caracterizadas que respondem a estímulos de crescimento. Ambas JNKs e p38 MAPKs são ativadas em resposta a uma variedade de estresses ambientais e celulares, tais como mudanças na osmolaridade e metabolismo, danos ao DNA, choque térmico, citocinas inflamatórias, radiação UV e estresse oxidativo (WADA & PENNINGER, 2004, CARGNELLO & ROUX, 2011, MORRISON, 2012).

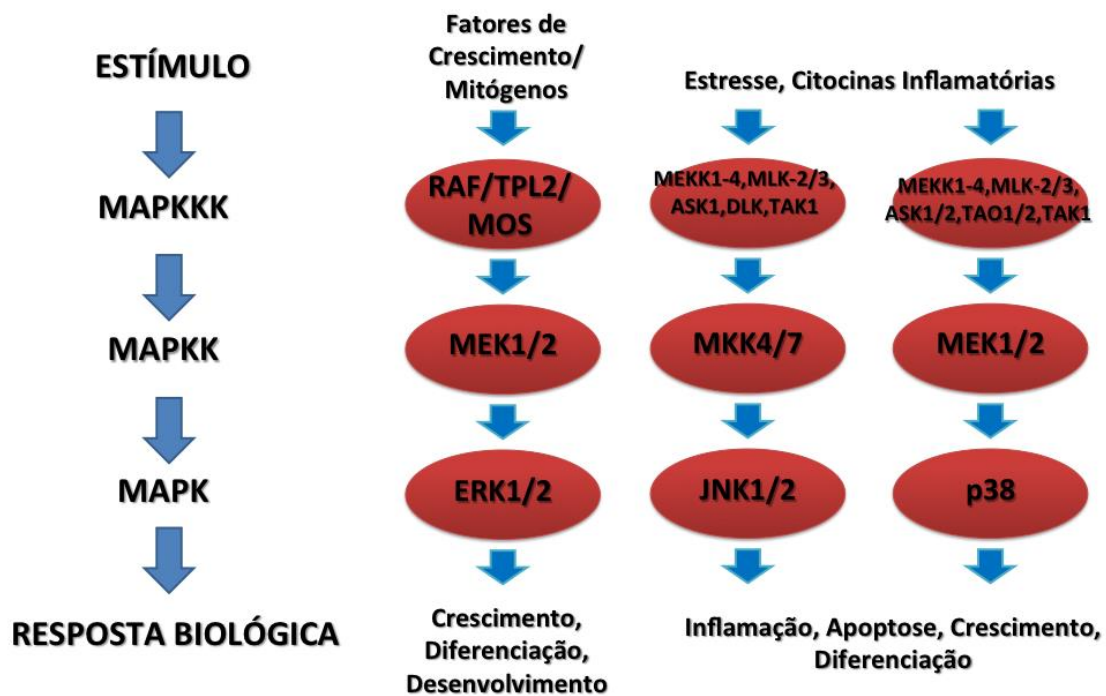


Figura 5. Esquema da via das MAPKs.

As MAPKs estão organizadas num módulo de três proteínas cinases que consistem de uma MAPKKK (MAPK cinase cinase), ativadora de uma MAPKK (MAPK cinase) que por sua vez ativa uma MAPK (MAP cinase), resultando em uma resposta biológica específica. As vias que levam à ativação de ERK1/2, SAPK/JNK e da MAPK p38 são as mais bem estudadas. Fonte: adaptado de MORRISON, 2012.

Apesar das MAPKs possuírem diversos substratos citoplasmáticos, um dos principais papéis dessas cinases é na transmissão de sinais extracelulares para o núcleo, onde ocorre a transcrição de genes específicos induzidos pela fosforilação e ativação de fatores de transcrição, principalmente o fator de transcrição AP-1 (KARIN, 1995; WHITMARSH & DAVIS, 1996).

Interações entre as cascatas das MAPKs podem ocorrer de várias maneiras de modo a integrar e facilitar as respostas celulares frente aos diferentes sinais. Assim, existem componentes da sinalização das MAPKs que podem funcionar de maneira promíscua em diversas vias, possuindo mais de uma função/sinalização biológica sobre múltiplas formas de regulação, seja ao nível das MAPKKKs, das MAPKKs ou dos substratos ativados pelas MAPKs, ou mesmo interferir com outras vias sinalizadoras, como a via de NF- κ B (PEARSON et al., 2001; COWAN & STOREY, 2003; BONJARDIM et al., 2009, CARGNELLO & ROUX, 2011).

3.1.1.2 Cinases c-Jun amino terminal (JNK1/2)

Estudos bioquímicos, em 1990, identificaram as proteínas cinases JNK1/2, de massa molecular 54 e 47 KDa, descritas como associadas a microtúbulos e ativada por cicloheximida. Também foi descoberto que JNK fosforila o fator transcricional c-Jun, além de se ligar a sua região amino terminal. Sabe-se ainda que JNK é codificada por três genes diferentes, *jnk 1,2* e *3*, sendo o gene *jnk3* expresso somente no cérebro, coração e testículos, que podem sofrer processamento pós-transcricional, variando entre 46-54 KDa (DAVIS, 2000; HIMES, 2006).

Embora inicialmente classificada como proteínas cinases ativadas por estresse (SAPKs), as MAPKs JNK1/2 também são mediadores críticos na transdução do sinal em resposta a estimulação por citocinas e alguns fatores de crescimento. Sabe-se que JNK1/2 têm participação nas respostas imune e na regulação de processos como sobrevivência celular, apoptose e proliferação (BARR & BOGOYEVITCH, 2001; NISHINA et al., 2004; HIMES et al., 2006).

A via sinalizadora que culmina com a ativação de JNK1/2 envolve um grande número de MAPKKs, incluindo membros das proteínas do grupo ASK, do grupo MEKK, TAK1 e TPL-2. MKK4 e MKK7 são duas MAPKKs envolvidas na ativação de JNK através de fosforilação de resíduos de treonina e tirosina. Essas duas MAPKKs são encontradas tanto no citoplasma, quanto no núcleo da célula (DAVIS, 2000; BARR & BOGOYEVITCH, 2001).

A fosforilação de JNK1/2 pode levar a ativação de diversos substratos, tais como c-Jun, JunB, JunD, ATF-2, que causam um aumento expressivo na atividade de transcrição. JNK pode ainda regular fosforilar proteínas envolvidas na regulação do citoesqueleto, como as proteínas MAP-1B, Paxilina e o nucleador de actina Spir-1 (DAVIS, 2000; BARR & BOGOYEVITCH, 2001; HUANG et al., 2004; PEREIRA et al., 2012).

3.1.2. AP-1

O fator de transcrição AP-1 não é formado por uma proteína única, e sim por dímeros entre proteínas pertencentes às famílias Jun (c-Jun, JunB, JunD), Fos (c-Fos, Fra-1, Fra-2, FosB), ATF (Fator de Ativação Transcricional) (ATF2, ATF3/LRF1, B-ATF, JDP1 and JDP2) e Maf (Fibrosarcoma Músculo aponeurótica) (c-Maf, Nrl, MafB, MafF, MafG, MafK) (KARIN et al., 1997; SHAULIAN, 2010; MENG & XIA, 2011). Essas proteínas são compostas por regiões contendo domínios zíper de leucina (bZIP), responsável pela dimerização das mesmas, e sua consequente ligação ao DNA. Membros da família Jun, Fos, ATF e Maf estimulam a transcrição de genes contendo tanto o elemento de resposta a ésteres de forbol (TPA ou PMA) denominado TRE, cujo consenso é 5'-TGACTCA/TGAGTCA-3', quanto o elemento de resposta ao cAMP (AMP cíclico), denominando CRE, cujo consenso é 5'-TGACGTCA/TGACGTCA-3' (ANGEL et al., 1987, EFERL & WAGNER, 2003).

Enquanto as proteínas da família Jun e ATF existem como homo e heterodímeros, as proteínas da família Fos não possuem a capacidade de homodimerização. Já as proteínas Maf podem formar heterodímeros com Jun e Fos. Os dímeros de Jun-Jun, Jun-Fos e Jun-Fra se ligam preferencialmente a sequências TRE, enquanto os dímeros de Jun-ATF ou ATF-ATF se ligam preferencialmente a CRE (Figura 6) (REDDY & MOSSMAN, 2002). Dentre todas essas proteínas, a proteína c-Jun é o mais potente ativador transcricional, sendo o principal componente de AP-1 (KARIN et al., 1997, HESS et al., 2004). A composição do dímero de AP-1 possui um importante papel na sua função e na regulação de genes específicos em resposta a diversos estímulos, tais como fatores de crescimento, citocinas inflamatórias e estresse celular (WISDOM, 1999; KAPPELMANN et al., 2014), o que torna AP-1 um dos principais substratos da via das MAPKs.

A MAPK ERK é a mais importante na mediação da resposta a fatores de crescimento via AP-1, induzindo a heterodimerização de Jun e Fos. Já em resposta a citocinas inflamatórias e estresse celular, a indução de AP-1 ocorre via JNK e p38, levando principalmente à ativação de Jun e ATF (SHAULIAN & KARIN, 2001; 2002).

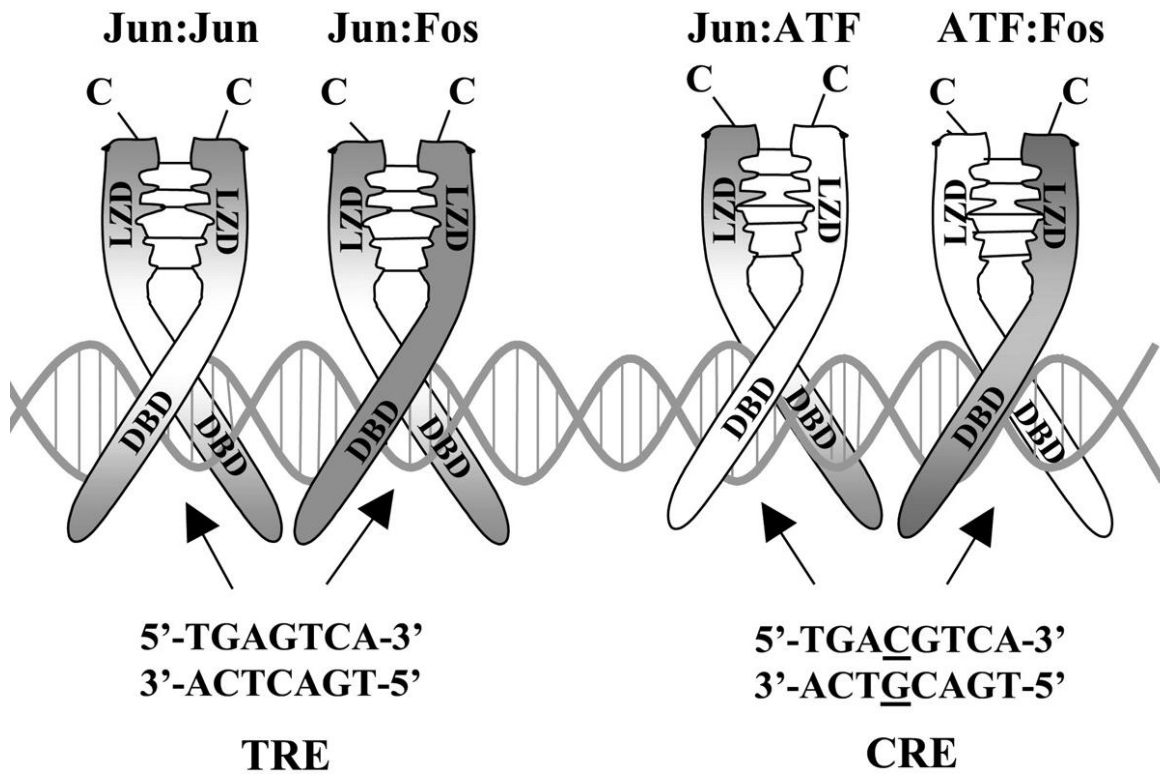


Figura 6. Fator transcricional AP-1.

O fator de transcrição AP-1 é formado por proteínas pertencentes às famílias Jun, Fos, ATF/CREB e Maf, que podem formar homodímeros ou heterodímeros através do seus domínios zipper de leucina (LZD). As diferentes combinações desses dímeros levam ao reconhecimento dos elementos TRE ou CRE nas sequências dos promotores dos genes alvo. DBD: domínio de ligação ao DNA. Fonte: REDDY & MOSSMAN, 2002

3.1.3. Spir-1

A proteína celular Spir-1 foi primeiramente descrita pelo seu envolvimento no desenvolvimento de oócitos e embriões em *Drosophila* (MANSEAU & SCHÜPBACH, 1989). Posteriormente, Spir-1 foi relacionada ao citoesqueleto de actina, uma vez que possui domínios de interação com a mesma (THEURKAUF et al., 1992; EMMONS et al., 1995; WELLINGTON et al., 1999). Entretanto, somente em 2005, QUINLAN e colaboradores demonstraram que Spir-1 era realmente capaz de nuclear novos filamentos de actina, em níveis comparáveis às forminas, porém mais lentamente que o complexo Arp2/3, até então os dois tipos de nucleadores de actina conhecidos.

Spir foi identificado somente em metazoários, possuindo dois genes em vertebrados, *spir-1* e *spir-2*. Em camundongos, a expressão de *spir-1* ocorre preferencialmente em células neuronais em adultos, bem como em células hematopoiéticas (SCHUMACHER et al., 2004; PLEISER et al., 2013). Já a detecção da expressão de *spir-2* ocorreu em células do trato digestivo, neurônios do sistema nervoso e em espermatozóitos (PLEISER et al., 2010; PLEISER et al., 2013).

Spir-1 é uma proteína de 1020 aminoácidos (86 kDa) contendo múltiplos domínios (Figura 7). A região central contém quatro domínios WH2 (homologia WASP 2), denominados A, B, C e D, cada um deles capaz de se ligar a um monômero de actina. A nucleação dos monômeros de actina é iniciada pelos domínios C e D, ambos essenciais para o processo, seguidas pelos domínios B e A (Figura 8) (QUINLAN et al., 2005; DUCKA et al., 2010; SITAR et al., 2012). A região C-terminal possui um domínio denominado FYVE, envolvido na ligação de Spir-1 a membranas, necessário nos processos de transporte de vesículas (KERKHOFF et al., 2001; MOREL et al., 2009; SCHUH, 2011). Adjacente ao domínio FYVE, encontra-se a região denominada Spir-box, altamente conservada entre as proteínas Spir de diferentes espécies, com alta homologia ao domínio α -hélice da proteína Rabfilina-3A, possuindo provável função na associação de Spir-1 a Rab-GTPases (OSTERMEIER & BRUNGER, 1999; KERKHOFF et al., 2001). Na região N-Terminal, encontra-se o domínio KIND (domínio cinase não catalítico do lóbulo C), envolvida na interação de Spir-1 com o domínio FSI (Interação Formina-Spir) presente nas forminas (PECHLIVANIS et al., 2009).

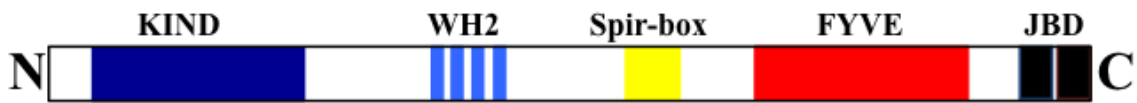


Figura 7. Domínios da proteína Spir-1.

Na região N terminal de Spir, encontra-se o domínio KIND, seguido por um conjunto de quatro domínios WH2 na região central. A região central contém a sequência Spir box e o domínio FYVE. Na extremidade da porção C-terminal de Spir, encontra-se um sítio de ligação a JNK (JBD). Fonte: Modificado de KERKHOFF, 2006.

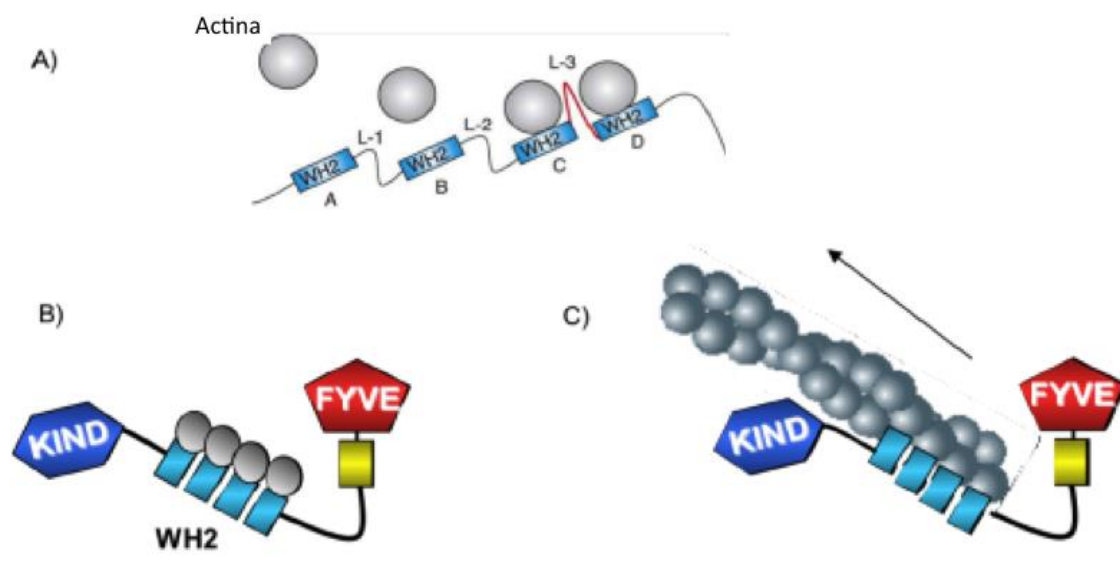


Figura 8. Mecanismo de nucleação de actina por Spir-1.

A) Os domínios WH2 são denominados A, B, C e D. Os primeiros dois monômeros de actina se ligam aos domínios D e C, para a iniciar a nucleação de actina. B) Quatro monômeros de actina ligados aos domínios WH2 de Spir-1. C) A polimerização de actina continua e Spir permanece ligada à extremidade final do filamento linear de actina. Fonte: modificado de KERKHOFF, 2006.

Spir-1 possui um mecanismo único de nucleação e polimerização de actina. Assim como as forminas, mas diferente do complexo Arp2/3, Spir-1 induz a polimerização de filamentos lineares de actina não ramificada (QUINLAN et al., 2005). Semelhante ao complexo Arp2/3, Spir-1 permanece ligado à extremidade final dos novos filamentos formados (Figura 8), enquanto as forminas se movem ao longo da extremidade inicial do filamento de actina. Já foi demonstrado também que Spir-1 e forminas interagem entre si, cooperando na nucleação de actina (QUINLAN et al., 2007; PFENDER et al., 2011; DAHLGAARD et al., 2007; QUINLAN et al., 2013; MONTAVILLE et al., 2014; TITTEL et al., 2015).

Além do papel de Spir-1 no desenvolvimento dos óocitos em *Drosophila* (KERKHOFF, 2006), também já foi descrito o envolvimento de Spir-1 no processo de transporte exocítico e na biogênese dos endossomos (MOREL et al., 2009; KERKHOFF et al., 2001; SCHUH, 2011). Recentemente, o papel de Spir-1 no tráfico de vesículas e na nucleação de actina foi relacionado ao comportamento invasivo e metastático de células cancerígenas (LAGAL et al., 2014). Além disso, já foi descrito que a bactéria *Vibrio cholerae* promove a colonização intestinal alterando o citoesqueleto das células hospedeiras, através da modulação dos nucleadores de actina Spir-1 e Formina (TAM et al., 2007). Curiosamente, em um estudo sobre a associação de genes específicos relacionados à resposta humoral contra a *Variola virus*, encontrou-se uma associação entre polimorfismo de nucleotídeo único (SNPs) em Spir-1 nessa diminuição dessa resposta (OVSYANNIKOVA et al., 2012). Recentemente, BELIN e colaboradores (2015), demonstraram que os nucleadores de actina Spir-1 e Spir-2, bem com as forminas, estão envolvidos no reparo eficiente do dano ao DNA. Assim, existem outras prováveis funções de Spir-1 ainda para serem descobertas.

A regulação da função de Spir-1 é pouco conhecida. Um possível mecanismo seria através da ligação a RhoGTPases, entretanto a interação entre Spir e Rho ainda precisa ser confirmada (ROSALES-NIEVES et al., 2006). Outro provável mecanismo seria através de sua fosforilação pela MAPK JNK, uma vez que existe um sítio de ligação a JNK na extremidade da porção C-terminal de Spir. Através de transfecção transiente, foi demonstrado que a proteína Spir de *Drosophila* (p150-Spir) e JNK colocalizam, bem como ocorre a fosforilação de p150-Spir por essa

MAPK (OTTO et al., 2000). Entretanto, essa regulação de Spir via JNK ainda precisa ser melhor estudada.

3.1.4. Modulação das MAPKs pelo VACV

Normalmente, o sucesso da replicação viral se dá em células metabolicamente ativas e capazes de prover toda a maquinaria traducional necessária para a multiplicação viral (McFADDEN, 2005). Para tal, o VACV possui a capacidade de estimular mitogenicamente células quiescentes, induzindo a proliferação de células não infectadas, através da codificação de fatores de crescimento homólogo ao EGF (fator de crescimento epidérmico), que atua de forma parácrina ao estimular mitogenicamente as células vizinhas àquelas infectadas (BULLER et al., 1988; SEET et al., 2003). A secreção do fator de crescimento do *Vaccinia virus* (VGF), por exemplo, participa da ativação da via MEK/ERK e, quando deletado, ocasiona uma atenuação drástica da infecção em modelos animais (Figura 9) (BULLER et al., 1988; ANDRADE et al., 2004; McFADDEN, 2005; BONJARDIM, 2016 – em preparação). Além disso, estudos do Grupo de Transdução de Sinal do Laboratório de Vírus demonstraram que esta ativação de MEK/ERK acarreta na indução da expressão do gene de resposta precoce ao crescimento (Egr-1) e é necessária a uma eficiente multiplicação do VACV em fibroblastos murinos (Figura 9) (DE MAGALHÃES et al., 2001; ANDRADE et al., 2004; SILVA et al., 2006; BRASIL, 2010). Também foi demonstrado que essa via leva à indução da expressão do fator transcricional de c-fos em resposta à infecção pelo VACV e que a mesma é requerida para aumentar a eficiência de disseminação da progênie viral (Figura 9) (DE MAGALHÃES et al., 2001; OLIVEIRA, 2013). Além da proteína VGF, a proteína O1 do VACV também é capaz de sustentar a ativação das MAPKs ERK1/2 induzida pela infecção viral (Figura 9) (SCHWENEKER et al., 2012). Em contrapartida, GEDEY e colaboradores (2006) demonstraram a inibição específica de ERK2 pela proteína viral M2, tendo essa inibição um papel na inibição da ativação de NF-κB (Figura 9), reforçando a ideia de que esses vírus desenvolveram múltiplas estratégias de modulação das vias de sinalização intracelular a fim de favorecer um ambiente propício para sua replicação (BONJARDIM, 2016 – em preparação).

Estudos do nosso grupo também mostraram que a infecção pelo VACV leva à ativação das MAPKs MKK4/7/JNK1/2 e que, apesar da formação de IMVs não ser

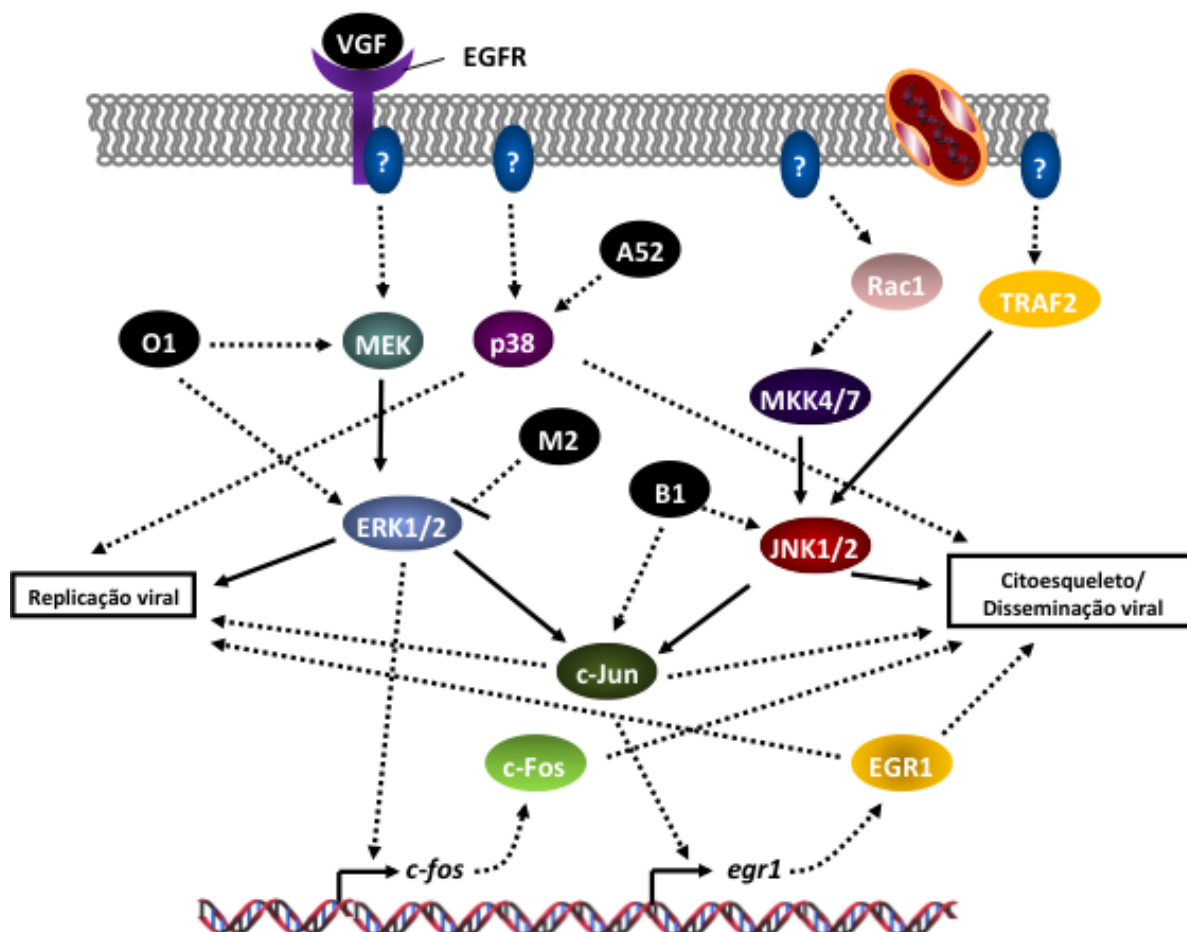


Figura 9. Modulação das MAPKs pelo VACV.

A infecção pelo VACV leva à ativação das vias das MAPKs ERK, JNK e p38, ao longo de seu ciclo de multiplicação, regulando processos como a replicação e a disseminação viral. As proteínas virais (em preto) VGF, O1, A52, M2 e B1 já foram descritas como envolvidas na modulação dessas MAPKs.

afetada na ausência de JNK1/2, observa-se uma desorganização acentuada nas redes de microtúbulos e actina, levando a uma desregulação no tráfico viral para periferia das células e no aumento da liberação de partículas envelopadas (Figura 9) (LEITE, 2010; PEREIRA et al., 2012). Além disso, a ausência de JNK1/2 acarretou numa diminuição do número de caudas de actina induzidas pelo VACV. Entretanto, o mecanismo pelo qual a via de JNK regularia a disseminação viral ainda não foi determinado. Mais recentemente, HAGA e colaboradores (2014) demonstraram o papel de TRAF2 na ativação de JNK1/2 em tempos iniciais após a infecção pelo VACV (Figura 9). Também já foi demonstrado que a proteína B1 do VACV pode interagir com a proteína JIP1 (proteína do tipo arcabouço), e esse complexo aumenta a quantidade e estabilidade de JNK fosforilada ligadas à JIP1, uma proteína do tipo arcabouço que participa da sinalização de JNK, levando a um aumento da atividade de fatores transcricionais, tais como c-Jun (Figura 9) (SANTOS et al., 2006).

Em relação à MAPK p38, dados não publicados no nosso grupo (ALBARNAZ, 2014) mostraram a ativação desta proteína em tempos tardios após a infecção pelo VACV, e a inibição farmacológica dessa MAPK acarretou na diminuição da multiplicação e disseminação desse vírus (Figura 9). Anteriormente, foi demonstrado que a proteína A52 do VACV estaria participando da ativação de p38, simultaneamente ao seu papel inibitório da via de NF- κ B, através de mecanismos distintos (Figura 9) (MALONEY et al., 2006, STACK et al., 2013).

Em conjunto, todos esses trabalhos demonstram que o VACV regula a ativação das MAPK durante a infecção, em prol do seu sucesso multiplicativo e/ou disseminativo.

3.2. NF- κ B e mecanismos de evasão do VACV

3.2.1. NF- κ B

NF- κ B é um mediador chave da resposta imune inflamatória, sendo composto por dímeros de uma família de fatores de transcrição contendo as proteínas p65 (ou RelA), c-Rel, RelB, p50 e p52. Todas essas moléculas possuem um domínio Rel C-terminal de homologia, que medeia suas homo e hetero-dimerizações. p65 e c-Rel normalmente se heterodimerizam com p50, enquanto RelB forma heterodímeros com p52 (VALLABHAPURAPU & KARIN, 2009).

A ativação da via de NF- κ B é mais estudada através dos processos desencadeados pelos receptores de IL-1 β e TNF- α . Na primeira, a ligação de IL-1 β ao seu receptor leva ao recrutamento de proteínas acessórias tais como MyD88 (Fator de diferenciação mielóide 88), IRAK (Cinase associada ao receptor de IL-1) 1 e 4, e TRAF (Fator associado ao receptor do fator de necrose tumoral) 6. TRAF6 é uma E3 ubiquitina ligase, que catalisa a ligação de cadeias de poliubiquitina nas proteínas de ligação a TAK1 (TAB) 2 e TAB3, através do resíduo de Lis63 (DENG et al., 2000). Essa poliubiquitinação ativa a cinase TAK1 (Cinase ativada pelo fator transformante de crescimento- β) (WANG et al., 2001), necessária tanto para ativação de NF- κ B, quanto para a ativação das MAPKs JNK e p38 (Figura 10) (NINOMIYA-TSUJI et al., 1999; WANG et al., 2001). No caso de TNF- α , após ligação ao receptor, outras proteínas acessórias são recrutadas, como TRAF2 e TRAF5, ambas também E3 ligases, levando finalmente à ativação de TAK1 (ADHIKARI et al., 2007).

A sinalização de ativação de NF- κ B, após TAK1, converge para o complexo IKK (I κ B cinase), que consiste das IKKs canônicas IKK α e IKK β (ZANDI et al., 1997), e do modulador essencial de NF- κ B (NEMO) ou IKK γ , o componente regulatório do complexo (ROTHWARF et al., 1998). As IKKs fosforilam membros da família de inibidores de κ B (I κ B), que normalmente mantêm NF- κ B no citoplasma, numa forma inativa (Figura 10). Diversos estudos vêm demonstrando o papel central do complexo IKK na ativação de NF- κ B, principalmente no que se refere à importância do processo de ubiquitinação na regulação desse complexo. Resumidamente, a ubiquitinação via Lis63 é necessária em duas etapas da ativação

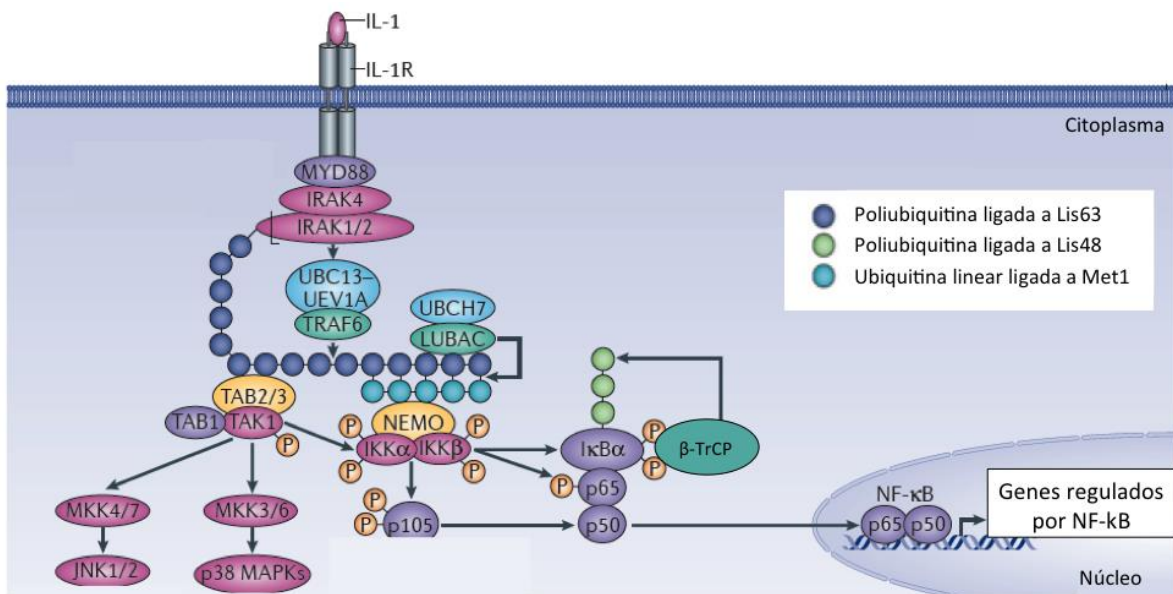


Figura 10. Ativação da via de NF-κB.

A ligação de IL-1β ao seu receptor (IL-1R) induz a ativação de TRAF6, levando a geração de cadeias de poliubiquitina ligadas a Lis63, que servem como substrato para o complexo LUBAC gerar cadeias de ubiquitina linear ligadas a Met1. Esse processo culmina na ativação de TAK1 e do complexo IKK. A ativação do complexo IKK leva então a fosforilação de IκBα, o que induz sua poliubiquitinação por β-TrCP, através do resíduo Lis48, sinalizando então para sua degradação via proteassomo. NF-κB então se transloca para o núcleo e induz a transcrição de citocinas pró-inflamatórias e IFN-β. TAK1 também contribui para a ativação das MAPKs JNK e p38. Fonte: modificado de CLARK et al., 2013.

do complexo IKK. Primeiro, é necessária para ativação de TAK1 (como descrito acima), e segundo, é requerida para a formação das cadeias de ubiquitina linear ligadas a NEMO, através do resíduo Met1 (EA et al., 2006; WU et al., 2006; TOKUNAGA et al., 2009). A formação das cadeias de ubiquitina linear é catalisada pelo complexo LUBAC (Figura 10), que é composto por três subunidades: SHARPIN (Proteína de interação ao domínio RH associado a SHANK), HOIL-1 (IRP2 ubiquitina ligase heme-oxidada 1) e a subunidade catalítica HOIP-1 (Proteína de interação a HOIL1), sendo indispensável para ativação de NF- κ B (KIRISAKO et al., 2006; KENSCHKE et al., 2012; CLARK et al., 2013). Já foi demonstrado que a inativação do complexo LUBAC, e conseqüente inibição da ubiquitinação linear de NEMO e ativação de NF- κ B, acarreta numa maior ativação das MAPKs JNK e p38, sugerindo que TAK1 direcionaria sua ativação para via das MAPKs (TOKUNAGA, et al., 2009; EMMERICH et al., 2013).

A ativação do complexo IKK leva então à fosforilação de I κ B α , o que induz sua poliubiquitinação pela E3 ubiquitina ligase β -TrCP, através do resíduo Lis48, o que sinalizada para sua degradação via proteassomo (SCHERER et al., 1995). NF- κ B então se transloca para o núcleo e induz a transcrição de citocinas pró-inflamatórias e IFN β (Figura 10) (BRADY & BOWIE, 2014).

3.2.2. Inibição da via de NF- κ B pelo VACV

O VACV dispõe de diversos mecanismos para inibir a resposta imune antiviral da célula. Dentre esses mecanismos, está a inibição da via de NF- κ B. Até o momento, já foram descritos dez inibidores intracelulares da via de ativação de NF- κ B codificados pelo VACV: A46, A49, A52, B14, C4, E3, K1, K7, M2 e N1. Todos os inibidores de NF- κ B codificados pelo VACV são genes expressos precocemente durante a infecção, entretanto, inibem a via através de mecanismos distintos (Figura 11). As proteínas A46, A52 e K7 inibem ativação de NF- κ B mediada por TLR (Toll-like receptor) e IL-1 β , e não TNF- α , enquanto as outras proteínas inibem a sinalização mediada por ambas as vias (SMITH et al., 2013). Das dez proteínas citadas acima, seis pertencem à família de proteínas do tipo Bcl-2 do VACV, exemplificadas abaixo.

3.2.2.1. Família de proteínas do tipo Bcl-2

Apesar de originalmente descrita como uma virocina (KOTWAL et al., 1989), a proteína N1 do VACV é na verdade um inibidor da sinalização de IRF-3 e NF- κ B, desencadeada pelos TLRs (BARTLETT et al., 2002, DiPERNA et al., 2004). Estudos estruturais de N1 revelaram que essa proteína possuía uma conformação estrutural semelhante à dos membros das proteínas da família Bcl-2 (Linfoma de célula B), mesmo sem possuir nenhuma similaridade de sequência com as mesmas (AOYAGI et al., 2007; COORAY et al., 2007). Nos anos seguintes, diversos outros trabalhos demonstraram que as proteínas do VACV B14 e A52 (GRAHAM et al., 2008), K7 (KALVERDA et al., 2009; ODA et al., 2009) e F1 (KVANSAKUL et al., 2008), também possuíam estrutura terciária do tipo Bcl-2. Apesar de F1 também ter função anti-apoptótica, (KVANSAKUL et al., 2008), B14 e A52 não possuem essa função (GRAHAM et al., 2008).

Análises filogenéticas indicam que esses genes do VACV podem ter se originado da aquisição de um gene ancestral de mamífero que codificaria uma proteína Bcl-2 anti-apoptótica. Eventos de duplicação e diversificação gênicas permitiram que essas proteínas Bcl-2 perdessem a habilidade de inibir a apoptose e adquirissem outras funções (GRAHAM et al., 2008). Estudos subsequentes demonstraram que as proteínas A46 (FEDOSYUK et al., 2014; KIM et al., 2014) e A49 (NEIDEL et al., 2015), ambas inibidores de NF- κ B, também possuem

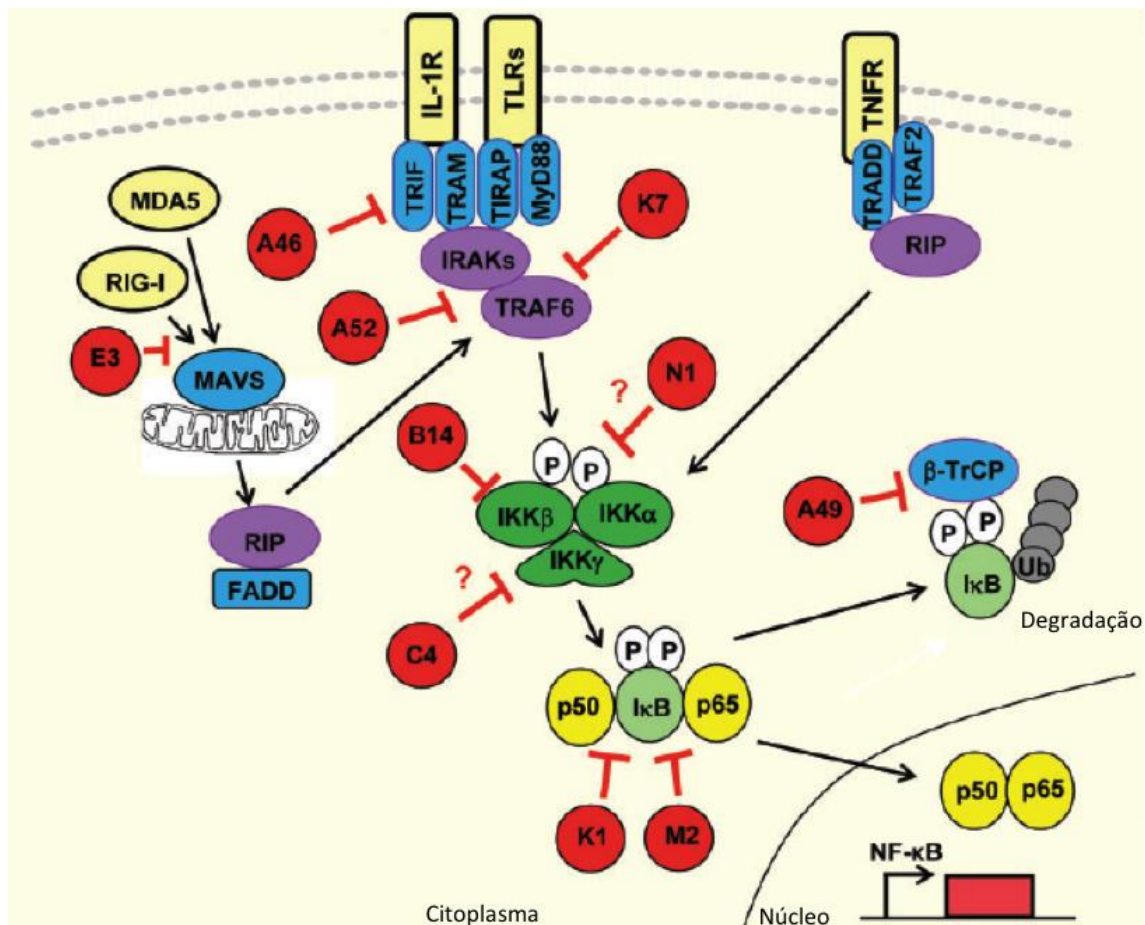


Figura 11. Inibição da via de NF-κB pelo VACV.

O sinal desencadeado pelos receptores IL-1R, TNFR e TLRs, converge na ativação do complexo IKK e subsequente ativação de NF-κB. O sítio de inibição das proteínas do VACV A46, A49, A52, B14, C4, E3, K1, K7, M2 e N1 são mostrados na figura. Fonte: modificado de SMITH et al., 2013.

conformação do tipo Bcl-2. Além disso, é predito que o VACV codifica outras proteínas do tipo Bcl-2, tais como C6, C1, C16/B22 e N2 (GONZALEZ & ESTEBAN, 2010; GRAHAM et al., 2008), que possuem outras funções imunomodulatórias durante a infecção pelo VACV.

3.2.2.2. Proteínas do tipo Bcl-2 que inibem NF- κ B

A46

A46 foi descrita como um inibidor da via de NF- κ B, após a sinalização via IL-1 β (BOWIE et al., 2000). Essa inibição se dá através de um domínio presente nesta proteína, que é similar ao domínio TIR (domínio comum presente nos receptores TLR e IL-1 β). Esse domínio é responsável pela ligação desses receptores a moléculas adaptadores transdutoras do sinal, como MyD88. A46 então se ligaria a essas moléculas adaptadores, impedindo a ligação das mesmas aos receptores, interferindo na ativação de NF- κ B e também de IRF-3 (BOWIE et al., 2000; STACK et al., 2005; STACK & BOWIE, 2012). Foi descrita também a importância desta proteína para a virulência do VACV, uma vez que a deleção do gene A46R tornou o vírus atenuado em modelo murino de infecção intranasal (STACK et al., 2005).

A49

A proteína A49 inibe a ativação de NF- κ B através de um mecanismo de mimetismo molecular, sequestrando a proteína celular β -TrCP, a ubiquitina E3 ligase necessária para a ubiquitinação e consequente degradação de I κ B α . Análises mutacionais demonstraram que A49, em sua porção N terminal, possui um domínio de ligação a β -TrCP, impedindo a ligação da mesma a I κ B α . Assim, mesmo que I κ B α esteja fosforilado, a proteína não é reconhecida por β -TrCP, e consequentemente permanece ligada a NF- κ B no citoplasma (MANSUR et al., 2013). A49 também foi demonstrado como sendo um fator de virulência, uma vez que a deleção do gene A49R torna o VACV atenuado em modelo murino de infecção intranasal (MANSUR et al., 2013).

A52

Assim como A46, a proteína A52 também bloqueia a ativação de NF- κ B mediada por IL-1R e TLR (BOWIE et al., 2000). Ensaios de imunoprecipitação mostraram que A52 interage com as proteínas IRAK2 e TRAF6 (HARTE et al.,

2003). A52 inibe a ativação de NF- κ B através de sua ligação a IRAK2, enquanto sua ligação a TRAF6 induz a ativação da MAPK p38 (MALONEY et al., 2005; KEATING et al., 2007). A52 forma um homodímero (GRAHAM et al., 2008), e essa dimerização é necessária para sua ligação a TRAF6 e consequente ativação de TAK1 e p38. Entretanto, essa dimerização não é requerida para a inibição de NF- κ B. Isso explicaria o provável mecanismo pelo qual essa proteína seria capaz de manipular TRAF6 para ativar as MAPKs, sem, no entanto, estimular a resposta antiviral desencadeada pela ativação de NF- κ B (STACK et al., 2013). Foi demonstrado também que A52 contribui para a virulência do VACV, uma vez que deleção do gene A52R torna o VACV atenuado em modelo murino de infecção intranasal (HARTE et al., 2003).

B14

Primeiramente, B14 foi descrito como um fator de virulência viral em modelo murino de infecção intradérmica (infecção local), mas não em modelo intranasal (infecção sistêmica), após infecção com o VACV deficiente para o gene B14R. Apesar dessa proteína não ter tido papel na multiplicação do VACV em cultura de célula, observou-se a formação de placas de lise menores na ausência dessa proteína após a infecção em células BSC-1 (CHEN et al., 2006).

Posteriormente, foi demonstrado que B14 é um potente inibidor da ativação de NF- κ B, sendo essa inibição devido a sua ligação a IKK β , impedindo que esta última seja fosforilada, permitindo que I κ B α mantenha NF- κ B retido no citoplasma (CHEN et al., 2008; GRAHAM et al., 2008). Foi descrito também que B14 existe em um equilíbrio entre sua forma monomérica e dimérica (GRAHAM et al., 2008). Posteriormente, foi realizado um estudo com o objetivo de identificar a região de B14 responsável pela sua ligação a IKK β , através da geração de mutações específicas em sua interface de dimerização. Dessa maneira, um mutante (Y35E), que perdeu a capacidade de se dimerizar, ainda era capaz de se ligar a IKK β e bloquear a translocação nuclear de NF- κ B, demonstrando que a habilidade de B14 em se ligar a IKK β não depende de sua dimerização. Diferentemente, um outro mutante monomérico (F130K), já não era mais capaz de ligar a IKK β , nem de inibir NF- κ B. Assim, foi demonstrado que a interface de dimerização de B14 é necessária

para sua interação proteína-proteína, não só com ela mesma, mas também com IKK β (BENFIELD et al., 2011).

O papel de B14 na inibição de NF- κ B também foi demonstrado para outros vírus, como o *Vaccinia Modificado Ankara* (MVA), uma linhagem de VACV atenuado, muito usado como vetor vacinal. A proteína homóloga a B14 no MVA, chamada de 183, possui uma deleção de 6 aminoácidos, o que a torna instável e incapaz de inibir a ativação de NF- κ B (MCCOY et al., 2010).

K7

De maneira similar a A52, K7 inibe a ativação de NF- κ B induzida por IL-1R e TLRs, interagindo com ambas proteínas IRAK2 e TRAF6. Entretanto, diferentemente de A52, K7 também é um inibidor da ativação de IRF3 e IRF7. Essa função é exercida através da ligação de K7 com a proteína celular DDX3 (SCHRODER et al., 2008; ODA et al., 2009). Análises estruturais posteriores demonstraram que K7 é encontrado como um monômero, e não como um dímero (KALVERDA et al., 2009, ODA et al., 2009). Além disso, foi demonstrado que K7 é um fator de virulência, uma vez que a deleção do gene K7R torna o VACV menos virulento em modelo de infecção intranasal e intradérmico (BENFIELD et al., 2013).

N1

N1 foi descrito como um fator de virulência, uma vez que o vírus deletado para o gene N1L é atenuado em ambos modelos murino de infecção intranasal e intradérmico (BARTLETT et al., 2002). Estudos posteriores demonstraram que N1 era capaz de interferir na via de sinalização desencadeada pelos TLRs, inibindo a ativação de NF- κ B e de IRF-3. Entretanto, o mecanismo de ação de N1 ainda é incerto, acreditando-se que seu alvo seria alguma proteína presente acima do complexo IKK e abaixo das proteínas TRAF (DiPERNA et al., 2004). Além disso, N1 é o único membro da família Bcl-2 que, além de inibir a via de NF- κ B, também é capaz de inibir a apoptose (AOYAGI et al., 2007; COORAY et al., 2007). Recentemente, foi demonstrado que a inibição da apoptose e da ativação de NF- κ B pela proteína N1 ocorrem de maneiras distintas, sendo a dimerização da proteína essencial para a inibição de NF- κ B. Além disso, observou-se que a função anti-apoptótica de N1 não é necessária para virulência do VACV in vivo, ao passo que a

inibição da sinalização pró-inflamatória via NF- κ B é essencial para a atenuação vista durante infecção pelo VACV-deIN1 (MALUQUER de MOTES et al., 2011).

II. JUSTIFICATIVA

Os vírus compõem um grande grupo de agentes infecciosos de composição única na natureza, sendo constituídos basicamente por um genoma, DNA ou RNA, fita simples ou dupla, envolvidos por um arcabouço protéico (capsídeo), podendo ainda ser revestido ou não por um envelope lipídico. Os vírus possuem uma limitada capacidade codificadora gênica, e apesar de codificarem proteínas capazes de modular vias celulares do hospedeiro, ainda são dependentes da maquinaria biossintética celular, sendo então parasitas intracelulares obrigatórios.

Assim, todos os vírus, à sua maneira, são capazes de “se beneficiar” da célula em todos os sentidos. O sucesso da replicação do genoma viral e da geração de sua progênie depende tanto da subversão das vias sinalizadoras celulares a favor desses microrganismos como da evasão das respostas antivirais do hospedeiro. Desta maneira, o controle de vias sinalizadoras celulares tem-se mostrado um amplo repertório utilizado por diferentes vírus e um objetivo comum: multiplicação e disseminação eficientes.

Nos últimos anos, o Grupo de Transdução do Sinal da UFMG vem estudando a fundo a ativação e a relevância biológica das vias das MAPKs durante a infecção pelo vírus VACV. Entretanto, pouco ainda se sabe sobre o mecanismo pelo qual o VACV modula a atividade das MAPKs, bem como as possíveis proteínas virais envolvidas nesse processo. Faz-se, então, necessário um maior estudo acerca dessa modulação, visando contribuir para o esclarecimento dos mecanismos pelos quais o VACV manipula as vias sinalizadoras celulares em prol do sucesso da sua multiplicação. Sabendo que a via de NF- κ B e das MAPKs compartilham proteínas ativadoras em comum, seria de extrema valia investigar se as proteínas do VACV envolvidas na regulação de NF- κ B poderiam também estar envolvidas na regulação da via das MAPKs, como já foi descrito para a proteína viral A52. Além disso, apesar do fator transcricional AP-1 ser um substrato comum de todas as MAPKs, são poucos os dados na literatura sobre a sua regulação pelo VACV, bem como qual MAPK e quais fatores transcricionais estariam envolvidos nessa regulação. Assim, mais estudos se fazem necessários a fim de se conhecerem melhor as proteínas virais envolvidas na modulação da via das MAPKs/AP-1.

Adicionalmente, sabendo das diversas funções que a MAPK JNK desempenha durante a infecção pelo VACV, este trabalho também busca um melhor entendimento sobre o mecanismo pelo qual estas MAPKs desempenham seu papel na regulação da disseminação do VACV. Uma vez que já foi demonstrado que a ausência de JNK1/2 leva a uma diminuição do número de caudas de actina induzidas pelo VACV, faz-se relevante a avaliação da participação do nucleador de actina Spir-1 nesse processo, uma vez que Spir-1 é um possível substrato de JNK. Estudos preliminares do nosso grupo visaram desvendar melhor essa possível regulação. Para tal, foram utilizadas células A31 expressando estavelmente a proteína Spir selvagem (Spir-WT) ou sua versão expressando apenas a região C-terminal (Spir-CT), a qual não possui o motivo WH2 envolvido na nucleação dos monômeros de actina. Nossos resultados demonstraram existir um defeito na formação de caudas de actina nas células Spir-CT em comparação com as células Spir-WT. Entretanto, esses estudos precisam ser corroborados por metodologias alternativas e aprofundados. Além disso, seria de extremo interesse comprovar o papel de Spir-1 na formação das caudas de actina, principalmente após a descoberta da participação das forminas nesse processo, uma vez que ambas, Spir-1 e forminas, interagem de maneira a potencializar a nucleação de actina. Vale ressaltar que a provável participação de Spir-1 na formação das caudas de actina durante a infecção pelo VACV contribuiria para um melhor conhecimento acerca das funções exercidas por essa proteína, ainda pouco conhecidas.

III. OBJETIVOS

1. Objetivo Geral

Investigar a modulação da via das MAPKs por proteínas virais do tipo Bcl-2 durante a infecção pelo *Vaccinia virus*, bem como o papel da via JNK/Spir-1 na biologia viral.

2. Objetivos Específicos

- 2.1. Avaliar o papel das proteínas A46, A49, A52, B14, K7 e N1 do VACV na indução de AP-1;
- 2.2. Caracterizar a contribuição de B14 para a ativação da via das MAPKs/AP-1;
- 2.3. Examinar se a MAPK JNK interage com a proteína celular Spir-1 durante a infecção pelo VACV;
- 2.4. Analisar o papel da proteína celular Spir-1 durante a multiplicação e disseminação do VACV, utilizando células deficientes ou siRNA para Spir-1.
- 2.5. Avaliar o efeito de JNK e Spir-1 sobre o tamanho das caudas de actina induzidas pelo VACV.

IV. MATERIAL E MÉTODOS

1. Células

1.1. Células *BSC-40* e *BSC-1*

As células BSC-40 (gentilmente cedidas pelo Dr. Bernard Moss – National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Bethesda, Maryland, Estados Unidos) e BSC-1 (utilizadas no laboratório do Prof. Geoffrey L. Smith – University of Cambridge – UK), são linhagens contínuas de células epiteliais derivadas de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*). Elas foram cultivadas em meio mínimo essencial (MEM), suplementado com 6% de soro fetal bovino (SFB), acrescido de L-glutamina a 200mM, bicarbonato de sódio a 2,25g/L, antibióticos (gentamicina a 40µg/mL e penicilina a 200U/mL) e antifúngico (anfotericina B a 1,5 µg/mL). Estas células foram mantidas a 37°C, sob atmosfera de CO₂ a 5%.

1.2. Células *HeLa*

As células HeLa, derivadas de câncer cervical humano, foram cultivadas em meio mínimo essencial (MEM), suplementado com 10% de SFB, L-glutamina a 200mM, bicarbonato de sódio a 2,25 g/L, antibióticos (gentamicina a 40 µg/mL e penicilina a 200 U/mL) e antifúngico (anfotericina B a 1,5 µg/mL). Estas células foram mantidas a 37°C, sob atmosfera de CO₂ a 5%.

1.3. Células *HEK293T*

As células HEK293T, de rim embrionário humano, foram cultivadas em meio mínimo essencial modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado com 10% SFB e antibióticos (gentamicina a 40 µg/mL e penicilina a 200 U/mL) e antifúngico (anfotericina B a 1,5 µg/mL). As células foram mantidas a 37°C, sob atmosfera de CO₂ a 5%.

1.4. Células *selvagem e knockout para JNK1/2*

Os fibroblastos embrionários murinos (MEFs) selvagem (+/+) e deficientes(-/-) para JNK1/2 (TOURNIER et al.,2000) foram gentilmente cedidos pelo Dr. Roger Davis (University of Massachusetts Medical School, EUA). Os MEFs JNK1/2 foram

cultivados em meio DMEM, suplementado com 7% de SFB e com os antibióticos penicilina (200 U/mL) e gentamicina (40 µg/mL). Estas células foram mantidas a 37°C, sob atmosfera de CO₂ a 5%.

1.5. Células selvagem e knockout para *Spir-1*

Os fibroblastos embrionários murinos (MEFs) selvagem (+/+) e deficientes(-/-) para *Spir-1* (KERKHOFF et al.,2013) foram gentilmente cedidos pelo Dr. Eugen Kerkhoff (University Hospital Regensburg, Alemanha). Os MEFs *Spir-1* foram cultivados em meio DMEM, suplementado com 10% de SFB e com os antibióticos penicilina (200 U/mL) e gentamicina (40 µg/mL). Estas células foram mantidas a 37°C, sob atmosfera de CO₂ a 5%.

1.6. Células RK-13

As células RK-13, derivadas de rim de coelho, foram cultivadas em meio mínimo essencial (MEM), suplementado com 7% de soro fetal bovino (SFB), L-glutamina a 200 mM, bicarbonato de sódio a 2,25 g/L e antibióticos (gentamicina a 40 µg/mL e penicilina a 200 U/mL). Estas células foram mantidas a 37°C, sob atmosfera de CO₂ a 5%.

2. Vírus

No Brasil, o *Vaccinia virus* WR (linhagem *Western Reserve*) foi cedido pelo Dr. Flávio Guimarães da Fonseca (Departamento de Microbiologia, ICB/UFMG). O *Vaccinia virus* recombinante F13-GFP (VACV-F13L-GFP) foi gentilmente doado pelo Dr. Bernard Moss (NIHID, USA) (HUSAIN & MOSS, 2001).

Os vírus mutantes VACV-delA46, VACV-delA49, VACV-delA52, VACV-delB14, VACV-delK7, VACV-delN1e o VACV recombinante A5-GFP (VACV-A5-GFP) foram cedidos e utilizados no laboratório do Prof. Geoffrey L. Smith.

2.1. Produção dos estoques virais

Células BSC-40 ou RK-13 foram cultivadas em garrafas de 150cm² até atingirem 90% de confluência, quando foram infectadas com os VACV utilizados nesse trabalho, com uma MOI (multiplicidade de infecção) de 0,01 pfu (unidades formadoras de placa), em meio suplementado com 1% de SFB. As células foram

mantidas a 37°C, e monitoradas ao microscópio óptico até o aparecimento de 90% de efeito citopático (ECP) (cerca de 48 horas após a infecção), quando foram coletadas através de raspagem, centrifugadas a 2.500rpm por 15min a 4°C (rotor A384 – Sorvall RT6000B) e, então, congeladas a -20°C para a posterior purificação.

2.2. Purificação viral

A purificação dos estoques virais foi realizada de acordo com metodologia descrita por JOKLIK (1962). Resumidamente, as células coletadas foram submetidas à lise mecânica e química através do uso de um macerador (“douncer”), e do tampão de lise (MgCl₂ 1 mM; Tris-HCl 10 mM pH 7,0; KCl 10 mM), e centrifugadas a 2.500 rpm por 15 minutos a 4°C (rotor A384 – Sorvall RT6000B). O sobrenadante, contendo os vírus e restos celulares, foi coletado e centrifugado em colchão de sacarose a 36% a 14.000 rpm por 1h20 a 4°C (rotor AH 629 Sorvall), para a remoção dos restos celulares. O sedimento foi suspenso em tampão Tris-HCl 10 mM pH8,0, e sonificado por 2 ciclos de 30s. A seguir, a suspensão viral foi novamente submetida a colchão de sacarose a 36% a 14.000 rpm por 1h20 a 4°C (rotor AH 629 Sorvall). O sedimento obtido foi centrifugado em tampão Tris-HCl 10 mM pH8,0 a 20.000 rpm por 50 minutos a 4°C (rotor AH 629 Sorvall), para a remoção da sacarose. O sedimento resultante foi então coletado, suspenso no mesmo tampão, distribuído em alíquotas e congelado a -70°C, para posterior titulação e uso nos experimentos.

2.3. Titulação viral

A titulação dos estoques virais obtidos e dos experimentos descritos a seguir foi realizada de acordo com metodologia proposta por CAMPOS & KROON (1993). Resumidamente, células BSC-40 ou BSC-1 foram cultivadas em placas de seis poços (poço de 9,6 cm²), até atingirem cerca de 90% de confluência. As células foram então inoculadas com 200 µL de uma série de diferentes diluições, realizadas na razão de 10, da suspensão contendo o vírus a ser titulado, em duplicata. Após 1h de adsorção viral, foi adicionado meio contendo 1% de SFB. A revelação foi realizada após 48 horas de infecção, através da fixação das culturas com formalina a 10% por 30 minutos e coloração com solução de cristal violeta a 1% (p/v) em etanol 20% (v/v), por 15 minutos. As culturas contendo entre 10 e 100 placas de lise foram

utilizadas para a determinação do título viral, expresso em pfu/mL (unidades formadoras de placa por mL).

3. Anticorpos e Drogas

Os anticorpos anti-fosfo-p38 (Thr180/Tyr182), anti-fosfo-ATF-2 (Thr71), anti-fosfo-ERK-1/2 (Thr202/Tyr204), anti-fosfo-JNK-1/2 (Thr183/Tyr185), anti-fosfo-c-Jun (Ser73), anti-c-Fos (9F6), anti-Myc (9E11) e anti-IgG de coelho e camundongos conjugados a peroxidase foram adquiridos da Cell Signaling Technology. Os anticorpos anti- β -actina, anti-Spir-1, anti-GAPDH, anti-Flag e anti-HA foram adquiridos da Sigma-Aldrich. O anticorpo anti- β -tubulina foi adquirido da Millipore. Os anticorpos contra as proteínas virais C6, C16, D8 e B14 foram gentilmente cedidos pelo Prof. Geoffrey L. Smith. Todos os anticorpos foram utilizados nos ensaios de transferência “Western”, nas diluições recomendadas pelos fabricantes.

Os inibidores de MEK (U0126 – 1,4-diamino-2,3-diciano-1,4-bis(2-aminofeniltio)-butadieno) e p38 (SB202190 – 4-(4-fluorofenil)-2-(4-hidroxifenil)-5-(4-piridil)-1H-imidazol) foram adquiridos da Cell Signaling Technology. O inibidor de JNK (JNK inhibitor VIII – N-(4-amino-5-ciano-6-etoxipiridin-2-il)-2-(2,5-dimetoxifenil)-acetamida) foi adquirido da Calbiochem.

4. Silenciamento de Spir-1 por siRNA

Neste estudo, foi utilizada a tecnologia de RNA de interferência para silenciar a expressão do gene de *Homo Sapiens Spire-1* (Número de acesso no Genbank: NM_001128626), que codifica para o nucleador de actina Spir-1. Para tanto, foram utilizadas as seguintes sequências de siRNA desenhadas e validadas pela QIAGEN: Hs-SPIRE1-7 (Cat. SI03225355), Hs-SPIRE1-9 (Cat. SI04260529), Hs-SPIRE1-10 (Cat. SI04279044), e Hs-SPIRE1-11 (Cat. SI04657933), além do siRNA controle: AllStars Negative Control (Cat. SI03650318).

As células HeLa crescidas em placas de 24 poços foram utilizadas para a transfecção transiente, segundo protocolo estabelecido pelo fabricante do reagente de transfecção HiPerFect (Qiagen). Resumidamente, 15 ng dos siRNAs indicados acima foram diluídos em 100 μ L de OptiMEM (Invitrogen), aos quais foram adicionados 4,5 μ L do reagente HiPerFect, seguido de homogeneização. Após 10 minutos de incubação à temperatura ambiente, a mistura foi então adicionado às

células contendo 500 µL de meio de cultura completo, totalizando um volume final de 600 µL por poço (concentração final de 2 nM de siRNA por poço). Após 48 horas de transfecção, as células foram então infectadas por tempos determinados de acordo com o objetivo dos experimentos propostos. Em paralelo, as células foram submetidas à extração de proteínas totais, seguida de transferência de *Western*, segundo as metodologias do itens 6 e 7. O software ImageJ foi utilizado para detecção da intensidade das bandas analisadas, e o siRNA controle foi utilizado como referência para o cálculo da eficiência de silenciamento de Spir-1.

5. Infecção

Células HeLa, HEK ou MEFs foram cultivadas em placas de 6 poços ou em placas de 10 cm, quando foram ou não transfectadas e/ou carenciadas, de acordo com o experimento proposto. As células foram então infectadas com VACV-WR ou VACV mutantes, nas MOIs escolhidas, em meio sem SFB e mantidas por 1h, sob agitação intermitente, para a adsorção viral. A seguir, foi adicionado meio contendo 1% de SFB e as células foram incubadas por tempos variados, quando a monocamada foi então lavada duas vezes com PBS e congelada, para posterior extração de proteínas totais ou imunoprecipitação. Para os experimentos de titulação da produção viral, após os diferentes tempos de infecção, as células mais o meio de cultura foram congelados e descongelados três vezes para promover a lise celular e liberação da progênie viral. O lisado celular foi utilizado para a determinação dos títulos virais em células BSC-40 ou BSC-1, conforme descrito no item 2.3.

6. Extração de Proteínas Totais

Após lavagem com PBS e congelamento, as células foram lisadas com tampão de lise gelado [Triton X-100 1%; Tris-HCl 100 mM pH 8,0; EDTA 0,2 mM; glicerol 20% (v/v); NaCl 200 mM; NaVO₃ (ortovanadato de sódio) 1 mM; NaF (fluoreto de sódio) 50 mM PMSF (fenilmetilsulfonilfluoreto) 1mM; aprotinina 5 µg/mL; leupeptina 2,5 µg/mL; DTT 1 mM], utilizando-se 100 µL/poço durante 20 minutos, no gelo. A seguir, as células foram raspadas e coletadas em tubos de 1,5 mL. O lisado foi clarificado através de centrifugação a 14.000 x g por 15 minutos a 4°C, para eliminação dos restos celulares. O sobrenadante foi coletado e a concentração de

proteínas totais foi determinada por espectrofotometria, utilizando o kit Bio-RadAssay (Bio-Rad Laboratories). Em seguida, as proteínas foram distribuídas em alíquotas e mantidas a -20°C.

7. Transferência de *Western*

Tampão LB ("loading buffer") 5x [Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; β-mercaptoetanol 5%; azul de bromofenol 0,1% (p/v); glicerol 20% (p/v)] foi adicionado a alíquotas de cerca de 30 µg/amostra das proteínas totais, que foram, então, desnaturadas por 5 minutos a 99°C. As proteínas foram fracionadas em gel de 10% poliacrilamida/SDS (PAGE) a 100V e transferidas para membrana de nitrocelulose Hybond ECL (GE Healthcare) ou de PVDF (fluoreto de polivinilideno) Hybond-P (GE Healthcare), conforme protocolo do kit Bio-Rad Transference (Bio-Rad Laboratories). A seguir, as membranas foram bloqueadas durante 30 minutos em solução de leite em pó desnatado a 5% (p/v) e Tween-20 a 0,1% (v/v) em PBS. Após o bloqueio, as membranas foram lavadas três vezes em PBS/Tween-20 a 0,1% e incubadas com o anticorpo primário desejado por 24h a 4°C, na diluição recomendada pelo fabricante, em albumina sérica bovina (BSA) a 5% (p/v) em PBS/Tween-20. As membranas foram novamente lavadas três vezes em PBS/Tween-20 e incubadas, por 1h a temperatura ambiente, com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase, na diluição recomendada pelo fabricante em leite em pó desnatado a 5% (p/v) em PBS/Tween-20. Após nova sessão de lavagens por três vezes em PBS/Tween-20, as membranas foram incubadas em solução reveladora ECL Plus (GE Healthcare) pelo tempo recomendado pelo fabricante, expostas contra filme de raio X (Hyperfilm ECL-GE Healthcare) e reveladas com revelador e fixador (Kodak), de acordo com as instruções do fabricante.

8. Imunoprecipitação

Células HEK foram implantadas em placas de 10 cm e transfectadas com os plasmídeos citados na Tabela 1, usando o reagente Fulgene-6 (Roche). Após 24 horas de transfecção, essas células foram infectadas pelo VACV (MOI=3) por 18 horas. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e submetidas a extração de proteínas totais em 400 µL do tampão de imunoprecipitação (IP) - 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 10 mM CaCl₂, 0.1% (v/v) Triton-X, 10 % (v/v) glicerol, além de

dos inibidores de protease e fosfatase (Roche). A seguir, as células foram raspadas e coletadas em tubos de 1,5 mL. O lisado foi clarificado através de centrifugação a 14.000 x g por 15 minutos a 4°C, para eliminação dos restos celulares. Cinquenta microlitros do sobrenadante clarificado foi transferido para um tubo (Input) e o restante foi coletado e transferido para um novo tubo para o ensaio de imunoprecipitação. Trinta microlitros de esferas de agarose conjugadas a anti-HA (Sigma) foram utilizados por amostra, após lavagem em 1 mL de água, seguida por duas lavagens no tampão de IP. Em seguida, as esferas foram adicionadas diretamente aos lisados celulares, os quais foram incubados em rotação por 4h, a 4°C. Após esse tempo, as esferas foram lavadas 3 vezes no tampão de IP (centrifugando a 600 x g por 1 minuto, por lavagem), e finalmente foram ressuspensas em 20 µL de tampão LB 2x. Em seguida, tanto o Input quanto a IP, foram fracionadas como descrito no item 7 e sondados com os anticorpos desejados.

9. Ensaio de Fenótipo de Placa de Lise Viral

Os fibroblastos embrionários murinos (MEFs) selvagens e deficientes para Spir-1 foram implantados em placas de 6 poços. Após 24 horas, as células foram infectadas com diluições seriadas do VACV-WR, em razão de 10, em presença de meio semi-sólido (1,5% Carboximetilcelulose). Após 48 horas, as células foram fixadas com formalina a 10% por 30 minutos e coradas com solução de cristal violeta a 1% (p/v) em etanol 20% (v/v). Em seguida, as placas de lise foram visualizadas e fotografadas através de microscópio ótico Zeiss (Axiovert 200M), e o software Axiovision 4.6 foi utilizado para medição do raio das mesmas.

10. Ensaio de Gene Repórter

Células HeLa e HEK foram implantadas em placas de 96 poços e transfectadas com plasmídeo repórter expressando luciferase de vagalume (firefly) sob controle de AP-1 (pAP-1-Luc, gentilmente cedido pelo Dr. Andrew Bowie - Trinity College Dublin - Agilent Technologies), e com o plasmídeo pRL-TK expressando luciferase de *Renilla* (TK-Ren - Promega, 10ng/poço) como controle de transfecção. Quando indicado, as células foram também transfectadas com os plasmídeos mostrados na Tabela 1 ou com o vetor de expressão vazio (pcDNA4/TO ou EV). Todas as

Proteína	Tamanho incluindo o Tag (kDa)	Vetor
coA46-Tap	32	pcDNA4/TO
A49-Flag	22	pcDNA4/TO
coA52-Tap	27	pcDNA4/TO
Flag-coB14	15	pcDNA4/TO
Flag-coK7	20	pcDNA4/TO
coN1-Tap	17	pcDNA4/TO
HA-JNK-2	54	pcDNA3.1
HA-GFP	25	pcDNA3.1
Myc-Spir-1	86	pcDNA3.1
HA-NEMO	50	pcDNA3.1

Tabela 1. Plasmídeos utilizados nos ensaios de imunoprecipitação e gene repórter.

O nomenclatura utilizada indica se o Tag está localizado na porção T ou C terminal da proteína. Todos os plasmídeos foram gentilmente cedidos pelo Prof. Geoffrey L. Smith (Universidade de Cambridge).

transfecções foram feitas em triplicatas para cada condição analisada. A mistura de transfecção foi sempre preparada diluindo o DNA em OptiMEM (50 µL/1 µg de DNA), seguido pela adição do reagente de transfecção Fulgene-6 (Roche), na proporção de 2 µL por 1 µg de DNA, seguido de homogeneização. Após 25 minutos de incubação à temperatura ambiente, a mistura microlitros de transfecção foi distribuída por cada poço. Após 24 h de transfecção, as células foram estimuladas separadamente com TFN- α , IL-1 β ou PMA (Phorbol 12-Myristate 13-Acetate), ou foram submetidas à infecção pelo VACV. Posteriormente, as células foram coletadas com 100 µL/poço do tampão Passive Lysis Buffer (Promega). Vinte microlitros dos lisados obtidos foram utilizados para a medição de luminescência após adição de 50 µL do substrato da luciferase de vagalume (20 mM Tricina, 2.67 mM MgSO₄.7H₂O, 0.1 mM EDTA, 33.3 mM DTT, 530 µM ATP, 270 µM acetil-coenzyma A, 132 µg/ml Luciferina, 5 mM NaOH, 0.26 mM (MgCO₃)₄Mg(OH)₂.5H₂O) ou do substrato da luciferase de renilla (1 mg/mL, Prolume Ltd.), utilizando o luminômetro FLUOstar (BMG). A atividade da luciferase de vagalume em cada amostra foi normalizada pela atividade da luciferase de renilla, e esses dados foram ainda normalizados pelo controle do plasmídeo vazio (EV) não estimulado ou pelo controle não infectado (Mock), para cálculo da indução relativa.

11. Microscopia de Fluorescência

Células HeLa ou MEFs foram crescidas em lamínulas de 13 mm (Perfecta) de diâmetro e carenciadas por 12 horas em meio 1%SFB. Em seguida, as células foram infectadas com o VACV-A5-GFP ou VACV-F13-GFP. Após tempos de infecção determinados, as células foram lavadas 2 vezes com PBS, fixadas com paraformaldeído 4% por 10 minutos, e permeabilizadas com 0,2% de Triton-X100 em PBS-3%BSA. Em seguida, as células foram lavadas 3 vezes com PBS-3% BSA, e incubadas com faloidina conjugada à rodamina (Molecular Probes), para marcação do citoesqueleto de actina, durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, foram realizadas mais 3 lavagens com PBS-3%BSA e 100 µL de DAPI [Bisbenzimidazol (1mg/mL) - Sigma-Aldrich] foram adicionados às lamínulas por 10 minutos à temperatura ambiente, para marcação do DNA. Após três lavagens com PBS, as lamínulas foram montadas sobre lâminas de vidro utilizando-se uma gota de Mowiol (Sigma-Aldrich). As células foram analisadas ao microscópio

confocal a laser Zeiss Pascal (University of Cambridge) ou ao microscópio de imunofluorescência NIKON Eclipse Ti, do Centro de Aquisição e Processamento de Imagens do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (CAPI-ICB). As imagens e o tamanho das caudas de actina foram através do software ImageJ.

12. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada através do teste *t* de Student ou pela análise de variância com dois fatores (Two-way ANOVA), seguida de pós-teste de Bonferroni, através do software Prism 5.0, quando aplicável.

V. RESULTADOS

1. Caracterização da modulação das MAPKs pelo VACV

1.1. Padronização do Ensaio de Gene Repórter para AP-1

Uma vez que o fator transcricional AP-1 é um dos principais substratos das vias das MAPKs, decidiu-se que seria uma boa estratégia avaliar a modulação dessa via pelo VACV através da ativação de AP-1. Para tanto, escolhemos o ensaio de gene repórter para esse fator transcricional. O primeiro passo foi padronizar este ensaio, para determinação de qual a quantidade ideal do plasmídeo repórter a ser utilizado, bem como qual a melhor maneira de se estimular as células eficientemente. Para tal, células HeLa e HEK, ambas altamente transfectáveis, foram escolhidas.

A princípio, foram testadas duas quantidades do plasmídeo repórter AP-1-Luc, o qual expressa a luciferase de vagalume sob o controle da sequência TRE, reconhecida por AP-1. Assim, as células foram transfectadas com 50 ou 100 ng do plasmídeo por poço, concomitantemente, com 10 ng por poço do plasmídeo controle TK-*Renilla*. Esse plasmídeo é utilizado como controle interno da transfecção, uma vez que expressa a luciferase de *Renilla* de maneira constitutiva, servindo então como um normalizador de eficiência de transfecção entre as diferentes condições. As transfecções foram realizadas em placas de 96 poços, em triplicata. Após 24 horas, as células foram estimuladas, utilizando-se as citocinas IL-1 β ou TNF- α , bem como pelo clássico indutor de AP-1, o PMA, em duas concentrações diferentes, como mostrado no gráfico, por 24 horas.

Como observado na Figura 12 A e B, as citocinas utilizadas não foram capazes de induzir uma ativação de AP-1, em nenhuma das duas células utilizadas, independente da concentração testada. Diferentemente, a estimulação utilizando PMA, nas duas concentrações testadas, foi capaz de induzir significativamente a ativação de AP-1 tanto em células HeLa, quanto em HEK. Observou-se que a maior concentração de PMA utilizado (50 ng/mL) foi relativamente tóxica para as células, uma vez que houve uma mortalidade celular nessas condições. Dessa maneira, optou-se pela utilização da concentração de 10 ng/mL de PMA para os experimentos seguintes. Padronizações posteriores, só utilizando PMA, mostraram

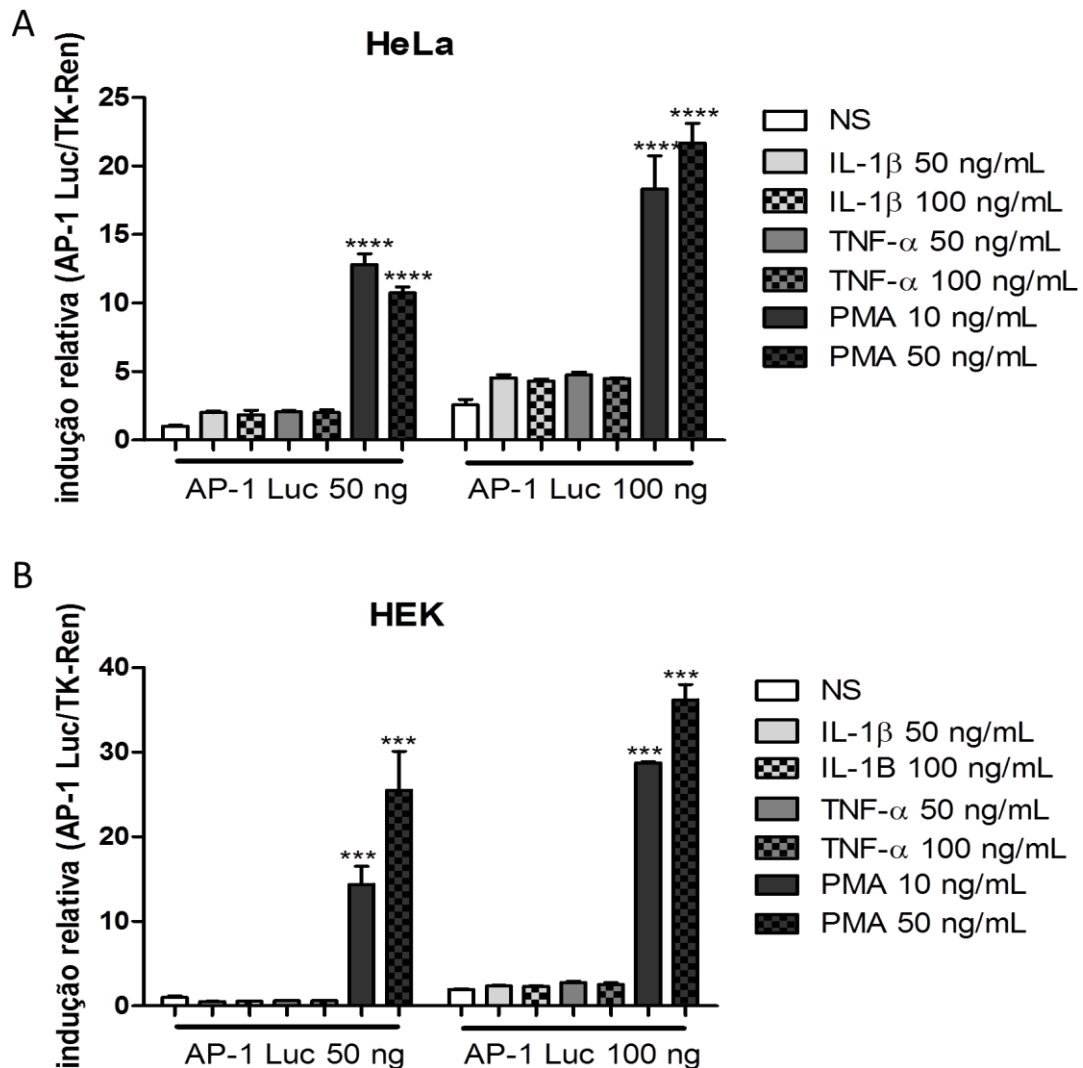


Figura 12. AP-1 é induzido pelo PMA em células HeLa e HEK.

Células HeLa (A) e HEK (B) foram transfectadas com 50 ou 100 ng do plasmídeo repórter AP-1-Luc e 10 ng do plasmídeo normalizador TK-Renilla, em placas de 96 poços. Após 24 horas, as células foram estimuladas com diferentes concentrações de IL-1 β , TNF- α ou PMA, ou foram deixadas não estimuladas (NS), por 24 horas. As células foram lisadas utilizando o Passive Lysis Buffer (Promega) e a atividade da luciferase vagalume (AP-1-Luc) foi medida e normalizada pela atividade da luciferase renila (TK-Renilla), e representada em relação ao controle NS. (***) p value < 0.0001)

que as quantidades ideais do plasmídeo repórter AP-1 a ser utilizado seria de 150 e 250 ng, para células HeLa e HEK, respectivamente, de maneira a manter uma maior reprodutibilidade entre os diferentes experimentos. Vale ressaltar que as células HeLa se mostraram mais sensíveis ao procedimento de transfecção que resultou em mais morte celular, e por esse motivo, a quantidade de plasmídeo utilizado foi mantida menor, em comparação com as células HEK.

1.2. Avaliação da regulação de AP-1 por proteínas do VACV

As vias sinalizadores que culminam na ativação de NF- κ B e AP-1 compartilham algumas proteínas em comum. Assim, após determinado estímulo, pode-se observar a indução tanto de um fator transcricional, quanto do outro. Já foram descritos, até o momento, dez diferentes proteínas expressas pelo VACV, capazes de inibir a ativação de NF- κ B. Entretanto, pouco se sabe sobre a possível modulação de AP-1 durante a infecção viral.

Dessa maneira, foram escolhidas, a princípio, seis proteínas virais (A46, A49, A52, B14, K7 e N1) que inibem NF- κ B, para a avaliação da participação das mesmas na regulação da ativação de AP-1, todas elas fazendo parte da família das proteínas Bcl-2 do VACV. Todas as proteínas foram expressas em plasmídeo pcDNA4-TO, fundidas ao tag de Flag ou TAP, para facilitar a detecção das mesmas. Com exceção da proteína A49, todas as outras foram códon-otimizadas para uma expressão mais eficiente em células humanas.

Dessa maneira, os plasmídeos expressando as proteínas virais ou o plasmídeo vazio (EV), em conjunto com os plasmídeos AP-1-Luc e TK-Renilla, foram transfectados em placa de 96 poços, em células HeLa e HEK. Após 24 horas de transfecção, as células foram estimuladas ou não (NS) com o PMA, por mais 24 horas. Após esse tempo, as células foram lisadas e a atividade da luciferase vagalume (AP-1-Luc) foi medida e normalizada pela atividade da luciferase renila (TK-Renilla). Os resultados da indução de AP-1 foram representados em relação ao EV não estimulado.

Como observado na Figura 13A e B, em ambas as células utilizadas, houve a indução de AP-1 após o tratamento com o PMA, como mostrado anteriormente. Além disso, a presença das proteínas A52, B14 ou K7 levaram a uma indução de AP-1 estatisticamente significativa em relação ao plasmídeo controle, na presença de PMA, nas duas linhagens celulares utilizadas. Mais interessante, a proteína B14 foi capaz de induzir a ativação de AP-1 mesmo na ausência de estímulo. As proteínas A46 e N1 não foram capazes de alterar significativamente a ativação de AP-1, na presença ou ausência de PMA, mantendo os níveis semelhantes ao do plasmídeo controle. Diferentemente, foi observada uma inibição da ativação de AP-

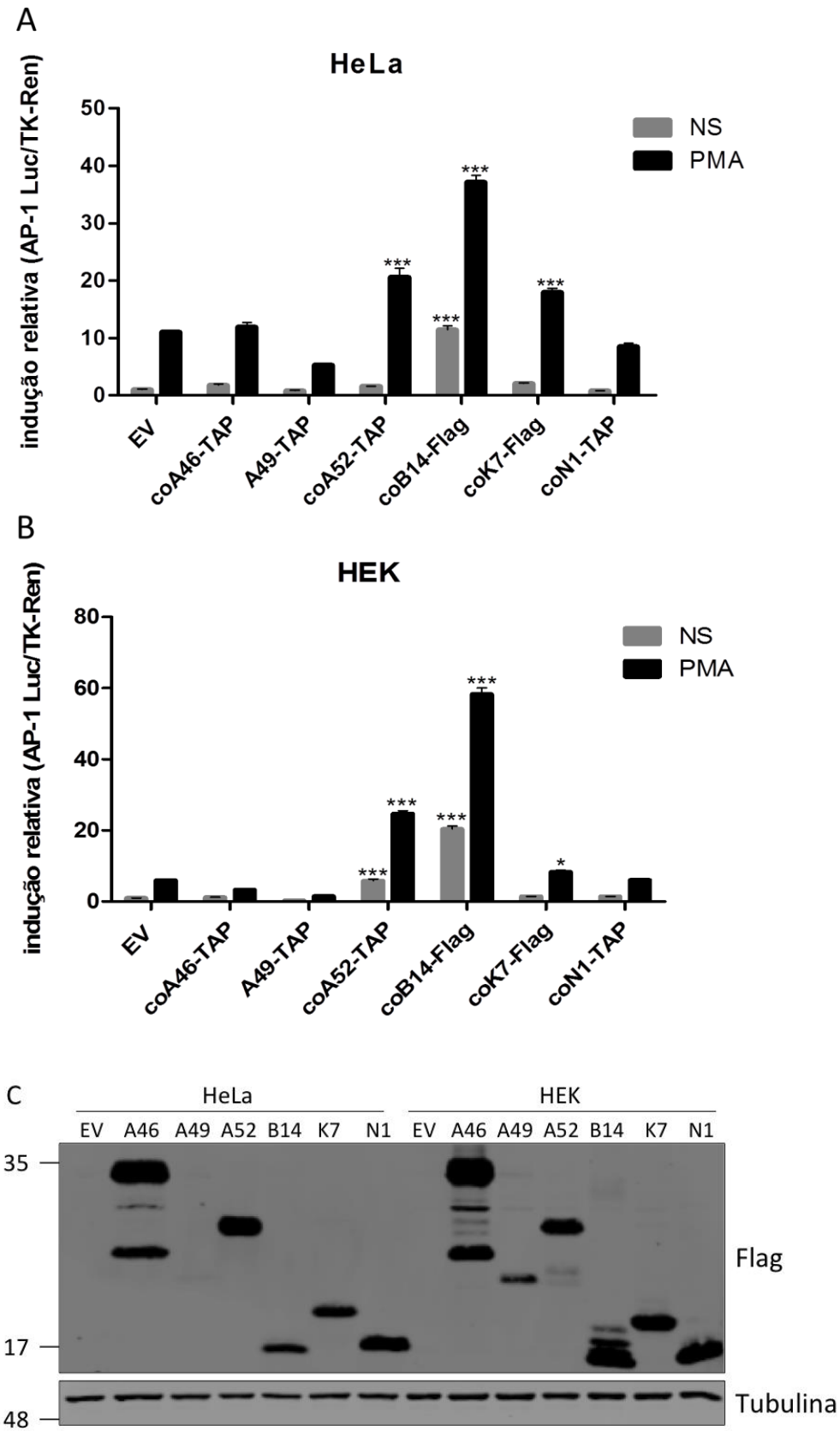


Figura 13. AP-1 é induzido pela proteínas A52, B14 e K7 do VACV, em células HeLa e HEK.

Células HeLa (A) e HEK (B) foram transfectadas com o plasmídeo repórter AP-1-Luc, o plasmídeo normalizador TK-*Renilla*, em conjunto com os plasmídeos expressando as proteínas do VACV indicadas ou plasmídeo controle (EV), em placas de 96 poços. Após 24 horas, as células foram estimuladas ou não (NS) com 10 ng/mL de PMA, por 24 horas. As células foram lisadas utilizando o Passive Lysis Buffer (Promega) e a atividade da luciferase vagalume (AP-1-Luc) foi medida e normalizada pela atividade da luciferase renila (TK-*Renilla*), e representada em relação ao plasmídeo controle não estimulado. (***) p value < 0.001, * p value < 0.05) (C) Extratos protéicos totais obtidos dos lisados foram fracionados por eletroforese em gel de poliacrilamida, seguido de transferência para membrana de nitrocelulose. As membranas foram incubadas com anticorpo primário anti-Flag, seguido de incubação com anticorpo secundário conjugado à peroxidase e revelação. O controle interno das quantidades de proteínas nas diferentes canaletas foi feito pelo uso do anticorpo primário anti-tubulina. As massas moleculares das proteínas estão indicadas na esquerda da figura.

1 na presença da proteína viral A49, sugerindo que talvez esta proteína contribua para uma inibição deste fator transcricional.

Para confirmar que os plasmídeos transfectados estavam expressando as diferentes proteínas de maneira similar durante o experimento, foi realizado ensaio de *Western* para sondagem com o anticorpo anti-Flag, capaz de reconhecer ambos os tags de Flag e TAP presentes nas proteínas. Fez-se também a incubação com o anticorpo anti-tubulina, para normalização da quantidade de proteínas em cada canaleta. Observou-se que, com exceção da proteína A49, a qual não foi códon-otimizada, todas as proteínas foram expressas de maneira similar, em ambas as células, nos tamanhos esperados para cada uma (Figura 13C). Além disso, podemos notar que a proteína A46 apresentou, além da banda de tamanho esperado (aprox. 32 kDa), duas outras bandas de tamanhos menores, que são, provavelmente, referentes a outros códons iniciadores presentes na sequência. Esses resultados foram confirmados por três experimentos distintos.

Em conjunto, esses dados sugerem que as proteínas virais A52, B14 e K7 podem, além do papel inibitório sobre a via de NF- κ B, contribuir para a ativação de AP-1.

Uma vez que as proteínas do VACV foram capazes de ativar AP-1, nosso próximo objetivo foi demonstrar que a ativação desse fator transcricional ocorreria de fato durante a infecção pelo VACV. Assim, realizou-se o ensaio de gene repórter em células HeLa na presença da infecção pelo VACV-WR, em paralelo com a infecção pelos respectivos mutantes deletados para cada um dos genes referentes às proteínas avaliadas anteriormente. Células HeLa foram então transfectadas com os plasmídeo AP-1-Luc e TK-Renilla, nas mesmas condições anteriores, em placas de 96 poços (triplicata), por 24 horas. Em seguida, infectamos ou não (MOCK) as células com os vírus (VACV-WR, VACV-delA46, VACV-delA49, VACV-delA52, VACV-delB14, VACV-delK7 e VACV-delN1) na MOI de 10, por mais 24 horas. As células foram então lisadas e a atividade da luciferase de vagalume foi medida e normalizada pela atividade da luciferase de renilla. Os resultados foram representados em relação às células não infectadas.

Como observado na Figura 14A, a infecção pelo VACV-WR selvagem foi capaz de induzir a ativação de AP-1 em cerca de 60 vezes. Os vírus deficientes para A46 e N1 tiveram a mesma indução de AP-1 que o vírus selvagem. Já os vírus VACV-delA52, VACV-delB14 e VACV-delK7 apresentaram uma redução estatisticamente significativa na indução de AP-1, em comparação com o vírus selvagem. Diferentemente, a ausência de A49 fez com que a ativação de AP-1 fosse ainda maior, corroborando o resultado das células transfectadas. Entretanto, outros estudos são necessários para esclarecer este dado.

Para demonstrar que a infecção ocorreu de forma semelhante entre todos os vírus utilizados, os lisados obtidos foram fracionados em gel de poliacrilamida e transferidos para membrana de nitrocelulose. Em seguida, foi realizada a incubação com anticorpo primário que reconhece a proteína viral tardia C16, ou com anticorpo anti-tubulina, para normalização da quantidade de proteínas em cada canaleta. Observou-se que a infecção ocorreu para todos os vírus utilizados, uma vez que todos os vírus tiveram níveis comparáveis da expressão de C16 (Figura 14B). Esse experimento foi confirmado por três repetições distintas.

Esses resultados confirmam que as proteínas virais A52, B14 e K7 realmente possuem papel na ativação de AP-1, uma vez que a ausência das mesmas durante a infecção acarretou numa diminuição na indução do gene repórter dependente de AP-1.

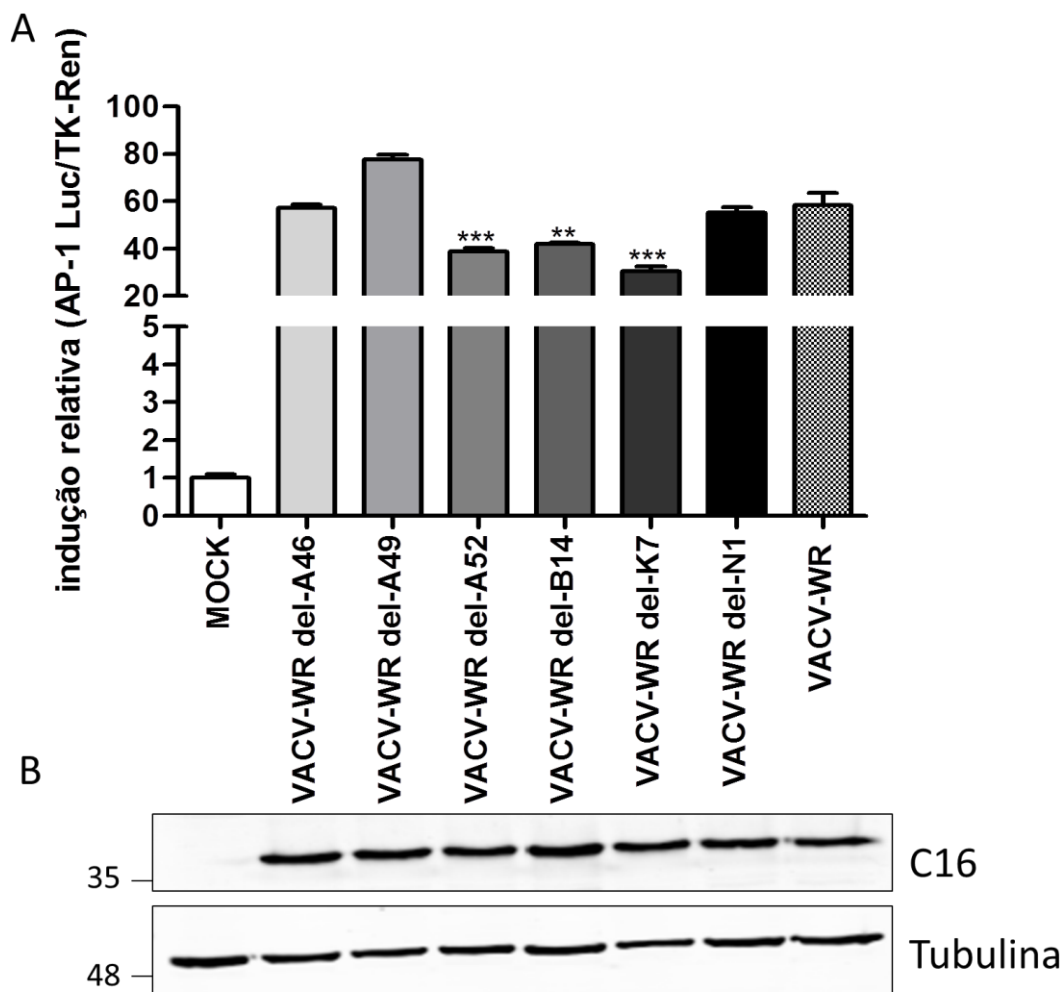


Figura 14. AP-1 é diferencialmente induzido por mutantes de VACV.

(A) Células HeLa foram transfectadas com o plasmídeo repórter AP-1-Luc e o plasmídeo normalizador TK-*Renilla*, em placas de 96 poços. Após 24 horas, as células foram infectadas com diferentes mutantes de VACV (MOI = 10), por 24 horas. As células foram lisadas utilizando o Passive Lysis Buffer (Promega) e a atividade da luciferase vagalume (AP-1-Luc) foi medida e normalizada pela atividade da luciferase renila (TK-*Renilla*), e representada em relação ao mock não infectado. A análise estatística foi realizada entre o VACV e os VACV mutantes (***) p value < 0.001, ** p value < 0.01) (B) Extratos protéicos totais obtidos dos lisados foram fracionados por eletroforese em gel de poliacrilamida, seguido de transferência para membrana de nitrocelulose. As membranas foram incubadas com anticorpo primário anti-C16, seguido de incubação com anticorpo secundário conjugado à peroxidase e revelação. O controle interno das quantidades de proteínas nas diferentes canaletas foi feito pelo uso do anticorpo primário anti-tubulina. As massas moleculares das proteínas estão indicadas na esquerda da figura.

1.3. Análise da contribuição de B14 para a ativação da via das MAPKs/AP-1

Entre as proteínas testadas anteriormente, decidiu-se investigar mais a fundo o papel da proteína B14 na regulação de AP-1, uma vez que a mesma se destacou das demais ao ativar AP-1 durante a transfecção sem necessitar de nenhum estímulo. Deste modo, foi realizado um ensaio de dose-dependência, para confirmar que a ativação de AP-1 por B14 ocorria de maneira específica. Para tal, células HeLa foram transfectadas com os plasmídeos AP-1-Luc e TK-Renilla, em conjunto com quantidades crescentes do plasmídeo expressando B14, ou com o plasmídeo vazio (EV) como controle, em triplicata. Para evitar variações experimentais devido às diferentes quantidades de plasmídeo transfectados, a mesma quantidade final de DNA foi mantida em cada condição, dessa maneira, os poços transfectados com quantidades menores de B14 foram também transfectados com o plasmídeo controle, mantendo uma quantidade final fixa de DNA por poço, para cada condição. Após 24 horas de transfecção, adicionou-se o PMA, ou as células foram deixadas não estimuladas (NS), por mais 24 horas. Após a lise das células, foi realizada a leitura da atividade da luciferase de vagalume, a qual foi normalizada pela atividade da luciferase de renilla. Os resultados foram representados em relação ao EV não estimulado. Observou-se que quanto maior a quantidade de B14 presente, maior a ativação de AP-1, tanto na presença quanto na ausência de PMA (Figura 15), confirmando a habilidade de B14 na ativação deste fator transcricional, de maneira específica e dose-dependente. Esse resultado foi confirmado por três repetições distintas.

Para confirmar este resultado, foi realizado o ensaio de gene repórter na presença da infecção pelos vírus VACV selvagem ou mutante deletado para o gene B14R. Células HeLa foram transfectadas com os plasmídeos AP-1-Luc e TK-Renilla, nas mesmas condições anteriores, em placas de 96 poços em triplicata, por 24 horas. Em seguida, as células foram infectadas ou não (MOCK) com os vírus VACV-WR (selvagem) ou VACV-delB14, nas MOIs de 1, 3 ou 10, por mais 8 ou 24 horas. As células foram então lisadas, e a atividade da luciferase de vagalume foi medida e normalizada pela atividade da luciferase de renilla. Os resultados foram representados em relação ao controle não infectado de cada tempo pós infecção. Como observado na Figura 16A, já em 8 horas pós infecção, o VACV já é capaz de

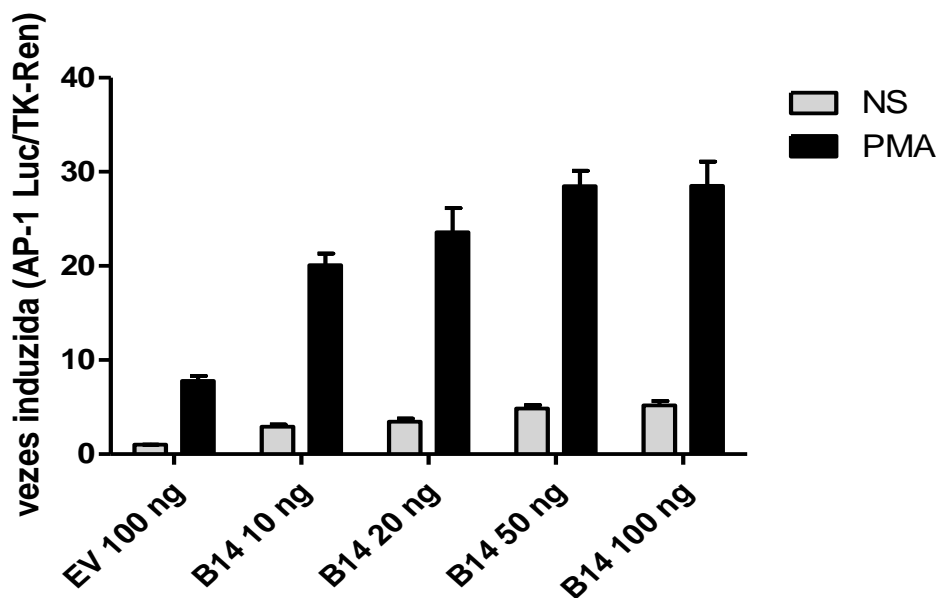


Figura 15. B14 induz a ativação de AP-1 de maneira dose-dependente.

Células HeLa foram transfectadas com o plasmídeo repórter AP-1-Luc, o plasmídeo normalizador TK-Renila, em conjunto com o plasmídeo controle (EV) ou quantidades crescentes do plasmídeo expressando B14, em placas de 96 poços. Após 24 horas, as células foram estimuladas ou não (NS) com 10 ng/mL de PMA, por 24 horas. As células foram lisadas utilizando o Passive Lysis Buffer (Promega) e a atividade da luciferase vagalume (AP-1-Luc) foi medida e normalizada pela atividade da luciferase renila (TK-Ren), e representada em relação ao plasmídeo controle não estimulado.

estimular a ativação de AP-1, sendo essa ativação ainda maior após 24 horas de infecção. Nos dois tempos avaliados, e em todas as MOIs utilizadas, a ausência da proteína B14 reflete sempre em uma menor ativação de AP-1, quando comparado a infecção pelo vírus selvagem nas mesmas condições. No tempo de 24 hpi, essa diferença é ainda mais significativa.

Afim de se confirmar que as infecções ocorreram de maneira similar entre os dois vírus, nos tempos e MOIs realizados, os lisados obtidos foram fracionados em gel de poliacrilamida e transferidos para membrana de nitrocelulose. Em seguida, foi realizada a incubação com anticorpo primário específico para proteína viral precoce C6 ou com anticorpo primário específico para proteína viral tardia D8. Para normalização da quantidade de proteínas em cada canaleta, foi feita a sondagem com o anticorpo primário anti-tubulina. Observou-se que a infecção ocorreu em níveis comparáveis para os dois vírus, e de maneira correspondente as MOIs utilizadas (Figura 16B). Esse dado foi confirmado por dois experimentos independentes.

Esses resultados confirmam então o papel de proteína viral B14 na ativação de AP-1, não só durante a transfecção, mas principalmente durante a infecção pelo VACV. É importante enfatizar que estudos de regulação de vias sinalizadores celulares do hospedeiro pelo VACV são normalmente dificultadas pelo fato do vírus codificar diferentes proteínas que possuem as mesmas funções, como é o caso das diferentes proteínas envolvidas na inibição de NF- κ B. Nesse contexto, a ausência de uma dessas proteínas inibitórias não afeta a capacidade do vírus de inibir esta via. Dessa maneira, destaca-se o fato de a ausência de somente uma proteína do VACV ter sido capaz de alterar a regulação de AP-1, mesmo na presença das outras possíveis proteínas virais com o mesmo papel.

Uma vez que a via das MAPKs é a principal responsável pela ativação de AP-1, resolvemos então avaliar a participação das MAPKs MEK/ERK, JNK e p38 na ativação de AP-1 induzida por B14. Para isso, utilizamos inibidores farmacológicos específicos dessas MAPKs: U0126 (inibidor de MEK1/2), SB203580 (inibidor de p38 MAPK) e JNK inh.VIII (inibidor de JNK1/2). Assim, células HEK foram transfectadas com os plasmídeos AP-1-Luc e TK-Renilla, em conjunto com o plasmídeo expressando B14, em triplicata. Após 24 horas de transfecção, as células foram

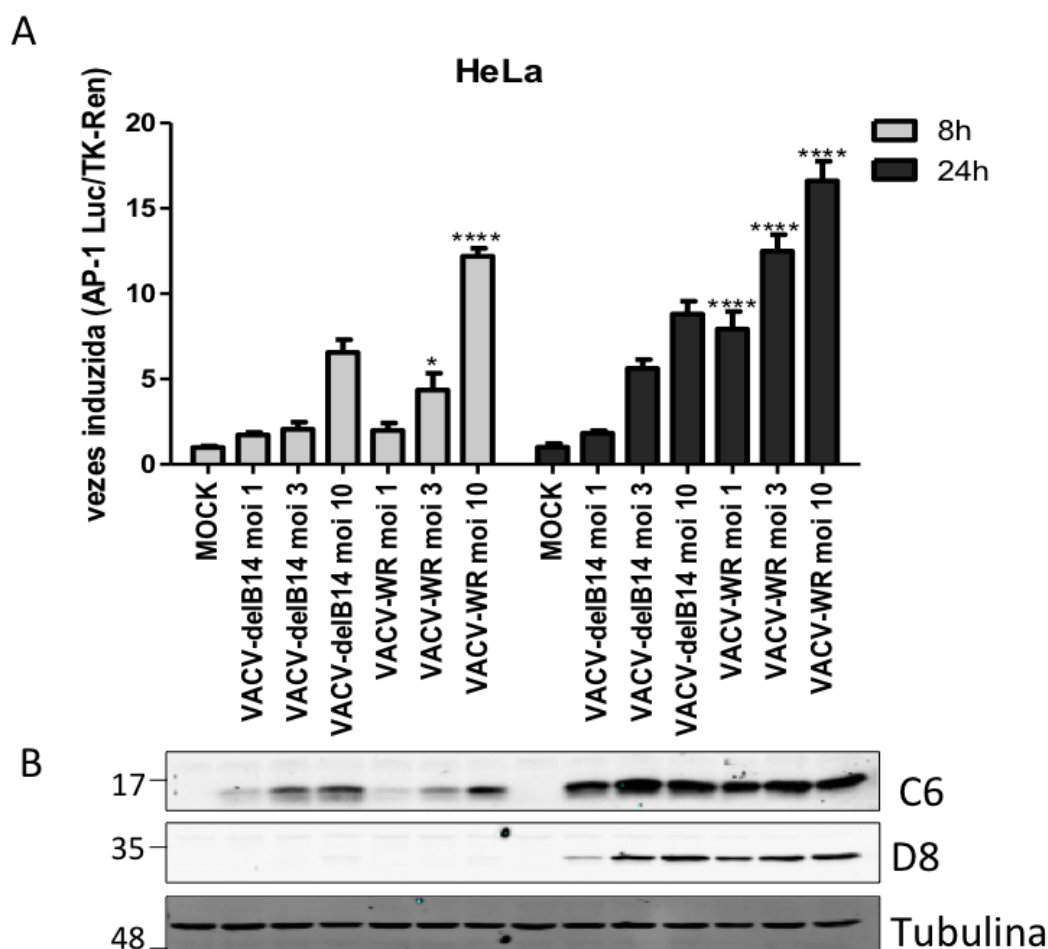


Figura 16. B14 é necessário para a máxima ativação de AP-1 após infecção pelo VACV, independente da moi utilizada.

(A) Células HeLa foram transfectadas com o plasmídeo repórter AP-1-Luc, o plasmídeo normalizador TK-*Renilla* (TK-Ren), em placas de 96 poços. Após 24 horas, as células foram infectadas com o VACV ou o VACV-delB14, na MOI de 1, 3 ou 10, por 8 ou 24 horas. As células foram lisadas utilizando o Passive Lysis Buffer (Promega) e a atividade da luciferase de vagalume (AP-1-Luc) foi medida e normalizada pela atividade da luciferase renila (TK-*Renilla*), e representada em relação ao mock não infectado de cada tempo. (**** p value < 0.0001, * p value < 0.05) (B) Extratos protéicos totais obtidos dos lisados foram fracionados por eletroforese em gel de poliacrilamida, seguido de transferência para membrana de nitrocelulose. As membranas foram incubadas com os anticorpos primários anti-C6 e anti-D8, seguido de incubação com anticorpo secundário conjugado à peroxidase e revelação. O controle interno das quantidades de proteínas nas diferentes canaletas foi feito pelo uso do anticorpo primário anti-tubulina. As massas moleculares das proteínas estão indicadas na direita da figura.

tratadas com 15 μ M de U0126, 10 μ M de SB203580, 4 μ M de JNK inh.VIII ou com DMSO como controle, e em paralelo, foram estimuladas com o PMA, por mais 24 horas. Após a lise das células, foi realizada a medição da atividade da luciferase de vagalume, a qual foi normalizada pela atividade da luciferase de renilla. Os resultados foram representados em relação ao controle não estimulado, que não foi representando no gráfico. Observou-se que, na presença de todos os inibidores, houve uma redução estatisticamente significativa da ativação de AP-1 por B14, sendo as maiores diferenças na presença dos inibidores da MEK e JNK (Figura 17). Esses resultados indicam que B14 estaria ativando AP-1, através de todas as MAPKs, mas principalmente através das MAPKs ERK e JNK, e em menor grau, através da MAPK p38.

Para confirmar esses resultados, o nosso próximo passo foi avaliar o papel de B14 na ativação de cada uma dessas cinases individualmente. Uma vez que a via das MAPKs é a principal responsável pela ativação de AP-1, também avaliamos a ativação dos fatores transcricionais c-Jun, c-Fos e ATF-2, que são algumas das proteínas que compõem o dímero de AP-1. Assim, células HeLa cultivadas em placas de 6 poços foram transfectadas com 2 μ g do vetor vazio (EV), com 1 ou 2 μ g do plasmídeo expressando B14, com 2 μ g do plasmídeo expressando GFP, ou foram deixadas não transfectadas (NT), por 24 horas. Vale ressaltar que no caso da transfecção com 1 μ g de B14, foi também adicionado 1 μ g do vetor vazio, de maneira que todos os poços foram transfectados com a mesma quantidade final de DNA. Após esse tempo, extratos protéicos totais foram obtidos e fracionados em gel de poliacrilamida, seguido de transferência para membrana de nitrocelulose. As membranas foram então incubadas com anticorpos primários contra as formas fosforiladas das proteínas indicadas, o que mostra a ativação das mesmas, e contra a proteína total c-Fos, cuja expressão é regulada em nível transcricional (MONJE et al., 2005).

Na figura 18, podemos ver um aumento nas fosforilação de ERK e JNK, bem como do fator transcricional c-Jun, na presença de B14, nas duas concentrações testadas, em relação as células transfectadas com GFP, EV ou não transfectadas. Também é possível observar um aumento nas fosforilação da MAPK p38 e do fator transcricional ATF-2, mas somente quando foi utilizada a maior quantidade B14 na

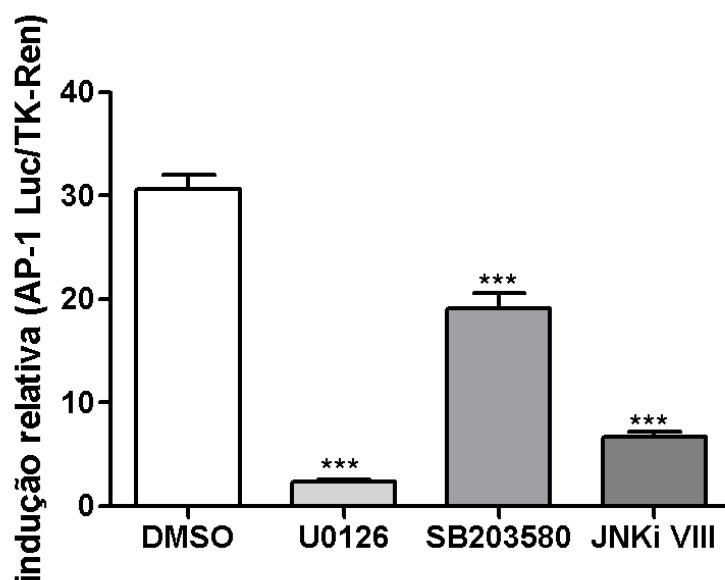


Figura 17. A ativação de AP-1 induzida por B14 é dependente das MAPKs ERK1/2 e JNK1/2.

Células HEK foram transfectadas com o plasmídeo repórter AP-1-Luc, o plasmídeo normalizador TK-*Renilla*, em conjunto com o plasmídeo expressando B14, em placas de 96 poços. Após 24 horas de transfecção, as células foram tratadas com os inibidores farmacológicos: 15 μ M de U0126 (inibidor de MEK1/2), 10 μ M de SB203580 (inibidor de p38 MAPK), 4 μ M de JNK inh.VIII (inibidor de JNK1/2), ou com DMSO. Ao mesmo tempo, as células foram estimuladas ou não (NS) com 10 ng/mL de PMA, por 24 horas. As células foram lisadas utilizando o Passive Lysis Buffer (Promega) e a atividade da luciferase vagalume (AP-1-Luc) foi medida e normalizada pela atividade da luciferase renila (TK-Ren), e representada em relação ao plasmídeo controle não estimulado (não representado no gráfico). *** p value < 0.001

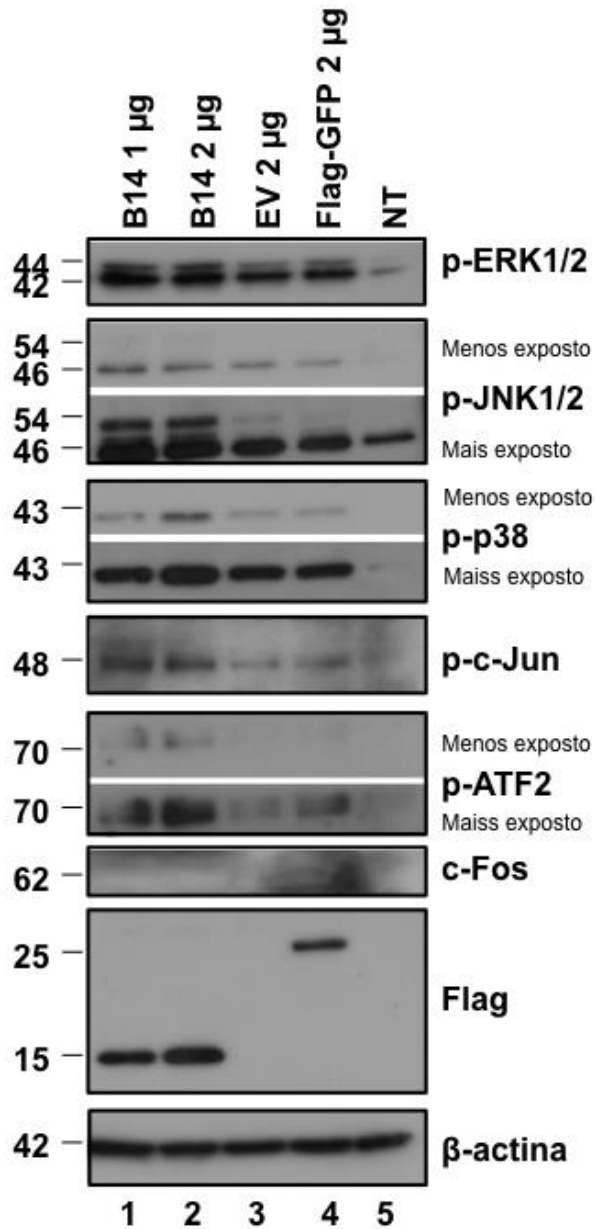


Figura 18. Contribuição de B14 para ativação das MAPKs após a transfecção.

Células HeLa foram transfectadas com o vetor vazio (EV), ou com os plasmídeos expressando B14 ou GFP, ou foram deixadas não transfectadas (NT), por 24 horas. As proteínas totais foram então extraídas, e 30 µg de proteínas foram fracionados por eletroforese em gel de poliacrilamida, seguido de transferência para membrana de nitrocelulose. As membranas foram incubadas com os anticorpo primários indicados, seguido de incubação com anticorpo secundário conjugado à peroxidase e revelação. O controle interno das quantidades de proteínas nas diferentes canaletas foi feito pelo uso do anticorpo primário anti-β-actina. As massas moleculares das proteínas estão indicadas na direita da figura.

transfecção. Nessas condições, não foi possível detectar a presença de c-Fos quando B14 foi expressa isoladamente.

Para confirmar esses resultados, decidimos avaliar a ativação dessas proteínas em células infectadas, na presença e ausência de B14. Dessa maneira, células HeLa foram cultivadas em placas de 6 poços e, após carenciamento com meio contendo 1% de SFB, foram infectadas pelo VACV-WR selvagem, pelo VACV deletado para o gene B14R, ou foram deixadas não infectadas (MOCK), durante 3, 9 ou 24 horas. Após cada tempo, extratos protéicos totais foram obtidos e fracionados em gel de poliacrilamida, seguido de transferência para membrana de nitrocelulose, e incubação com os anticorpos primários.

Podemos notar que ambos os vírus são capazes de ativar tanto as MAPKs, como os fatores transcricionais avaliados, em cinéticas semelhante ao já descrito por trabalhos do nosso grupo (ANDRADE et al., 2004; SILVA et al., 2006; PEREIRA et al., 2012; ALBARNAZ, 2014) (Figura 19). Não houve diferença entre a fosforilação de ERK e p38 quando comparamos os dois vírus, entretanto observa-se uma pequena redução na fosforilação de JNK na ausência de B14, quando comparado ao VACV selvagem, nos tempos tardios pós-infecção. Além disso, podemos verificar que há uma redução na fosforilação de c-Jun e ATF-2 na ausência de B14, em comparação ao vírus selvagem. Diferentemente, não foi observada diferença na expressão de c-Fos durante a infecção por ambos os vírus. Para confirmar que a infecção ocorreu de forma semelhantes para os dois vírus, foi realizada a incubação da membrana com o anticorpo específico para a proteína viral tardia D8. Além disso, foi confirmada a ausência da proteína B14, utilizando-se um anticorpo específico contra essa proteína, a qual estava presente somente nas células infectadas pelo vírus selvagem (Figura 19).

Em conjunto, esses resultados sugerem que a proteína viral B14 é capaz de ativar o fator transcricional AP-1 e que, durante a infecção, esta ativação se deve, principalmente, a regulação da MAPK JNK e seus substratos c-Jun e ATF-2, e não de c-Fos.

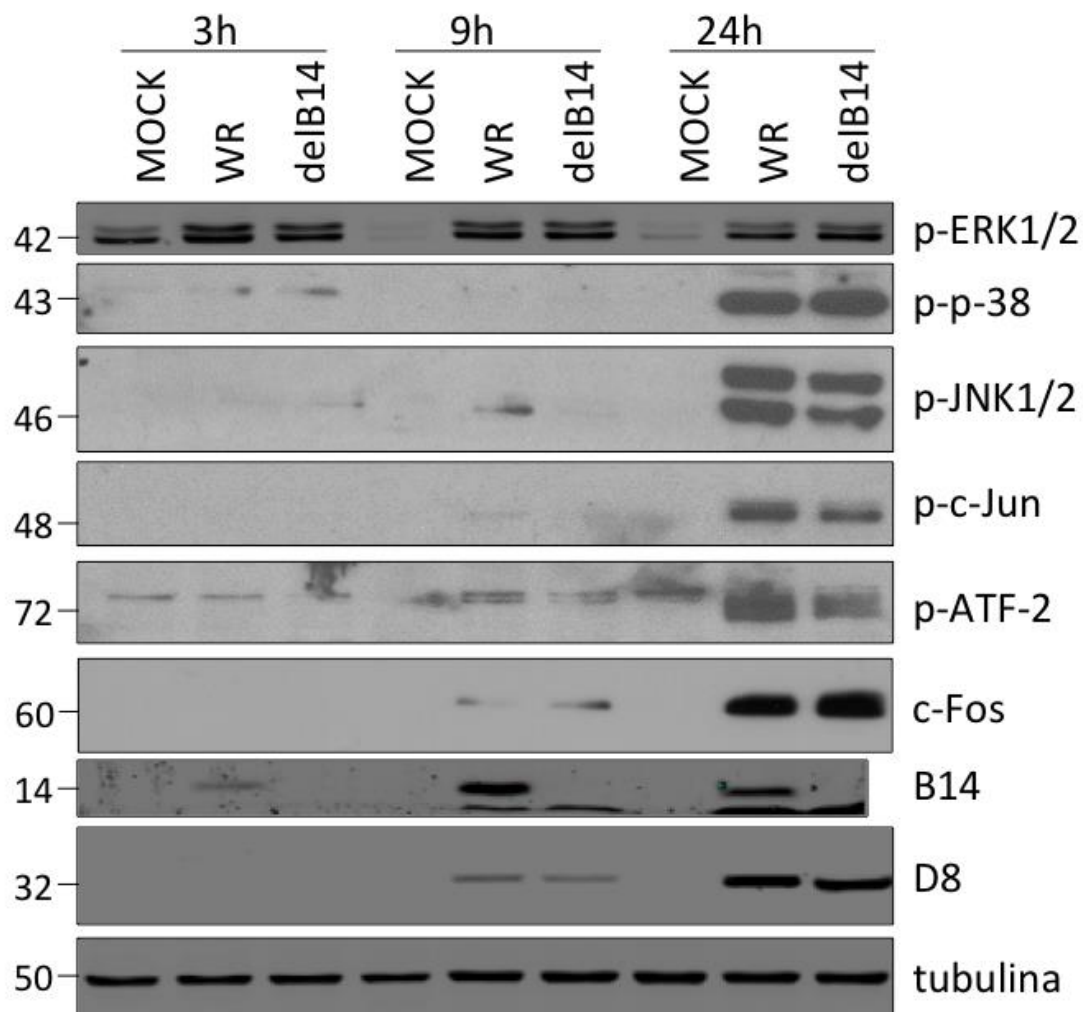


Figura 19. Contribuição de B14 para ativação das MAPKs após a infecção.

Células HeLa foram infectadas com VACV-WR ou com o VACV-delB14, por 3, 9 ou 24 horas (MOI = 5), quando tiveram suas proteínas totais extraídas. Trinta microgramas de proteínas foram fracionados por eletroforese em gel de poliacrilamida, seguido de transferência para membrana de nitrocelulose. As membranas foram incubadas com os anticorpos primários indicados, seguido de incubação com anticorpo secundário conjugado à peroxidase e revelação. O controle interno das quantidades de proteínas nas diferentes canaletas foi feito pelo uso do anticorpo primário anti-tubulina. As massas moleculares das proteínas estão indicadas na direita da figura.

2. Avaliação do papel da MAPK JNK e do nucleador de actina Spir-1 na formação de caudas de actina induzidas pelo VACV

2.1. Análise da interação da MAPK JNK com Spir-1 durante a infecção

Estudos prévios do nosso grupo demonstraram que a ausência de JNK leva a uma redução do número de caudas de actina formadas durante a infecção pelo VACV (LEITE, 2010; BRASIL, 2010). Entretanto, o mecanismo pelo qual JNK estaria regulando a polimerização de actina induzida pela infecção viral não foi elucidado. Dados preliminares sugeriram que essa regulação poderia ser via o nucleador de actina Spir-1, o qual já foi demonstrado como sendo um substrato de JNK (KERKHOFF et al., 2000).

Para demonstrar que Spir-1 interage com JNK durante a infecção pelo VACV, células HEK foram transfectadas com o plasmídeo expressando a proteína Spir-1 conjugada ao tag de Myc, juntamente com o plasmídeo expressando a proteína JNK-2 ou o plasmídeo expressando a proteína GFP, conjugadas ao tag de HA. Depois de 24 horas de transfecção, as células foram infectadas pelo VACV numa MOI de 3, por 18 horas. A monocamada foi então lavada com PBS e lisada em tampão específico para imunoprecipitação. Parte do lisado foi separada para ser usada como controle da expressão das proteínas (Input), e o restante foi incubado com esferas de agarose conjugadas ao anticorpo anti-HA por 16 horas, para imunoprecipitação de JNK ou de GFP. Em seguida, as esferas foram centrifugadas e lavadas três vezes para remoção das proteínas não precipitadas, e então ressuspensas em tampão de amostra (IP, imunoprecipitado). Tanto lisados quanto IP foram fracionados em gel de poliacrilamida e transferidos para membranas de nitrocelulose. As amostras dos lisados e da IP foram incubadas com anticorpos primários anti-Myc e anti-HA para confirmar a expressão das proteínas via plasmídeos transfectados, bem como a eficiência da imunoprecipitação. Para normalização da quantidade de proteínas em cada canaleta, as membranas foram incubadas com anticorpo anti-GAPDH.

Pode-se observar que a expressão de HA-JNK-2 é relativamente baixa, principalmente se comparada a expressão da proteína HA-GFP (Figura 20 – Input). Entretanto, podemos observar que a imunoprecipitação foi eficiente uma vez que

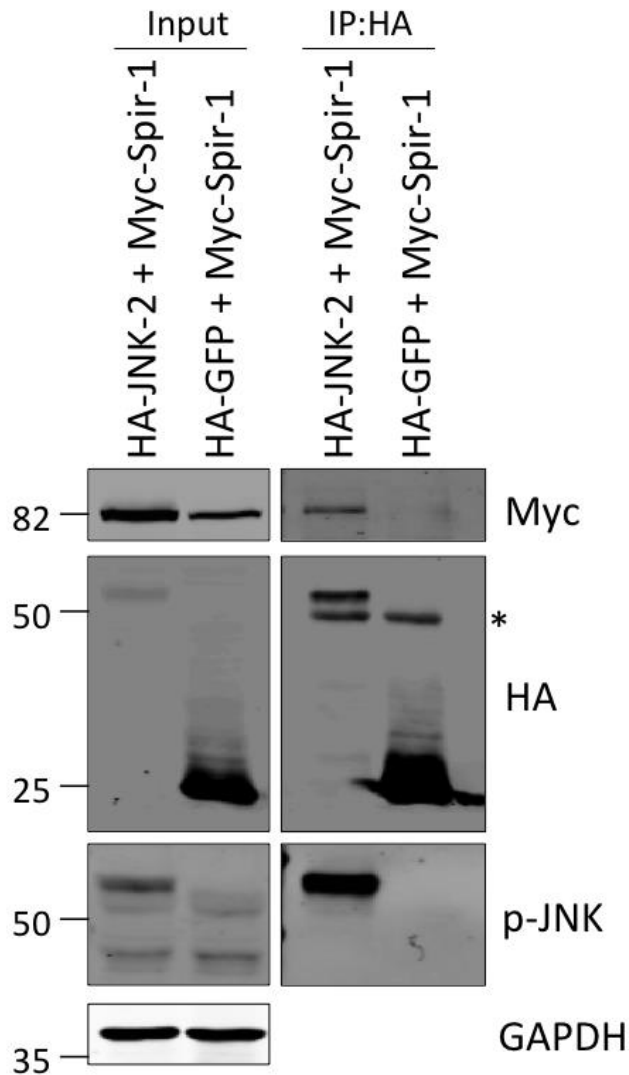


Figura 20. JNK associa com o nucleador de actina Spir-1 durante a infecção pelo VACV.

Células HEK foram transfectadas com plasmídeo expressando a proteína Myc-Spir-1 em conjunto com o plasmídeo expressando a proteína HA-JNK ou HA-GFP. Após 24 horas, as células foram infectadas pelo VACV durante 18 horas (MOI = 3). As células foram então lisadas em tampão para imunoprecitação, e o lisado clarificado foi incubado com esferas anti-HA. Os lisados (Input) e os imunoprecitados (IP) foram então fracionados por eletroforese em gel de poliacrilamida, seguido de transferência para membrana de nitrocelulose. As membranas foram incubadas com os anticorpos primários indicados, seguido de incubação com anticorpo secundário conjugado à peroxidase e revelação. O controle interno das quantidades de proteínas nas diferentes canaletas foi feito pelo uso do anticorpo primário anti-GAPDH. As massas moleculares das proteínas estão indicadas na direita da figura. *cadeia pesada do anticorpo.

ocorre um enriquecimento da presença de HA-JNK-2 nos imunoprecipitados (Figura 20 – IP). A membrana também foi incubada com o anticorpo primário anti-fosfo-JNK, para mostrar que a proteína estava em sua forma ativa durante a infecção pelo VACV. Além disso, observamos a expressão da proteína Myc-Spir-1 e que essa proteína é co-imunoprecipitada em presença de JNK, mas não de GFP, indicando que essas proteínas se associam durante a infecção pelo VACV (Figura 20 – IP). Dessa maneira, indica-se que realmente Spir-1 pode ser substrato de JNK, e que essa interação ocorre durante a infecção pelo VACV.

2.2. Avaliação do papel de Spir-1 na multiplicação do VACV

Uma vez que Spir-1 parece ser o substrato de JNK responsável por regular a formação das caudas de actina, nosso próximo passo foi avaliar se essa proteína teria um papel na multiplicação do VACV. Dessa maneira, foram realizadas curvas de ciclos múltiplos (MOI = 0,001) e de ciclo único (MOI = 10) após a infecção pelo VACV em fibroblastos embrionários murinos (MEFs) selvagens (+/+) ou deficientes (-/-) para a proteína Spir-1. Para tal, os MEFs foram cultivados em placa de 24 poços (em triplicata), infectados e, nos tempos indicados, as amostras foram tituladas em células BSC-1. Não foi possível observar nenhuma diferença na multiplicação do VACV, comparando os MEFs selvagens ou deficientes para Spir-1 (Figura 21A). Esses resultados foram confirmados por dois experimentos diferentes.

Além disso, foi realizada uma cinética de expressão de proteínas virais precoce e tardia nos MEFs, após a infecção pelo VACV. Para tal, as células foram novamente cultivadas em placa de 6 poços, carenciadas, e infectadas pelo VACV (MOI = 5). Após 3, 6, 9 ou 24 horas de infecção, as proteínas totais foram extraídas e utilizadas para ensaio de *Western* para sondagem com anticorpos primários contra a proteína viral precoce C6 e a contra a proteína viral tardia D8. Não foi observada nenhuma diferença na expressão das proteínas virais nas duas linhagens celulares (Figura 21B), confirmando que a ausência de Spir-1 não afeta a multiplicação do VACV.

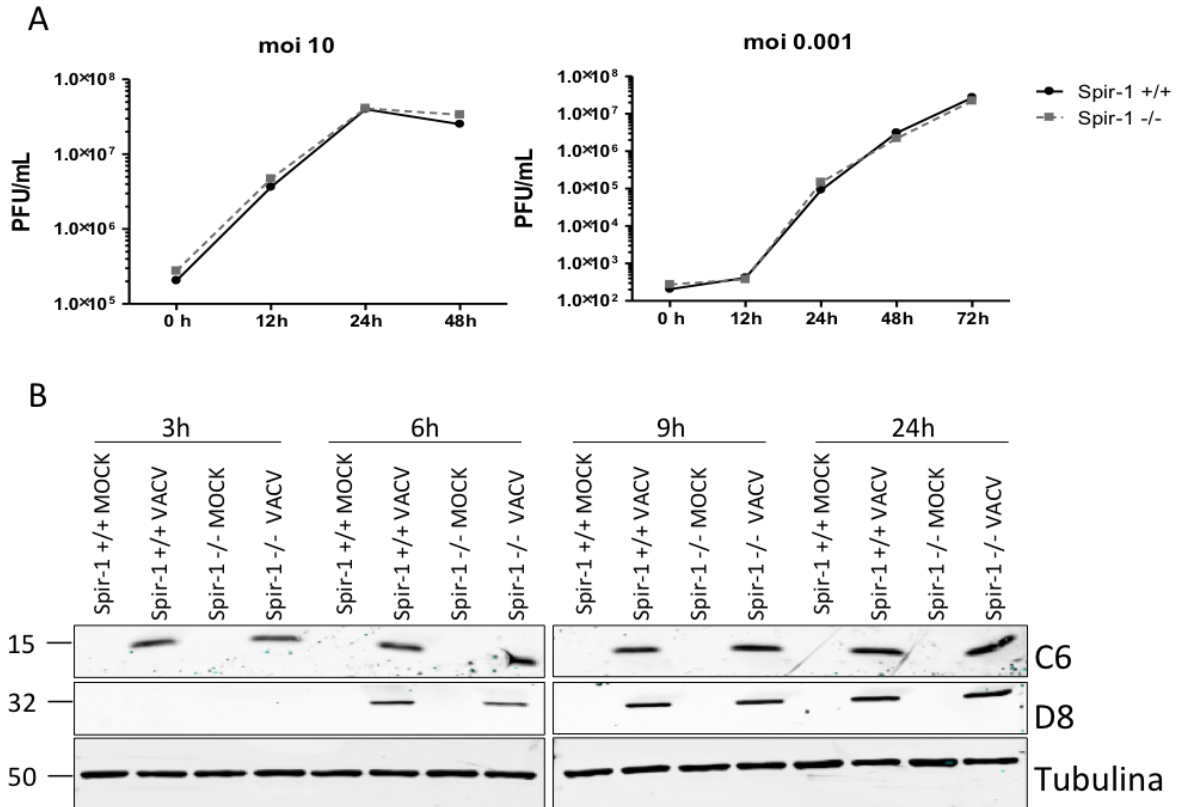


Figura 21. A multiplicação do VACV não é afetada em células deficientes para Spir-1.

(A) Células MEFs selvagem (+/+) ou deficientes (-/-) para Spir-1 foram infectadas pelo VACV-WR nas MOIs de 10 ou 0,001. Nos tempos indicados, as monocamadas foram congeladas. Após três ciclos de congelamento e descongelamento, os sobrenadantes clarificados foram titulados em células BSC-1. (B) Células MEFs Spir-1 +/+ ou -/- foram infectadas pelo VACV-WR (MOI = 5), e nos tempos indicados, tiveram suas proteínas totais extraídas. Trinta microgramas de proteínas foram fracionadas por eletroforese em gel de poliácridamida, seguido de transferência para membrana de nitrocelulose. As membranas foram incubadas com os anticorpos primários anti-C6 e anti-D8, seguido de incubação com anticorpo secundário conjugado à peroxidase e revelação. O controle interno das quantidades de proteínas nas diferentes canaletas foi feito pelo uso do anticorpo primário anti-tubulina. As massas moleculares das proteínas estão indicadas na esquerda da figura.

2.3. Avaliação do papel de Spir-1 na disseminação do VACV

Uma vez que a ausência de JNK afeta a disseminação do VACV, resolvemos verificar se a ausência de Spir-1 também teria algum efeito no tamanho da placa de lise viral, um parâmetro associado à disseminação viral (LEITE, 2010; BRASIL, 2010). Assim, MEFs selvagens e deficientes para Spir-1 foram cultivados em placa de 6 poços, e infectados com diluições seriadas do VACV, por 48 horas, para o ensaio de fenótipo de placa. Podemos observar que a placa de lise viral formada no MEF deficiente em Spir-1 é menor quando comparada a placa formada na célula selvagem (Figura 22A). Para melhor avaliar essa diferença, o raio de 25 placas de lise formadas em de cada célula foi medido, e pode-se observar uma redução estatisticamente significativa no raio das placas formadas na ausência de Spir-1 em comparação com as células selvagens (Figura 22B). Esses resultados sugerem um papel de Spir-1 na disseminação do VACV.

Como as caudas de actina contribuem para o tamanho da placa de lise viral, nosso próximo passo foi avaliar a formação das mesmas na presença e ausência de Spir-1. Para tal, MEFs selvagens e deficientes para Spir-1 foram plaqueados em lamínulas de 13 mm, e infectadas com o VACV-A5-GFP (verde) por 9 horas (MOI = 5). Em seguida, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% e permeabilizadas para marcação da actina utilizando-se faloidina conjugada a rodamina (vermelho), seguida de marcação do DNA com DAPI (azul). As imagens foram capturadas em microscópio confocal ZEISS, em aumento de 600x. Na Figura 23A, podemos observar um exemplo das imagens capturadas referentes às células infectadas. Foram capturadas 35 imagens de células individualizadas em cada condição, referentes a dois experimentos diferentes, e as caudas de actina foram então contadas. Pode-se observar que ocorre uma redução estatisticamente significativa do número de caudas de actina nos MEFs deficientes para Spir-1 em comparação ao MEFs selvagens (Figura 23B), sugerindo o envolvimento desta proteína na disseminação do VACV.

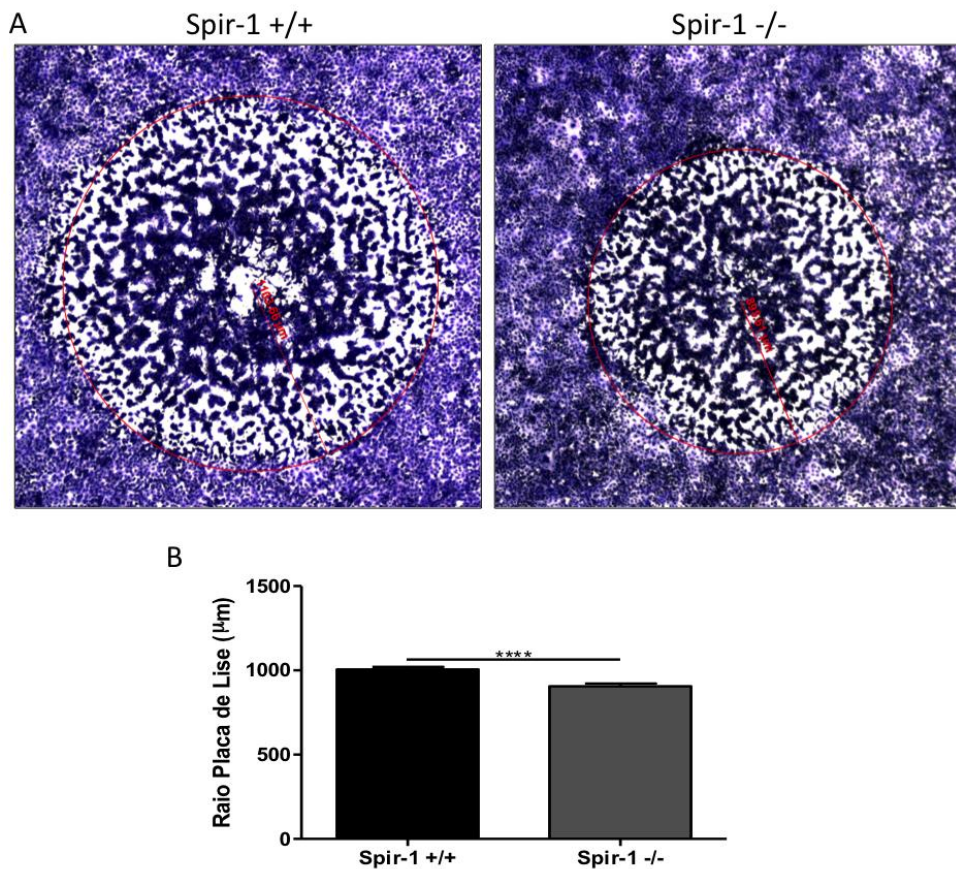


Figura 22. A placa de lise viral é afetada em células deficientes para Spir-1.

(A) Células MEFs Spir-1 +/+ ou -/- foram infectadas por diluições seriadas do VACV-WR por 48 horas, em meio semi-sólido. Em seguida, as células foram fixadas e coradas com cristal-violeta. As placas de lise foram fotografadas em microscópio ótico Zeiss (aumento de 100x), e o raio de placa de lise foi mensurado utilizando o software do microscópio. (B) Média do raio das placas de lise viral (n=25) formadas nos MEFs.

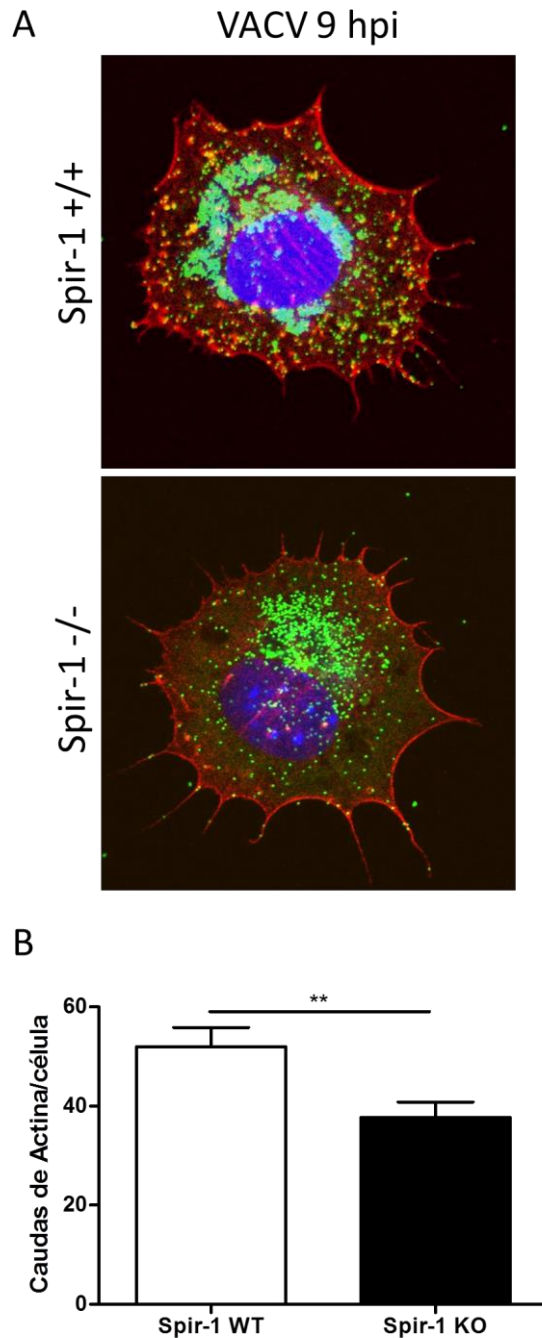


Figura 23. O número de caudas de actina é reduzido em MEFs deficientes para Spir-1.

(A) Células MEFs Spir-1 +/+ ou -/- foram crescidas em lamínulas de 13mm e infectadas com o VACV-A5-GFP (verde) por 9 horas (MOI = 5). Em seguida, as células foram fixadas e permeabilizadas para marcação com faloidina conjugada a rodamina (F-actina, 1:50, em vermelho) por 20 minutos, seguida de marcação com Dapi (DNA, azul) por 10 minutos. As imagens foram capturadas em microscópio confocal ZEISS, em aumento de 600x. (B) Representação gráfica do número de caudas de actina por célula (n=35).

Para confirmar os dados obtidos nos MEFs, resolvemos testar a participação de Spir-1 na formação das caudas em outro modelo celular. Dessa maneira, quatro sequências de siRNA específicos contra a proteína Spir-1 humana foram adquiridos (Qiagen), bem como uma sequência controle, para a qual não existe sequência alvo no genoma humano (AllStars Negative Control). Após a padronização de acordo com protocolo da Qiagen, foi estipulada a utilização de 2 nM (15 ng) de siRNA, bem como 4,5 uL de reagente de transfecção, por 48 horas. Assim, células HeLa foram transientemente transfectadas com cada sequência do siRNA (Hs7, Hs9, Hs10 e Hs11) para Spir-1, bem como com a sequência controle (As). Após 48 horas de transfecção, as células foram infectadas pelo VACV por mais 48 horas. As proteínas totais foram então extraídas e submetidas ao ensaio de *Western*. A membrana foi incubada com anticorpo primário anti-Spir-1 para confirmação do silenciamento, e o controle interno das quantidades de proteínas nas diferentes canaletas foi feito pelo uso do anticorpo primário anti-tubulina. As bandas referentes à Spir-1 e a tubulina foram quantificadas utilizando-se o programa ImageJ, para cálculo da eficiência do silenciamento. Assim, observou-se que as sequências Hs7 e Hs10 foram as mais eficientes no silenciamento de Spir-1, como respectivamente 90.5% e 95.5% de eficiência. Em comparação, a sequência Hs9 teve 62.6% de silenciamento, enquanto a sequência Hs11 não foi capaz de silenciar Spir-1 (Figura 24A).

Em seguida, foi analisada a multiplicação do VACV nas células HeLa silenciadas para Spir-1. Células HeLa transientemente transfectadas (48 horas) com as sequências de siRNA Hs7 e Hs10, ou com o siRNA controle (As) foram infectadas pelo VACV nas MOIs de 10 ou 0,001, por mais 48 horas (em duplicata). A monocamada foi congelada após esse tempo, e depois de três ciclos de congelamento e descongelamento, os sobrenadantes clarificados foram titulados em células BSC-40. Como observado na Figura 24B, não houve diferença na multiplicação do VACV nas células HeLa transfectadas com o siRNA controle quando comparado às células transfectadas com os siRNAs específicos para o silenciamento de Spir-1. Esses dados foram confirmados por dois experimentos

Afim de se confirmar o papel de Spir-1 na formação das caudas de actina, células HeLa foram crescidas em lamínulas de 13mm, e transientemente

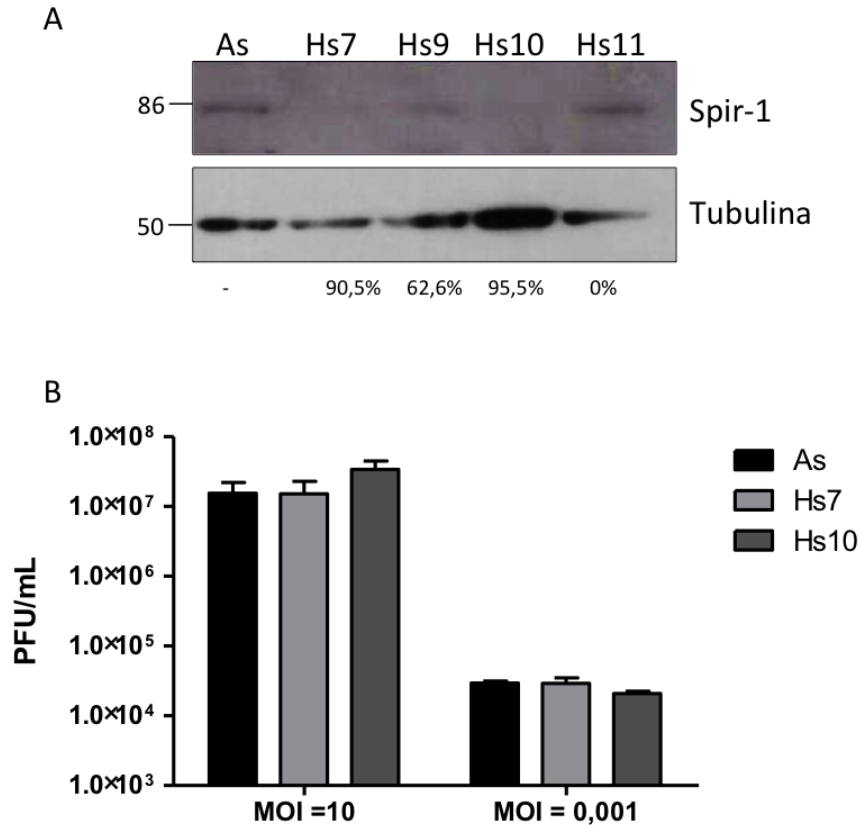


Figura 24. O silenciamento de Spir em células HeLa não afeta a multiplicação do VACV.

(A e B) Células HeLa foram transfectadas com siRNA controle (As) ou com quatro seqüências específicas para o silenciamento de Spir-1 humano (Hs7, Hs9, Hs10 e Hs11 – Qiagen), por 48 horas. Em seguida, foram infectadas com o VACV-WR por mais 48 horas, nas MOIs indicadas. (A) As proteínas totais foram extraídas e submetidas a fracionamento por eletroforese em gel de poliacrilamida, seguido de transferência para membrana de PVDF. A membrana foi incubada com anticorpo primário anti-Spir-1, seguido de incubação com anticorpo secundário conjugado à peroxidase e revelação. O controle interno das quantidades de proteínas nas diferentes canaletas foi feito pelo uso do anticorpo primário anti-actina. As massas moleculares das proteínas estão indicadas na direita da figura. As porcentagens da eficiência do silenciamento de Spir em relação ao controle (As) também são mostrados. (B) Após o tempo de infecção, as monocamadas foram congeladas. Após três ciclos de congelamento e descongelamento, os sobrenadantes clarificados referentes às células que tiveram o silenciamento mais eficiente, foram titulados em células BSC-40 independentes, e corroboram os dados obtidos no MEFs, no qual não foi visto diferença na multiplicação viral na ausência de Spir-1.

transfectadas com as sequências de siRNA Hs7 e Hs10, ou com o siRNA controle (As), por 48 horas. Em seguida, as células foram infectadas com o VACV-F13-GFP (verde) por 18 horas (MOI = 5). As células foram fixadas e permeabilizadas para marcação da actina (vermelho), bem como para marcação do DNA (azul). As imagens foram capturadas em microscópio de imunofluorescência NIKON, em aumento de 600x, como mostrado na Figura 25A. Em paralelo, para controle da eficiência de silenciamento, proteínas totais foram extraídas e submetidas a fracionamento por eletroforese em gel de poliacrilamida, seguido de transferência para membrana de PVDF. As membranas foram incubadas com anticorpo primário anti-Spir-1, bem como pelo anticorpo primário anti-actina, para controle interno das quantidades de proteínas nas diferentes canaletas. As bandas referentes à Spir-1 e à actina foram quantificadas, utilizando-se o programa ImageJ, para o cálculo da eficiência do silenciamento. Podemos observar que o silenciamento de Spir-1 foi de 72% e 80%, para as sequências Hs7 e Hs10, respectivamente, em comparação ao As (Figura 25C).

Foram capturadas 13 imagens de células individualizadas em cada condição, e as caudas de actina foram então contabilizadas. Como podemos observar na Figura 25B, houve uma redução estatisticamente significativa no número de caudas de actina nas células HeLa silenciadas para Spir-1, para as duas sequências utilizadas (Hs7 e Hs10), em comparação com as células transfectadas com o siRNA controle (As). Esse resultado representa um dado preliminar, uma vez que só foi realizado uma vez, e precisa ser repetido para confirmação. Entretanto, esses resultados vão de acordo com os dados obtidos no MEFs, o que reforça a hipótese de uma participação de Spir-1 na formação das caudas de actina induzidas pelo VACV.

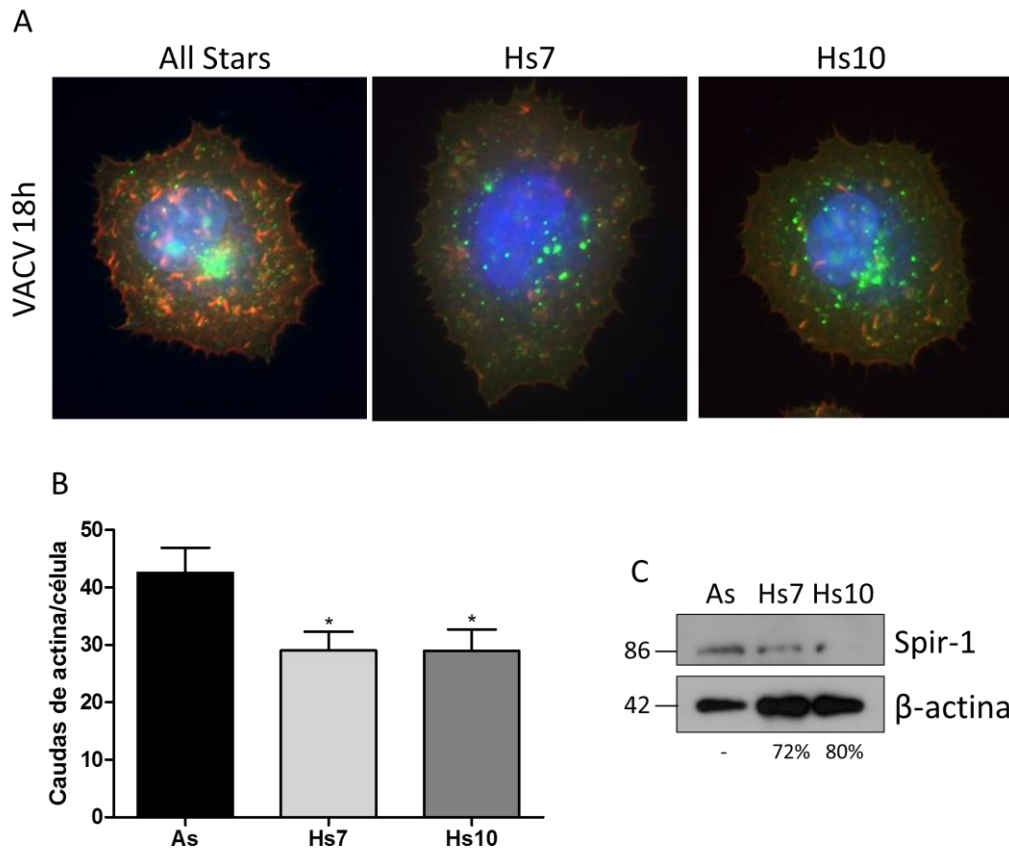


Figura 25. O silenciamento de Spir-1 afeta a formação de caudas de actina em células HeLa.

(A e B) Células HeLa foram crescidas em lamínulas de 13mm, transfectadas com siRNA controle (As) ou duas sequências específicas para o silenciamento de Spir-1 humano (Hs7 ou Hs9) por 48 horas. Em seguida, foram infectadas com o VACV-F13-GFP (verde) por 18 horas (MOI = 5). As células foram fixadas e permeabilizadas para marcação com faloidina conjugada a rodamina (F-actina, 1:50, em vermelho) por 20 minutos, seguida de marcação com DAPI (DNA, azul) por 10 minutos. As imagens foram capturadas em microscópio de imunofluorescência NIKON, em aumento de 600x. (B) Representação gráfica do número de caudas de actina por célula (n=13). (C) Para controle da eficiência de silenciamento, proteínas totais foram extraídas e submetidas a fracionamento por eletroforese em gel de poliácridamida, seguido de transferência para membrana de nitrocelulose. As membranas foram incubadas com anticorpos primários anti-Spir-1, seguido de incubação com anticorpo secundário conjugado à peroxidase e revelação. O controle interno das quantidades de proteínas nas diferentes canaletas foi feito pelo uso do anticorpo primário anti-actina. As massas moleculares das proteínas estão indicadas na esquerda da figura. As porcentagens da eficiência do silenciamento de Spir em relação ao controle (As) também são mostrados.

2.4. Análise da contribuição da MAPK JNK e de Spir-1 para o tamanho das caudas de actina induzidas pelo VACV

Dados anteriores do nosso grupo sugeriam que a ausência da MAPK JNK afetava não só o número de caudas de actina, mas o comprimento das mesmas também. Para confirmar essa observação, MEFs selvagens ou deficientes para JNK foram crescidos em lamínulas de 13 mm e infectados com o VACV-F13-GFP (verde) por 9 horas (MOI = 5). As células foram fixadas e permeabilizadas para marcação da actina (vermelho) e do DNA (azul). As imagens foram capturadas em microscópio de imunofluorescência NIKON, em aumento de 600x. Foram feitas capturas de 10 imagens de células individualizadas em cada condição, e o tamanho de 10 caudas de actina em cada célula foi medido, utilizando o programa ImageJ, totalizando 100 caudas. Como observado na Figura 26A, há uma diminuição significativa no comprimento das caudas de actina formadas nos MEFs deficientes para JNK, em comparação aos MEFs selvagem, confirmando os dados observados anteriormente.

Por último, fomos verificar se Spir-1 também teria um efeito no tamanho das caudas de actina induzidas pelo VACV. Para tal, as imagens obtidas nos experimentos anteriores, tanto nos MEFs deficientes para Spir-1, quanto nas células HeLa silenciadas para Spir-1, foram utilizadas para a medição do tamanho das caudas através do programa ImageJ (n = 100 caudas). Podemos verificar que a ausência de Spir-1 acarreta num menor comprimento das caudas de actina, nos dois modelos testados (Figura 26B e C).

Em conjunto, esses dados sugerem que JNK regularia a formação das caudas de actina via Spir-1, uma vez que a ausência tanto de JNK, quanto de Spir-1, levam a uma redução tanto do número, quanto do tamanho das caudas de actina.

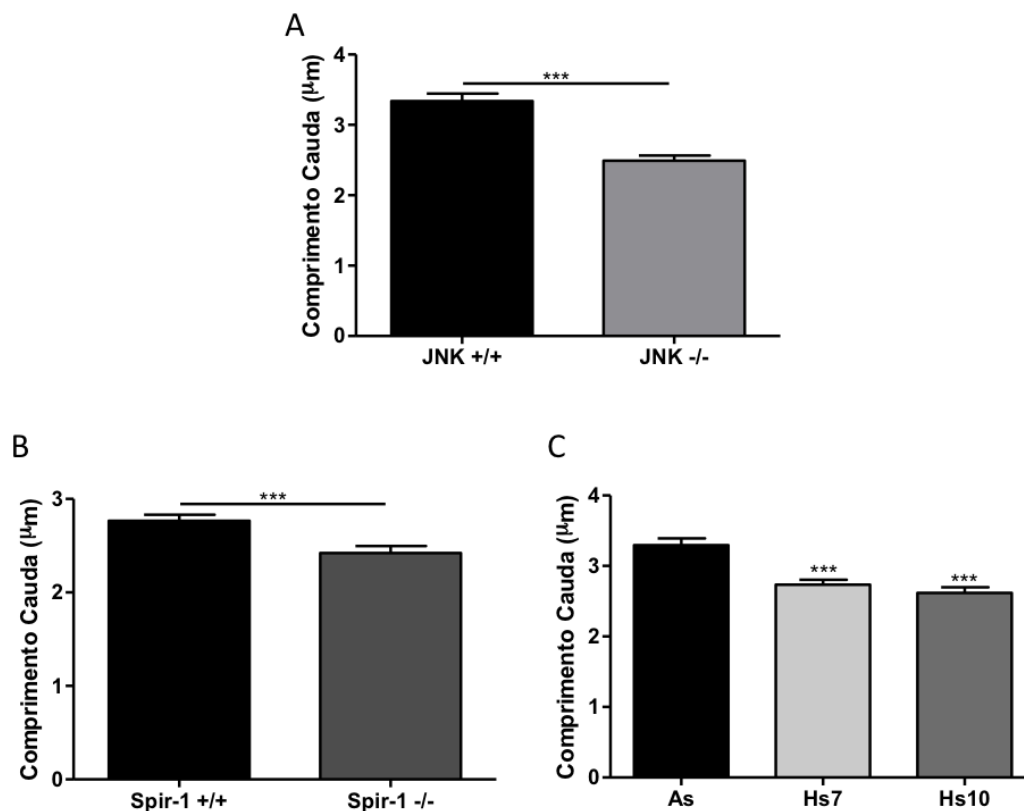


Figura 26. O comprimento das caudas de actina é afetado na ausência de JNK e Spir-1.

(A) Células MEFs JNK +/+ ou -/-, (B) Spir-1 +/+ ou -/- ou (C) HeLa transfectadas com siRNA para Spir-1 foram crescidas em lamínulas de 13mm e infectadas com o VACV-A5-GFP (B) ou VACV-F13-GFP (A e C), por 12 (A e C) ou 16 (B) horas (MOI = 5). Em seguida, as células foram fixadas e permeabilizadas para marcação com faloidina conjugada a rodamina (F-actina, 1:50) por 20 minutos, seguida de marcação com DAPI (DNA) por 10 minutos. As imagens foram capturadas em microscópio confocal ZEISS ou microscópio de imunofluorescência NIKON, em aumento de 600x. Os gráficos representam o comprimento médio das caudas de actina em cada célula (n=100).

VI. DISCUSSÃO

Ao longo da coevolução com seus hospedeiros, os vírus adquiriram refinados mecanismos de manipulação do ambiente intracelular. Assim, o sucesso da multiplicação e disseminação viral dependem tanto da subversão das vias sinalizadoras celulares, a favor desses microrganismos, como da evasão das respostas antivirais do hospedeiro.

Em relação à modulação de vias celulares pelos vírus, destacamos a via das Proteínas Cinases Ativadas por Mitógenos (MAPKs). Estudos realizados pelo Grupo de Transdução do Sinal do Laboratório de Vírus demonstraram que o *Vaccinia virus*, vírus alvo de estudo deste trabalho, é capaz de estimular a via das MAPKs, favorecendo o sucesso de sua multiplicação (DE MAGALHÃES et al., 2001; ANDRADE et al., 2004; SILVA et al., 2006; PEREIRA et al., 2012; ALBARNAZ, 2014). Entretanto, pouco ainda se sabe sobre os mecanismos pelos quais o VACV é capaz de ativar essas MAPKs (Figura 9). Até o momento, já foi demonstrado que o fator de crescimento do *Vaccinia virus* (VGF), e a proteína O1, participam da ativação da via MEK/ERK (BULLER et al., 1988; ANDRADE et al., 2004; McFADDEN, 2005; SCHWENEKER et al., 2012). Também já foi evidenciado que a proteína B1 do VACV poderia modular a ativação de JNK e do fator transcricional c-Jun (SANTOS et al., 2006). Já em relação a MAPK p38, foi relatado que a proteína A52 do VACV poderia participar de sua ativação, simultaneamente ao seu papel como inibidor da via de NF- κ B (MALONEY et al., 2006, STACK et al., 2013).

Sendo assim, o primeiro objetivo deste trabalho foi buscar outras proteínas do VACV que poderiam estar modulando a via das MAPKs. Decidimos focar a nossa busca em proteínas imunomodulatórias já caracterizadas do VACV, uma vez que o mesmo dispõe de diversos mecanismos para inibir a resposta imune antiviral da célula, como por exemplo, a inibição da via de NF- κ B (SMITH et al., 2013). Sabe-se que a via das MAPKs e de NF- κ B compartilham proteínas ativadoras em comum, como a cinase TAK1 (Cinase ativada pelo fator de crescimento transformante - β) (NINOMIYA-TSUJI et al., 1999; WANG et al., 2001). Até o momento, já foram descritos dez inibidores intracelulares da via de ativação de NF- κ B, que atuam através de mecanismos distintos (SMITH et al., 2013). Dessa maneira, decidimos avaliar a participação de algumas dessas proteínas na modulação das MAPKs. Para

isso, escolhemos as seis proteínas inibidoras de NF- κ B do VACV que pertencem à família de proteínas do tipo Bcl-2: A46, A49, A52, B14, K7 e N1.

Além de adicionar informações sobre como é feita a modulação das MAPKs pelo VACV, nosso grupo também continua interessado no estudo de qual seria o papel biológico da ativação dessas cinases durante a infecção viral. Como demonstrado anteriormente, sabe-se que a ERK e p38 são importantes para a multiplicação do VACV, enquanto JNK não (DE MAGALHÃES et al., 2001; ANDRADE et al.; 2004, PEREIRA et al.; 2012 ALBARNAZ, 2014). Entretanto, JNK está envolvida na disseminação viral, uma vez que dados não publicados do nosso grupo demonstraram que, na ausência de JNK, existe uma redução no número de caudas de actina induzidas pelo VACV (BRASIL, 2010; LEITE, 2010). Porém, o mecanismo pelo qual JNK estaria regulando a nucleação de actina, induzida pelo VACV, ainda não foi bem estabelecido. Resultados preliminares do nosso grupo mostraram que o nucleador de actina Spir-1 poderia estar envolvido na disseminação do VACV (LEITE, 2010; BRASIL, 2010). Uma vez que Spir-1 já foi descrito como substrato de JNK, o segundo objetivo deste trabalho foi aprofundar a análise do envolvimento de Spir-1 na disseminação do VACV, com o intuito de corroborar ou refutar os dados anteriores.

Seguindo o modelo utilizado nessa tese, a discussão será dividida em duas partes, segundo os dois grandes objetivos propostos no trabalho.

1. Caracterização da modulação das MAPKs pelo VACV

De maneira a avaliar a participação das proteínas do VACV na regulação da via das MAPKs, foi padronizado um ensaio de gene repórter para o fator transcricional AP-1 (Figura 12). AP-1 é um dímero formado principalmente por proteínas pertencentes às famílias Jun, Fos e ATF (KARIN et al., 1997; SHAULIAN, 2010; MENG & XIA, 2011), sendo um dos principais substratos da via das MAPKs (SHAULIAN & KARIN, 2001; 2002). Já foi demonstrado que o VACV é capaz de induzir a ativação de AP-1, em tempos precoces pós-infecção, mas esse resultado foi obtido através da técnica de EMSA (ensaio de alteração da mobilidade eletroforética), e não de gene repórter (DE MAGALHÃES et al., 2001). Assim, utilizando células HeLa e HEK, foram padronizados as quantidade do plasmídeo

AP-1-Luc a ser utilizada em cada célula, bem como qual seria o melhor estímulo para AP-1, e a concentração a ser usada. Nossos resultados demonstraram que o PMA foi o único tratamento capaz de induzir AP-1 (Figura 12), e escolhemos a quantidade de 10 ng/mL, por ter sido menos citotóxica para as células, após observação em microscópio. Já em relação ao plasmídeo AP-1-Luc, determinamos a quantidade de 150 ng por poço (placa de 96 poços) para as células HeLa e 250 ng por poço para as células HEK, de maneira a chegar num bom nível de indução de AP-1, de maneira reprodutível entre os experimentos.

Padronizado o ensaio de gene repórter, nosso próximo passo foi avaliar a participação das proteínas A46, A49, A52, B14, K7 e N1 na regulação de AP-1. Os ensaios foram realizados tanto durante a transfecção com os plasmídeos expressando essas proteínas (Figura 13), e ainda mais relevante, nas células infectadas com mutantes do VACV deletados para os genes referentes a essas proteínas (Figura 14). Em conjunto, esses resultados sugerem que as proteínas virais A52, B14 e K7 podem, além do papel inibitório sobre a via de NF- κ B, contribuir para a ativação de AP-1, tanto durante a expressão das proteínas isoladamente, quanto na infecção. É importante enfatizar que estudos de regulação de vias sinalizadores celulares do hospedeiro pelo VACV são normalmente dificultados pelo fato do vírus codificar diferentes proteínas que possuem as mesmas funções, como é o caso das diferentes proteínas envolvidas na inibição de NF- κ B. Nesse contexto, a ausência de uma dessas proteínas inibitórias não afeta a capacidade do vírus de inibir esta via. Dessa maneira, destaca-se o fato de a ausência de uma proteína do VACV individualmente ter sido capaz de alterar a regulação de AP-1 durante a infecção (Figura 14A), mesmo na presença das outras possíveis proteínas virais com o mesmo papel. Esse dado sugere que talvez essas proteínas não tenham mecanismos de ação redundantes, e que a presença de todas as proteínas ao mesmo tempo seria necessária para a ativação de AP-1 da maneira mais eficiente possível. A especificidade da ativação de AP-1 por A52, B14 e K7 foi confirmado através de um ensaio de dose-resposta, o qual demonstrou que quanto maior a quantidade de plasmídeo expressando essas proteínas, maior a ativação de AP-1 (Figura 15).

Dentre essas proteínas, já havia sido demonstrado anteriormente que A52 participa da ativação da MAPK p38, em um mecanismo independente da inibição de NF- κ B (MALONEY et al., 2006, STACK et al., 2013). Entretanto, mais experimentos são necessários para comprovar que A52 ativa AP-1 através da MAPK p38, bem como quais fatores transcricionais estariam envolvidos nessa ativação.

Vale notar que, da mesma maneira que descrito para A52, uma mesma proteína viral, tal qual B14 e K7, pode ter papéis distintos, agindo tanto na inibição de NF- κ B, quanto na ativação de AP-1, o que sugere um complexo balanço da regulação viral de vias sinalizadoras celulares relacionadas. Além disso, também já havia sido demonstrado que B14 ativaria AP-1 na presença de PMA, porém esse resultado não havia sido investigado (CHEN et al., 2008).

Em relação às outras proteínas testadas, observou-se que tanto A46 quanto N1, não apresentaram diferenças em relação a ativação de AP-1, nem durante a transfecção, nem durante a infecção (Figura 13 e 14). Diferentemente, a proteína A49 parece ter um papel como inibidor de AP-1, uma vez que na presença desta proteína, os níveis de ativação de AP-1 apareceram reduzidos em comparação ao controle (Figura 13). Da maneira similar, a ausência desta proteína durante a infecção culminou com uma maior ativação desse fator transcricional, em comparação com o vírus selvagem (Figura 14). Observa-se, então, que o VACV codifica tanto proteínas com a capacidade de ativar AP-1, como A52, B14 e K7, como proteínas capazes de inibir esse fator transcricional, como A49. Isso sugere que o vírus requer uma regulação entre a ativação e a inibição deste fator transcricional, em prol do seu sucesso replicativo.

Dentre as proteínas virais que ativaram AP-1, B14 foi a responsável pelos maiores níveis de ativação desse fator transcricional. Além disso, mesmo na ausência de PMA, foi possível observar uma indução estatisticamente significativa de AP-1, na presença de B14 (Figura 13). Entretanto, o resultado obtido no ensaio utilizando os vírus mutantes não mostrou um efeito maior do VACV-delB14 em comparação ao VACV-delA52 ou VACV-delK7 (Figura 14A). Esse resultado pode ser explicado se observamos que existe um ligeiro aumento da proteína viral C16 nas células infectadas pelo vírus deletado para o gene B14R (Figura 14B), o que significa que essas células foram infectadas com uma maior quantidade de vírus, em comparação às outras células. Como foi mostrado anteriormente, a ativação de

AP-1 durante a infecção pelo VACV é dependente da MOI (Figura 16), isso explicaria o fato dos níveis de ativação durante a infecção pelo VACV-delB14 em relação ao VACV-delA52 e ao VACV-delK7, considerando que a quantidade de inóculo viral de VACV-delB14 foi ligeiramente maior que os demais vírus no experimento representado na Figura 14B. Além disso, outros experimentos demonstraram um maior impacto da deleção de B14R na ativação de AP-1 durante a infecção e, dessa maneira, acreditamos que essa proteína seja, dentre as testadas, a mais importante para ativação das MAPKs e de AP-1. Assim, optamos por continuar nossos estudos focando na ativação de MAPK/AP-1 por B14.

Dessa maneira, nosso próximo passo foi avaliar a ativação de AP-1 pelo vírus VACV-WR e pelo VACV-delB14, em diferentes tempos pós-infecção, e utilizando diferentes MOIs. Nossos resultados demonstraram que, na ausência de B14, o VACV não é capaz de ativar AP-1 em níveis semelhantes ao vírus selvagem, independente da MOI utilizada, ou do tempo de infecção (Figura 16A). Esses resultados confirmam que ausência de somente uma proteína do VACV é capaz de alterar a regulação de AP-1.

Em seguida, o próximo objetivo do trabalho foi determinar qual MAPK, especificamente, a proteína B14 estaria ativando. Primeiramente, fizemos o ensaio de gene repórter para AP-1 induzido por B14, na presença de inibidores específicos das vias das MAPKs: U0126 (inibidor de MEK1/2), SB203580 (inibidor de p38 MAPK) e JNK inh.VIII (inibidor de JNK1/2). Assim, se algum inibidor fosse capaz de reduzir a ativação de AP-1 por B14, isso seria um indicativo de essa proteína viral estaria regulando essa determinada via para ativar AP-1. Nossos resultados demonstraram que na presença dos três inibidores, houve uma redução estatisticamente significativa na ativação de AP-1 por B14, sendo o inibidor de MEK/ERK o com maior inibição, seguido pelo inibidor de JNK, e por último, o inibidor de p38 (Figura 17). Esses resultados sugerem que a proteína viral B14 é capaz de ativar o fator transcricional AP-1 através das três vias principais das MAPKs, mas principalmente, ela regula as MAPKs ERK e JNK.

Para confirmar esses resultados, resolvemos avaliar a fosforilação dessas MAPKs, bem como dos fatores transcricionais c-Jun, ATF-2 e c-Fos, que participam da formação do dímero de AP-1, na presença de B14. Dessa maneira, transfectamos células HeLa com duas quantidades de plasmídeo expressando B14,

e utilizamos como controle um plasmídeo expressando GFP, bem como o plasmídeo vazio (EV), ou deixamos as células não transfectadas. Podemos notar que, a transfecção em si é capaz de ativar todas as MAPKs e os fatores transcricionais analisados, com exceção de c-Fos, quando comparamos as células não transfectadas (NT) com as células transfectadas com qualquer um dos plasmídeos utilizados (Figura 18). Entretanto, na presença de B14, ocorre um aumento na fosforilação de todas as MAPKs. Podemos notar que esse aumento foi maior para ERK e JNK (Figura 18), corroborando os resultados com os inibidores. Já em relação aos fatores transcricionais, podemos observar que B14 leva a um aumento na fosforilação de c-Jun e ATF-2, mas não foi possível detectar c-Fos, indicando que B14 por si só, nem a transfecção em si, são capazes de induzir a expressão desse fator transcricional (Figura 18).

De maneira a corroborar o papel de B14 na ativação dessas MAPKs, nosso próximo passo foi analisar a ativação dessas proteínas durante a infecção pelo VACV-WR, em comparação com o VACV-delB14. Como já descrito pelo nosso grupo, foi possível observar a ativação de ERK durante todos os tempos de infecção analisados, e uma ativação de JNK e p38 nos tempos tardios pós-infecção (Figura 20) (ANDRADE et al., 2004; SILVA et al., 2006; PEREIRA et al., 2012; ALBARNAZ, 2012). Diferentemente das células transfectadas, na ausência de B14, só foi possível observar uma redução da fosforilação da MAPK JNK, já que não houve nenhum efeito na ativação de ERK nem de p38 (Figura 20). Esse resultado pode ser explicado pela presença de outras proteínas virais que sabidamente contribuem para ativação tanto de ERK quanto de p38, durante a infecção pelo VACV (ANDRADE et al., 2004; McFADDEN, 2005; SCHWENEKER et al., 2012; MALONEY et al., 2006, STACK et al., 2013). Dessa maneira, B14 contribuiria para ativação de ERK e p38 durante a infecção, mas de maneira não essencial, uma vez que o VACV possui outras proteínas capazes de modular essas vias. Já em relação a JNK, B14 parece ter um papel mais relevante, mesmo que também não essencial, uma vez que há uma redução da ativação dessa MAPK, mas não uma abolição, na ausência de B14 durante a infecção.

Também foi observada a ativação de todos os fatores transcricionais durante a infecção pelos dois vírus. Entretanto, B14 parece estar contribuindo para a

ativação de c-Jun e ATF-2 (Figura 19), assim como o observado durante a expressão de B14 isoladamente. Já em relação a Fos, não foi possível observar diferença entre o vírus selvagem e o vírus deletado para o gene B14R (Figura 19). Esse resultado vai de acordo com o observado para ERK, considerando que c-Fos é sabidamente um substrato dessa MAPK durante a infecção pelo VACV (DE MAGALHÃES et al., 2001; OLIVEIRA, 2013). Da mesma maneira que ERK, é possível que B14 possa contribuir para a ativação de c-Fos, porém de maneira não essencial, já que não foi possível observar essa regulação durante a infecção. Entretanto, esse dado deve ser confirmado por outras metodologias.

Em conjunto, nossos dados revelam que, durante a infecção, B14 estaria contribuindo consideravelmente para ativação de JNK e dos fatores transcricionais c-Jun e ATF-2, que são substratos dessa MAPK (BARR & BOGOYEVITCH, 2001). Dados prévios não publicados do nosso grupo, já mostraram que a ativação de c-Jun pelo VACV é dependente de JNK em tempos tardios pós-infecção, o que estaria de acordo com a regulação de B14 observada (PEREIRA, 2007). Entretanto, ainda não foi investigado o papel de JNK na ativação de ATF-2 nesse contexto. Sabe-se que ATF-2 pode ser ativado tanto por JNK, quanto pela MAPK p38 (CUADRADO e NEBREDÁ, 2010). Dessa maneira, fazem-se necessários mais estudos para confirmar que ATF-2 seria ativado preferencialmente via JNK durante a infecção pelo VACV.

Já foi demonstrado que outros vírus são capazes de ativar AP-1 durante a infecção, entre eles o vírus Epstein–Barr virus (EBV), o varicella-zoster virus (VZV) e o influenza virus. Entretanto, ativação de AP-1 por esses vírus se faz através de MAPKs diferentes. No caso do vírus influenza, já foi demonstrado que a ativação de JNK é necessária para a indução de AP-1 (LUDWIG et al., 2001). Diferentemente, em relação ao VZV, observou-se que a proteína viral ORF 12 ativa AP-1 através da modulação de ERK (LIU et al., 2012). Já em relação ao EBV, já foram descritas diversas proteínas codificadas por este vírus capazes de ativar diferentes MAPK e, conseqüentemente, AP-1, assim como o observado pelo VACV. Por exemplo, já foi demonstrado que a proteína BRLF1 desse vírus ativa AP-1 através do aumento dos níveis de ativação de p38, JNK e ERK (ADAMSON et al., 2000). Já a proteína BZLF1 o faz através da ativação de p38 e JNK (ADAMSON et al., 2000; LEE et al., 2008).

Recentemente, foi demonstrada a participação a proteína BGLF2 do EBV na ativação de AP-1 através da ativação de p38(LIU e COHEN, 2016).Assim, de maneira semelhante ao VACV, outros vírus são capazes de ativar AP-1 durante a infecção e, para tal, codificam diversas proteínas capazes de modular diferentes MAPKs.

O mecanismo pelo qual B14 estaria ativando a via das MAPKs/AP-1 ainda preciso ser elucidado. O primeiro passo seria verificar se B14 regularia essa via pelo mesmo mecanismo utilizado para inibir a via de NF- κ B. Dados preliminares obtidos durante meu doutorado-sanduiche indicam que o papel regulador de B14 em relação a AP-1 é independente de sua função como inibidor da via de NF- κ B, uma vez que o mutante F130K, que perdeu a capacidade de inibir essa via (BENFIELD et al., 2011) ainda parece ser capaz de ativar AP-1 em níveis semelhantes à proteína selvagem (TORRES, dados não publicados). Dados não publicados do grupo do Prof. Geoffrey Smith (Universidade de Cambridge – Reino Unido) mostraram que, em modelo murino de infecção, a ausência de B14 reduz a virulência do VACV, entretanto, o vírus expressando o mutante F130K, ainda é virulento, semelhante ao vírus selvagem (REN, dados não publicados). Esse dado indica que a contribuição de B14 para a virulência do VACV seria independente da sua ligação a IKK β , sugerindo um possível outro papel para esta proteína ainda não descoberto, e que poderia estar relacionando ao seu papel ativador de AP-1.

Em linha com essa hipótese, outros resultados preliminares obtidos durante meu doutorado-sanduiche sugeriram que B14 poderia, além de se ligar a IKK β , interagir com a proteína HOIP-1, que é a unidade catalítica do complexo LUBAC (TORRES, dados não publicados). Essa interação, então, afetaria a ativação de NF- κ B, uma vez que inibiria a ubiquitinação linear de NEMO por LUBAC. Foi possível observar também que a expressão de B14 interfere com a ubiquitinação linear de NEMO (TORRES, dados não mostrados). Interessantemente, o mutante F130K parece manter essa função tal qual a proteína selvagem. Dados da literatura demonstram que, para uma eficiente ativação de NF- κ B, NEMO (proteína que forma um complexo com as proteínas IKK α e IKK β) precisa ser tanto poliubiquitinado por cadeias de Lis63-Ub, quanto pela por cadeias lineares de Met1-Ub, e que a ligação de Met1-Ub a NEMO possui 100 vezes mais afinidade que sua ligação a Lis63-Ub (RAHIGHI et al., 2009). De qualquer maneira, mais experimentos são necessários

para detalhar o mecanismo pelo qual B14 inibiria a atividade do complexo LUBAC. Entretanto, esses dados preliminares sugerem que talvez, esse seja o principal papel de B14 na contribuição para a virulência do VACV, já que o mutante F130K parece manter este papel. Vale ressaltar que, até o momento, só foi descrita uma proteína viral, a NS3 do vírus da Hepatite C (HCV), como inibidor do complexo LUBAC (CHEN et al., 2015), indicando o possível papel relevante que o complexo LUBAC desempenha na resposta imune às infecções virais. Se esses resultados forem confirmados, pode-se hipotetizar que a contribuição de B14 para a ativação da MAPK JNK, e dos fatores transcricionais c-Jun e ATF-2, pode estar relacionada ao seu possível papel na inibição da atividade do complexo LUBAC. Isso porque já foi demonstrado que ausência da ubiquitinação linear de NEMO, e consequente comprometimento da ativação de NF- κ B, pode favorecer o aumento da ativação das MAPKs JNK e p38 (EMMERICH et al., 2013). De qualquer maneira, mais experimentos seriam necessários para comprovar essa hipótese, como por exemplo, determinar quais domínios ou resíduos de aminoácidos de B14 seriam essenciais para sua função como inibidor de LUBAC, e se esses mutantes continuariam ou não ativando AP-1.

Durante a infecção pelo VACV, as vias das MAPKs ERK, p38 e JNK são ativadas mas a natureza dos sinais que levam à ativação dessas vias, sejam eles celulares ou virais, não é completamente conhecida. Até o momento, sabe-se que VGF é secretada durante a infecção, se liga ao receptor de EGF (EGFR) e dispara a ativação da via MEK/ERK, que é importante para a multiplicação viral e a inibição da apoptose (BULLER et al., 1988; ANDRADE et al., 2004; POSTIGO et al., 2009;). Em conjunto com VGF, foi demonstrado que outra proteína viral, O1, também é importante para a sustentação da ativação da via MEK/ERK durante a infecção (SCHWENEKER et al., 2012). Também já foi descrito que A52 que estimula a ativação da expressão gênica dependente de p38 quando expressa isoladamente, mas seu papel para ativação dessa MAPK no contexto da infecção não é conhecido (MALONEY et al., 2006, STACK et al., 2013). Quanto à JNK, sabe-se que o sinal que dispara a ativação dessa MAPK durante a infecção pelo VACV independe da replicação do DNA viral (PEREIRA et al., 2012). Quando expressa isoladamente, a proteína cinase viral B1 promove a fosforilação de JNK e do seu substrato c-Jun

(SANTOS et al., 2006), mas a implicação de B1 na ativação da via JNK/c-Jun no contexto da infecção não foi verificado.

Nesse contexto, a proteína viral B14 se junta às outras proteínas acima citadas, uma vez que parece contribuir para ativação das MAPKs durante a infecção pelo VACV, mais especificamente de JNK e de seus substratos c-Jun e ATF-2. Apesar de não ter sido observado efeito da deleção de B14R na fosforilação de ERK e p38 MAPK durante a infecção de células HeLa, não se pode descartar completamente que B14 tenha um papel na ativação dessas MAPKs pois, quando expressa isoladamente, B14 induziu a fosforilação das mesmas. Além disso, os resultados aqui apresentados em relação aos efeitos de B14 sobre a via de JNK são mais contundentes, porque foram observados no contexto da infecção viral, diferentemente de B1, cujo efeito sobre a fosforilação de JNK e c-Jun foi testado apenas através de transfecção. Assim, em conjunto, nossos resultados acrescentam novos componentes virais envolvidos na modulação da vias das MAPKs ERK, JNK e p38 durante a infecção pelo VACV.

2. Avaliação do papel da MAPK JNK e do nucleador de actina Spir-1 na formação de caudas de actina induzida pelo VACV

Para avaliar se JNK estaria regulando a disseminação do VACV através do seu substrato Spir-1, o primeiro experimento realizado foi para confirmar que as duas proteínas interagem durante a infecção. Assim, células HEK foram co-transfectadas com plasmídeos expressando as proteínas JNK e Spir-1, através de superexpressão. Em paralelo, células foram transfectadas com plasmídeos expressando as proteínas JNK e GFP, como controle. Em seguida, foi realizado o ensaio de co-imunoprecipitação, o qual confirmou que, durante a infecção, a proteína Spir-1 interage com JNK, mas não com GFP (Figura 21), durante a infecção pelo VACV.

Foram realizadas diversas tentativas em prol de se demonstrar a interação das formas endógenas dessas proteínas, bem como a co-imunoprecipitação reversa, mas todas sem sucesso. Outros experimentos foram realizados a fim de se comprovar a interação entre JNK e Spir-1 durante a infecção. Foram feitas algumas tentativas de se realizar a imunoprecipitação de Spir-1, e verificar a sua fosforilação

durante a infecção, em resíduos de serina e treonina, uma vez que JNK é um serina-treonina cinase. Esse experimento foi realizado na presença e ou na ausência de um inibidor farmacológico específico de JNK. Assim, esperava-se que, durante a infecção, Spir-1 teria resíduos fosforilados de serina e/ou treonina, e que essa fosforilação seria reduzida na presença do inibidor. Entretanto, esse experimento ainda precisa ser melhor padronizado de maneira e apresentar um resultado mais confiável. Vale lembrar que, até o momento, existe apenas um trabalho relatando que Spir-1 é um substrato de JNK, e esses experimentos também foram feitos com proteínas superexpressas (OTTO et al., 2000). Devido à dificuldade na realização dos ensaios de imunoprecipitação com JNK e Spir-1, acreditamos que a interação entre essas duas proteínas deve ocorrer de forma dinâmica e transiente, o que dificulta a detecção da associação entre as mesmas.

Considerando que Spir-1 é substrato de JNK, nosso próximo passo foi avaliar a participação de Spir-1 na multiplicação e disseminação do VACV. Para isso, foram usados fibroblastos embrionários murinos (MEFs) selvagens (+/+) e deficientes para Spir-1 (-/-), bem como células HeLa transientemente silenciadas para Spir-1 (siSpir-1). Nesses dois modelos celulares, foi possível observar que Spir-1 não é essencial para a multiplicação do VACV (Figura 22 e Figura 25B), tal qual foi visto para JNK (PEREIRA et al., 2012).

Para analisar se Spir-1 teria papel na disseminação do VACV, foram realizados ensaios de multiplicação viral numa MOI baixa, de modo a permitir ciclos múltiplos de multiplicação viral. Esses resultados também não mostraram diferença do título viral obtido na presença ou ausência de Spir-1 (Figura 22A, segundo gráfico, e Figura 25B). Para confirmar se Spir-1 não estaria mesmo envolvido na disseminação do VACV, foi então realizado um ensaio de fenótipo de placa, nos MEFs. Esse resultado demonstrou que, nos MEFs Spir -/-, o VACV apresenta uma placa de lise menor quando comparado às células selvagens (Figura 23), indicando um possível papel de Spir-1 na disseminação viral.

Um fator determinante para o tamanho da placa de lise viral é a formação de caudas de actina induzidas pelo VACV (SMITH et al., 2002). Essas caudas são protruções digitiformes que fazem com que o vírus seja propelido para fora da célula infectada, facilitando a infecção de uma célula vizinha e a disseminação viral. Até o

momento, já foi descrito que dois nucleadores de actina, o complexo ARP2/3 e a formina FHOD1, são importantes para a formação dessas caudas (LEITE & WAY, 2015). Entretanto, até o momento não foi descrito se Spir-1, membro do outro grupo de nucleadores de actina conhecido, participaria deste processo.

Assim, nosso próximo passo foi determinar se Spir-1 estaria participando da formação das caudas de actina induzida pelo VACV. Dessa maneira, células Spir +/+ e -/-, bem como as células HeLa transfectadas com siSpir e o siRNA controle, foram infectadas pelo VACV-A5-GFP e VACV-F13-GFP, respectivamente. Após fixação, as células foram marcadas para actina (vermelho) e DNA (azul), e os vírus foram visualizados pelo GFP (verde). Foram capturadas imagens de células individualizadas, através de microscópio de imunofluorescência, e as caudas de actina foram então contadas. Podemos observar que na ausência de Spir-1, tanto nos MEFs, quanto nas células HeLa, há um menor número de caudas induzidas pela infecção viral (Figura 24 e 26). Esses resultados foram confirmados por duas repetições distintas nos MEFs. Infelizmente, devido a problemas com o silenciamento das células HeLa, esse ensaio só foi realizado uma vez neste modelo. Entretanto, esses resultados corroboram os dados preliminares do grupo obtidos com células A31 expressando estavelmente uma forma dominante-negativa de Spir-1, que contém apenas a região C-terminal da proteína (Spir-CT) sem a região WH2, envolvida na nucleação dos monômeros de actina, e que apresentaram um defeito na formação das caudas de actina induzidas pelo VACV, em relação às células parentais (BRASIL, 2010; LEITE, 2010).

Dados anteriores do nosso grupo sugeriam que a ausência da MAPK JNK1/2 afetava, não só o número de caudas de actina, mas também o comprimento das mesmas. Para confirmar esse resultado, foi realizada a medição das caudas de actina na ausência tanto de JNK, quanto de Spir-1, nas imagens capturadas nos experimentos de imunofluorescência. Nossos resultados mostraram que ambas as proteínas contribuem para o comprimento das caudas (Figura 27), durante a infecção pelo VACV.

Em conjunto, esses dados sugerem que JNK poderia estar regulando a formação das caudas de actina via Spir-1, uma vez que a ausência tanto de JNK, quanto de Spir-1, levam a uma redução tanto do número, quanto do tamanho das

caudas de actina. Entretanto, a participação de Spir-1 não seria essencial, uma vez que o vírus ainda é capaz de se disseminar nas células deficientes para essa proteína (Figura22A, segundo gráfico).

Assim, uma primeira hipótese poderia ser que JNK tenha outros substratos que também possam estar regulando a formação das caudas de actina, uma vez que o efeito observado na sua ausência parece ser mais drástico que o efeito observado na ausência de Spir-1. Um desses substratos poderia ser o fator transcricional c-Jun. Dados não publicados do nosso grupo mostram o envolvimento desta proteína da disseminação do VACV, entretanto sem mecanismo elucidado (LEITE, 2010). É importante ressaltar que o VACV-delB14 apresenta um fenótipo de placa levemente reduzido em células BSC-1 (CHEN et al., 2006). Dessa maneira, poderíamos levantar a hipótese de que o efeito de B14 na disseminação viral poderia ser devido à via de JNK e Spir-1, uma vez que nossos dados também demonstram um papel de B14 na ativação dessa MAPK, durante a infecção pelo VACV.

Uma segunda hipótese poderia ser que a outra proteína nucleadora de actina do grupo Spir, a Spir-2, poderia exercer um papel redundante ao de Spir-1. Dessa maneira, na ausência de Spir-1, Spir-2 poderia substituir a função da mesma, e vice versa. Já foi demonstrado que Spir-2 também é substrato de JNK (LAKSHMI, 2011). Além disso, em modelo de infecção pela bactéria *Listeria*, foi observado que Spir-2 estaria envolvida na nucleação de actina, sendo importante para invasão dessa bactéria (KÜHBACHER et al., 2015). Interessantemente, nesse modelo, Spir-1 não contribui para a nucleação de actina. Assim, outros estudos deverão ser realizados a fim de se investigar se Spir-2 poderia ter também um papel complementar, talvez, ao de Spir-1 na formação de caudas de actina induzidas pelo VACV.

Em resumo, PEREIRA e colaboradores, em 2012, demonstraram que a MAPK JNK está envolvida na reorganização do citoesqueleto durante a infecção pelo VACV. Assim, é esperado que essa MAPK tenha também papel na regulação das caudas de actina durante a infecção viral. Sendo Spir um substrato de JNK e um nucleador de actina, é razoável aceitar a hipótese de que esta proteína contribui para a formação das caudas de actina induzidas pelo VACV. Já foi demonstrado que Spir-1 pode interagir com as forminas, contribuindo para uma eficiente

nucleação de actina (QUINLAN et al., 2007; PFENDER et al., 2011; DAHLGAARD et al., 2007; QUINLAN et al., 2013; MONTAVILLE et al., 2014; TITTEL et al., 2015). Assim, pode-se hipotetizar que, durante a infecção, o VACV ativa JNK, o que leva ao recrutamento dos nucleadores de actina Spir-1 e Spir-2. Essas proteínas e as forminas poderiam interagir, disparando a polimerização de filamentos lineares de actina não ramificadas, que podem ser usadas como filamentos-mãe para o complexo ARP2/3 promover a polimerização dos filamentos ramificados, assim como foi visto para a formina FHOD1 (ALVAREZ e AGAISSE, 2013). Sugere-se então que o papel de Spir-1 seria na robustez da cauda de actina formada, contribuindo para uma maior eficiência na formação, bem como no tamanho das mesmas. Entretanto, mais estudos devem ser realizados a fim de se confirmar esse possível mecanismo. Caso confirmado, nossos resultados vão contribuir para um melhor conhecimento acerca das funções exercidas por essa proteína, ainda pouco conhecidas.

VII. CONCLUSÕES

1. Caracterização da modulação das MAPKs pelo VACV

- As proteínas A52, B14 e K7 do VACV contribuem para ativação de AP-1;
- A ativação de AP-1 por B14 é dependente da via de ERK e JNK, principalmente;
- B14 contribui para ativação da MAPK JNK e dos fatores transcricionais c-Jun e ATF-2 durante a infecção pelo VACV;

2. Avaliação do papel da MAPK JNK e do nucleador de actina Spir-1 na formação de caudas de actina induzidas pelo VACV

- A MAPK JNK2 interage com Spir-1 durante a infecção;
- A ausência de Spir-1 não afeta a multiplicação do VACV;
- Spir-1 tem papel na formação das caudas de actina induzidas pelo VACV;
- JNK e Spir-1 são importantes para o tamanho das caudas de actina induzidas pelo VACV.

PERSPECTIVAS

1. Caracterização da modulação das MAPKs pelo VACV

- Aprofundar a caracterização do papel das proteínas virais A52 e K7 na ativação de AP-1 através da avaliação do papel dessas proteínas virais na regulação das MAPKs ERK, JNK e p38, e dos fatores transcricionais c-Jun, ATF-2 e c-Fos.

2. Avaliação do papel da MAPK JNK e do nucleador de actina Spir-1 na formação de caudas de actina induzidas pelo VACV

- Investigar se Spir-1 é fosforilada pela MAPK JNK durante a infecção pelo VACV.
- Confirmar o papel de Spir-1 na formação das caudas de actina induzidas pelo VACV em células HeLa, através de siRNA.
- Avaliar a localização subcelular de Spir-1 durante a infecção pelo VACV, bem como o efeito da inibição da MAPK JNK nessa localização.
- Analisar o efeito da reversão da expressão de Spir-1 nos fenótipos observados na ausência de Spir-1, destacando a sua possível contribuição para a formação das caudas de actina induzidas pelo VACV.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abrahão, J. S., M. I. Guedes, et al. One more piece in the VACV ecological puzzle: could peridomestic rodents be the link between wildlife and bovine vaccinia outbreaks in Brazil? *PLoS One*, 2009, v.4, n.10, p.e7428.

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. Vaccinia virus infection in monkeys, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis.* 2010, v.16(6), p. 976-9.

Abrahão, J. S., Campos, R.K., Trindade, G. de S., Guimarães da Fonseca, F., Ferreira, P. C., Kroon, E. G. Outbreak of severe zoonotic vaccinia virus infection, Southeastern Brazil. *Emerg Infect Dis.*, 2015, v.21(4), p.695-8.

Adamson AL, Darr D, Holley-Guthrie E, Johnson RA, Mauser A, Swenson J, Kenney S. Epstein-Barr virus immediate-early proteins BZLF1 and BRLF1 activate the ATF2 transcription factor by increasing the levels of phosphorylated p38 and c-Jun N-terminal kinases. *J Virol.* 2000, v.74, p.1224–1233.

Adhikari, A., Xu, M., Chen, Z. J. Ubiquitin-mediated activation of TAK1 and IKK. *Oncogene.* 2007, v.26(22), p.3214-26.

Albarnaz, J. D. Envolvimento de p38 MAPK no ciclo de vida do Vaccinia virus. (Tese de Doutorado). Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

Alvarez, D.E., Agaisse, H. The formin FHOD1 and the small GTPase Rac1 promote vaccinia virus actin-based motility. *J Cell Biol.* 2013, v. 202(7), p.1075-90.

Andrade, A. A., P. N. Silva, et al. The vaccinia virus-stimulated mitogen activated protein kinase (MAPK) pathway is required for virus multiplication. *Biochem J*, v.381, p.437-46. 2004.

Andrade, L.G., Albarnaz, J. D., et al. Vaccinia Virus Dissemination Requires Pak1/P41-Arc Pathway Activation To Promote Actin-Based Motility. 2016, manuscrito em preparação

Angel, P., Imagawa, M., Chiu, R., Stein, B., Imbra, R. J., Rahmsdorf, H. J., Jonat, C., Herrlich, P., Karin, M. Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell*. 1987, v.49(6), p.729-39.

Aoyagi, M., Zhai, D., Jin, C., Aleshin, A. E., Stec, B., Reed, J. C., Liddington, R. C. Vaccinia virus N1L protein resembles a B cell lymphoma-2 (Bcl-2) family protein. *Protein Sci*. 2007, v.16(1), p.118-24.

Assis, F.L., Pereira, G., Oliveira, C., Rodrigues, G.O., Cotta, M.M., Silva-Fernandes, A.T., Ferreira, P.C., Bonjardim, C.A., Trindade, G.S., Kroon, E.G., Abrahão, J.S. Serologic evidence of orthopoxvirus infection in buffaloes, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2012, v.18(4), p.698-700.

Bartlett, N., Symons, J. A., Tschärke, D. C., Smith, G. L. The vaccinia virus N1L protein is an intracellular homodimer that promotes virulence. *J Gen Virol*. 2002, v. 83, p.1965-76.

Barr, R. K. & M. A. Bogoyevitch. The c-Jun N-terminal protein kinase family of mitogen-activated protein kinases (JNK MAPKs). *Int J Biochem Cell Biol*. 2001, v.33, n.11, p.1047-632001.

Beaud, G. Vaccinia virus DNA replication: a short review. *Biochimie*. 1995, v.77, n.10, p.774-9.

Belin, B. J., Lee, T., Mullins, R. D. DNA damage induces nuclear actin filament assembly by Formin-2 and Spire-1/2 that promotes efficient DNA repair. *Elife*. 2015, Oct 5;4.

Benfield, C. T., Mansur, D. S., McCoy, L. E., Ferguson, B. J., Bahar, M. W., Oldring, A.P., Grimes, J. M., Stuart, D. I., Graham, S. C., Smith, G. L. Mapping the I κ B kinase beta (IKK β)-binding interface of the B14 protein, a vaccinia virus inhibitor of IKK β -mediated activation of nuclear factor kappaB. *J Biol Chem*. 2011, v. 286(23), p. 20727-20735

Benfield, C. T., Ren, H., Lucas, S. J., Bahsoun, B., Smith, G. L. Vaccinia virus protein K7 is a virulence factor that alters the acute immune response to infection. *J Gen Virol*. 2013, v.94, p.1647-57.

Bonjardim, C.A., Ferreira, P.C.P., e Kroon, E.G. Interferons: Signaling, antiviral and viral evasion. *Immunol. Lett.* 2009, v.122(2), p.1-11.

Bonjardim, C. A. Proviral exploitation of VGF and MEK/ERK pathway – a tale of *Vaccinia virus*. 2016, manuscrito em preparação

Boyle, K. A., Greseth, M. D., Traktman, P. Genetic Confirmation that the H5 Protein Is Required for Vaccinia Virus DNA Replication. *J Virol.* 2015, v.89(12), p.6312-27.

Bowie, A., Kiss-Toth, E., Symons, J. A., Smith, G. L., Dower, S. K., O'Neill, L. A. A46R and A52R from vaccinia virus are antagonists of host IL-1 and toll-like receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000, v.97(18), p.10162-7.

Brady, G., Bowie, A. G. Innate immune activation of NFκB and its antagonism by poxviruses. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2014,v.25(5), p.611-20.

Brasil, B. S. A. F. Papel regulatório das vias sinalizadoras celulares MEK/ERK/EGR e MKK/JNK sobre a multiplicação e disseminação dos Orthopoxvirus vaccinia virus e cowpox virus. (Tese de Doutorado). Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

Buller, R. M., Chakrabarti, S., Moss, B., Fredrickson, T. Cell proliferative response to vaccinia virus is mediated by VGF. *Virology.* 1988, v.164(1), p.182-92.

Buller, M. and Bray, M. Looking back at Smallpox. *Clin Infect Dis.* 2004, v.38(6), p.882-889.

Burgess, H. M., Mohr, I. Cellular 5'-3' mRNA exonuclease Xrn1 controls double-stranded RNA accumulation and anti-viral responses. *Cell Host Microbe.* 2015, v.17, p.332-44.

Cargnello, M., Roux, P. P. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2011, v.75(1), p.50-83.

Carpentier, D. C., Gao, W. N., Ewles, H., Morgan, G. W., Smith, G. L. Vaccinia virus protein complex F12/E2 interacts with kinesin light chain isoform 2 to engage the kinesin-1 motor complex. *PLoS Pathog.* 2015, 11(3):e1004723.

Carter, G.C., Law, M., Hollinshead, M., e Smith, G.L. Entry of the vaccinia virus intracellular mature virion and its interactions with glycosaminoglycans. *J Gen Virol.* 2005, v.86, p.1279-90

CDC. Update: multistate outbreak of monkeypox—Illinois, Indiana, Kansas, Missouri, Ohio, and Wisconsin. *MWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2003, v.52, p.642-6.

Chen, R. A., Jacobs, N., Smith, G. L. Vaccinia virus strain Western Reserve protein B14 is an intracellular virulence factor. *J Gen Virol.* 2006, v.87, p. 1451-1458

Chen, R. A., Ryzhakov, G., Cooray, S., Randow, F., Smith, G. L. Inhibition of IkappaB kinase by vaccinia virus virulence factor B14. *PLoS Pathog.* 2008, 4(2): e22

Clark, K., Nanda, S., Cohen, P. Molecular control of the NEMO family of ubiquitin-binding proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2013, v.14(10), p.673-85.

Condit, R. C. & E. G. Niles. Regulation of viral transcription elongation and termination during vaccinia virus infection. *Biochim Biophys Acta.*2002, v.1577, n.2, p.325-36.

Condit, R. C., N. Moussatche, et al. In a nutshell: structure and assembly of the vaccinia virion. *Adv Virus Res.* 2006, v.66, p.31-124.

Cooray, S., Bahar, M. W., Abrescia, N. G., McVey, C. E., Bartlett, N. W., Chen, R. A., Stuart, D. I., Grimes, J. M., Smith, G. L. Functional and structural studies of the vaccinia virus virulence factor N1 reveal a Bcl-2-like anti-apoptotic protein. *J Gen Virol.*2007, v. 88, p.1656-66.

Cowan, K. J. & Storey, K. B. Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. *J Exp Biol.* 2003, v.206, p.1107-15.

Cuadrado, A., Nebreda, A. R. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. *Biochem J.* 2010, v.429, p.403-17.

Dahlgaard, K., Raposo, A. A., Niccoli, T., St Johnston, D. Capu and Spire assemble a cytoplasmic actin mesh that maintains microtubule organization in the *Drosophila* oocyte. *Dev Cell.* 2007, v.13(4), p.539-53.

Damaso, C. R., J. J. Esposito, et al. An emergent poxvirus from humans and cattle in Rio de Janeiro State: Cantagalo virus may derive from Brazilian smallpox vaccine. *Virology*. 2000, v.277, n.2, p.439-49.

Davis, R. J. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*. 2000, v.103, n.2, p.239-52.

De Magalhães, J. C., A. A. Andrade, et al. 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*. 2001, v.276, n.42, p.38353-60.

Deng, L., Wang, C., Spencer, E., Yang, L., Braun, A., You, J., Slaughter, C., Pickart, C., Chen, Z. J. Activation of the I κ B kinase complex by TRAF6 requires a dimeric ubiquitin-conjugating enzyme complex and a unique polyubiquitin chain. *Cell*. 2000, v.103(2), p.351-361

Dhanasekaran, D. N. and Johnson, G. L. MAPKs: function, regulation, role in cancer and therapeutic targeting. *Oncogene*. 2007, v.26(22), p.3097-9.

DiPerna, G., Stack, J., Bowie, A. G., Boyd, A., Kotwal, G., Zhang, Z., Arvikar, S., Latz, E., Fitzgerald, K. A., Marshall, W. L. Poxvirus protein N1L targets the I κ B kinase complex, inhibits signaling to NF- κ B by the tumor necrosis factor superfamily of receptors, and inhibits NF- κ B and IRF3 signaling by toll-like receptors. *J Biol Chem*. 2004, v. 279(35), p. 36570-8.

Ducka, A. M., Joel, P., Popowicz, G. M., Trybus, K. M., Schleicher, M., Noegel, A. A., Huber, R., Holak, T. A., Sitar, T. Structures of actin-bound Wiskott-Aldrich syndrome protein homology 2 (WH2) domains of Spire and the implication for filament nucleation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010, v.107(26), p.11757-62.

Ea, C. K., Deng, L., Xia, Z. P., Pineda, G., Chen, Z. J. Activation of IKK by TNF α requires site-specific ubiquitination of RIP1 and polyubiquitin binding by NEMO. *Mol. Cell*. 2006, v.22, p.245–257.

Eferl, R. & E. F. Wagner. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer*. 2003, v.3, n.11, p.859-68.

Emmerich, C. H., Ordureau, A., Strickson, S., Arthur, J. S., Pedrioli, P. G., Komander, D., Cohen, P. Activation of the canonical IKK complex by K63/M1-linked hybrid ubiquitin chains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013, v.110(38), p.15247-52.

Emmons, S., Phan, H., Calley, J., Chen, W., James, B. and Manseau, L. Cappuccino, a *Drosophila* maternal effect gene required for polarity of the egg and embryo, is related to the vertebrate limb deformity locus. *Genes Dev.* 1995, v.9, p. 2482-2494.

Fedosyuk, S., Grishkovskaya, I., de Almeida Ribeiro, E. Jr., Skern, T. Characterization and structure of the vaccinia virus NF- κ B antagonist A46. *J Biol Chem.* 2014, v.289(6), p.3749-62.

Fenner, F., Wittek, R. & Dumbell, K. R. *The Orthopoxviruses.* San Diego: Academic Press, Inc. 1989

Fenner, F. Adventures with poxviruses of vertebrates. *FEMS Microbiol Rev.* 2000, v.24, n.2, p.123-33.

Fonseca, F. G., M. C. Lanna, et al. Morphological and molecular characterization of the poxvirus BeAn 58058. *Arch Virol.* 1998, v.143, n.6, p.1171-86.

Gedey, R., Jin, X. L., Hinthong, O., Shisler, J. L. 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.* 2006, v.80(17), p. 8676-8685

González, J. M., Esteban, M. A poxvirus Bcl-2-like gene family involved in regulation of host immune response: sequence similarity and evolutionary history. *Virol J.* 2010, 7:59.

Graham, S. C., Bahar, M. W., Cooray, S., Chen, R. A., Whalen, D. M., Abrescia, N. G., Alderton, D., Owens, R. J., Stuart, D. I., Smith, G. L., Grimes, J. M. Vaccinia virus proteins A52 and B14 Share a Bcl-2-like fold but have evolved to inhibit NF-kappaB rather than apoptosis. *PLoS Pathog.* 2008, 4(8): e1000128.

Greber, U.F. Signalling in viral entry. *Cell Mol Life Sci.* 2002, v.59(4), p.608-626.

Haga, I. R., Pechenick Jowers, T., Griffiths, S. J., Haas, J., Beard, P. M. TRAF2 facilitates vaccinia virus replication by promoting rapid virus entry. *J Virol.* 2014, v. 88(7), p.3664-77.

Harte, M. T., Haga, I. R., Maloney, G., Gray, P., Reading, P. C., Bartlett, N. W., Smith, G. L., Bowie, A., O'Neill, L. A. The poxvirus protein A52R targets Toll-like receptor signaling complexes to suppress host defense. *J Exp Med.* 2003, v.197(3), p. 343-351

Hess, J., Angel, P., Schorpp-Kistner, M. AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J Cell Sci.* 2004, v.117, p. 5965-73.

Hilleman, M. R. Vaccines in historic evolution and perspectives: a narrative of vaccine discoveries. *Vaccine.* 2000, v.18, p. 1436-1447.

Himes, S. R., Sester, D. P., Ravasi, T., Cronau, S. L., Sasmono, T., and Hume, D. A. The JNK Are Important for Development and Survival of Macrophages. *The Journal of Immunology.* 2006, v.176, p. 2219–2228.

Huang, C., K. Jacobson, et al. MAP kinases and cell migration. *J Cell Sci.* 2004, v.117, p.4619-28.

Huang, C., Lu, T., Bair, C., Chang, Y., Jwo, J., e Chang, W. A novel protein, VPEF, facilitates virus penetration into HeLa cells through fluid phase endocytosis. *J Virol.* 2008, v. 82, n.16, p. 7988-99.

Humphries, A. C., Dodding, M. P., Barry, D. J., Collinson, L. M., Durkin, C. H., Way, M. Clathrin potentiates vaccinia-induced actin polymerization to facilitate viral spread. *Cell Host Microbe.* 2012, v.12(3), p.346-59.

Humphries, A.C., Donnelly, S.K., Way, M. Cdc42 and the Rho GEF intersectin-1 collaborate with Nck to promote N-WASP-dependent actin polymerisation. *J. Cell Sci.* 2014, v.127, p.673–685.

Kalverda, A. P., Thompson, G. S., Vogel, A., Schröder, M., Bowie, A. G., Khan, A. R., Homans, S. W. Poxvirus K7 protein adopts a Bcl-2 fold: biochemical mapping of

its interactions with human DEAD box RNA helicase DDX3. *J Mol Biol.* 2009, v.385(3), p.843-53.

Kappelmann, M., Bosserhoff, A., Kuphal, S. AP-1/c-Jun transcription factors: regulation and function in malignant melanoma. *Eur J Cell Biol.* 2014, v. 93, p. 76-81.

Karin M. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem.* 1995, v.270(28), p.16483-6.

Karin, M., Liu, Z. and Zandi, E. AP-1 function and regulation. *Current Opinion in Cell Biology*, 1997, v.9(2), p.240-6.

Keating, S. E., Maloney, G. M., Moran, E. M., Bowie, A. G. IRAK-2 participates in multiple toll-like receptor signaling pathways to NFkappaB via activation of TRAF6 ubiquitination. *J Biol Chem.* 2007, v.282(46), p.33435-33443

Kensche, T. et al. Analysis of nuclear factor- κ B (NF- κ B) essential modulator (NEMO) binding to linear and lysine-linked ubiquitin chains and its role in the activation of NF- κ B. *J. Biol. Chem.* 2012, v.287, p.23626–23634.

Kerkhoff, E., Simpson, J.C., Leberfinger, C.B., Otto, I.M., Doerks, T., Bork, P., Rapp, U.R., Raabe, T. and Pepperkok, R. The Spir actin organizers are involved in vesicle transport processes. *Curr. Biol.* 2001, v.11, p.1963-1968.

Kerkhoff E. Cellular functions of the Spir actin-nucleation factors. *Trends Cell Biol.* 2006, v.16(9), p.477-83.

Kilcher, S., Schmidt, F.I., Schneider, C., Kopf, M., Helenius, A., Mercer, J. siRNA Screen of Early Poxvirus Genes Identifies the AAA+ ATPase D5 as the Virus Genome-Uncoating Factor. *Cell Host Microbe.* 2012, v.15(1), p.103-12.

Kim, Y., Lee, H., Heo, L., Seok, C., Choe, J. Structure of vaccinia virus A46, an inhibitor of TLR4 signaling pathway, shows the conformation of VIPER motif. *Protein Sci.* 2014, v.23(7), p.906-14.

Kirisako, T. et al. A ubiquitin ligase complex assembles linear polyubiquitin chains. *EMBO J.* 2006, v.25, p.4877–4887

Kotwal, G. J., Hügin, A. W., Moss, B. Mapping and insertional mutagenesis of a vaccinia virus gene encoding a 13,800-Da secreted protein. *Virology*. 1989, v. 171(2), p.579-87.

Kvansakul, M., Yang, H., Fairlie, W. D., Czabotar, P. E., Fischer, S. F., Perugini, M. A., Huang, D. C., Colman, P. M. Vaccinia virus anti-apoptotic F1L is a novel Bcl-2-like domain-swapped dimer that binds a highly selective subset of BH3-containing death ligands. *Cell Death Differ*. 2008, v.15(10), p. 1564-1571

Kyriakis, J. M. and Avruch J. Mammalian. Mitogen-Activated Protein Kinase Signal Transduction Pathways Activated by Stress and Inflammation. *Physiological Reviews*. 2001, v.81, n.2., p.807-869.

Kyriakis, J. M. and Avruch J. Mammalian. MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update. *Physiol Rev*. 2012, v. 92(2), p.689-737.

Kühbacher, A., Emmenlauer, M., et al. Genome-Wide siRNA Screen Identifies Complementary Signaling Pathways Involved in Listeria Infection and Reveals Different Actin Nucleation Mechanisms during Listeria Cell Invasion and Actin Comet Tail Formation. *MBio*. 2015, v. 6(3), p.00598-15.

Lagal, V., Abrivard, M., Gonzalez, V., Perazzi, A., Popli, S., Verzeroli, E., Tardieux, I. Spire-1 contributes to the invadosome and its associated invasive properties. *J Cell Sci*. 2014, v. 127, p.328-40.

Lakshmi, S. Post-translational modification and regulation of human spir protein (Tese de Doutorado). Universität Regensburg, 2011

Lee, Y. H., Chiu, Y. F., Wang, W. H., Chang, L. K., Liu, S. T. Activation of the ERK signal transduction pathway by Epstein-Barr virus immediate-early protein Rta. *J Gen Virol*. 2008, v.89, p.2437–2446.

Lefkowitz, E.J., Wang, C., Upton, C. Poxviruses: past, present and future. *Virus Res*. 2006, v.117, n.1, p.105-118.

Leite, F. G. G. Aspectos da Interação dos Orthopoxvirus Vaccinia e Cowpox com a célula-hospedeira: o papel da MAPK JNK e do fator transcricional c-Jun. (Tese de Doutorado). Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

Leite, F. & Way, M. The role of signalling and the cytoskeleton during Vaccinia Virus egress. *Virus Res.* 2015.v. 209, p.87-99

Leite, J. A., B. P. Drumond, et al. Passatempo virus, a vaccinia virus strain, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2005, v.11, n.12, p.1935-8.

Liu, S. W., Katsafanas, G. C., Liu, R., Wyatt, L. S., Moss, B. Poxvirus decapping enzymes enhance virulence by preventing the accumulation of dsRNA and the induction of innate antiviral responses. *Cell Host Microbe.* 2015, v.17(3), p.320-31.

Liu, X., Cohen, J. I. Epstein-Barr Virus (EBV) Tegument Protein BGLF2 Promotes EBV Reactivation through Activation of the p38 Mitogen-Activated Protein Kinase. *J Virol.* 2016, v.90(2), p.1129-38.

Liu, X., Li, Q., Dowdell, K., Fischer, E. R., Cohen, J. I. Varicella-Zoster virus ORF12 protein triggers phosphorylation of ERK1/2 and inhibits apoptosis. *J Virol.* 2012, v.86(6), p.3143-51.

Lobato, Z. I. P., Trindade, G. S., Frois, M. C. M., Ribeiro, E. B. T., Dias, G. R. C., Teixeira, B. M., Lima, F. A., Almeida, G. M. F. & Kroon, E. G. Surto de varíola bovina causada pelo vírus Vaccinia na região da Zona da Mata Mineira. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.* 2005, v.57, p.423-429.

Ludwig, S., Ehrhardt, C., Neumeier, E. R., Kracht, M., Rapp, U. R., Pleschka, S. Influenza virus-induced AP-1-dependent gene expression requires activation of the JNK signaling pathway. *J Biol Chem.* 2001, v.276(24), p.10990-8.

Ludwig, S., Planz, O., Pleschka, S., e Wolff, T. Influenza-virus-induced signaling cascades: targets for antiviral therapy. *Trends Mol Med.* 2003, v.9(2), p.46-52.

Mahalingam, S., Damon, I. K., Lidbury, B. A. 25 years since the eradication of smallpox: why poxvirus research is still relevant. *TRENDS in Immunology*. 2004, v.25, n. 12, p. 636-639.

Maloney, G., Schroder, M., Bowie, A. G. Vaccinia virus protein A52R activates p38 mitogen-activated protein kinase and potentiates lipopolysaccharide-induced interleukin-10. *J Biol Chem*. 2005, v.280(35), p. 30838-30844

Maluquer de Motes, C., Cooray, S., Ren, H., Almeida, G. M., McGourty, K., Bahar, M. W., Stuart, D. I., Grimes, J. M., Graham, S. C., Smith, G. L. Inhibition of apoptosis and NF- κ B activation by vaccinia protein N1 occur via distinct binding surfaces and make different contributions to virulence. *PLoS Pathog*. 2011 v. 7(12), p.1-13

Manseau, L. J., Schüpbach, T. cappuccino and spire: two unique maternal-effect loci required for both the anteroposterior and dorsoventral patterns of the *Drosophila* embryo. *Genes Dev*. 1989, v.3(9), p.1437-52.

Mansur, D. S., Maluquer de Motes, C., Unterholzner, L., Sumner, R. P., Ferguson, B. J., Ren, H., Strnadova, P., Bowie, A. G., Smith, G. L. Poxvirus targeting of E3 ligase β -TrCP by molecular mimicry: a mechanism to inhibit NF- κ B activation and promote immune evasion and virulence. *PLoS Pathog*. 2013, 9(2):e1003183.

McCoy, L. E., Fahy, A. S., Chen, R. A., Smith, G.L. Mutations in modified virus Ankara protein 183 render it a non-functional counterpart of B14, an inhibitor of nuclear factor kappaB activation. *J Gen Virol*. 2010,v.91, p.2216-2220

McFadden, G. Smallpox: An ancient disease enters the modern era of virogenomics. *PNAS*. 2004, v. 101, n. 42, p.14994-140995.

McFadden, G. Poxvirus tropism. *Nat Rev Microbiol*. 2005, v.3, n.3, Mar, p.201-13.

McFadden, Grant. Killing a Killer: What Next for Smallpox? *Plos Pathogens*. 2012, v. 6, p.1-4.

Medeiros-Silva, D. C., Moreira-Silva, E. A. S, Gomes, J. A. S, Fonseca, F. G., Correa-Oliveira, R. Clinical signs, diagnosis, and case reports of Vaccinia virus infections. *Braz J Infect Dis*. 2010, v.14(2), p.129-134.

Meng, Q., Xia, Y. c-Jun, at the crossroad of the signaling network. *Protein Cell*. 2011, v.2(11), p.889-98.

Mercer, J. & Helenius, A. Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells. *Science*. 2008, v.320, n.5875, p.531-5.

Monje, P., Hernández-Losa, J., Lyons, R. J., Castellone, M. D., Gutkind, J. S. Regulation of the transcriptional activity of c-Fos by ERK. A novel role for the prolyl isomerase PIN1. *J Biol Chem*. 2005, v.280(42), p.35081-4.

Montaville, P., Jégou, A., Pernier, J., Compper, C., Guichard, B., Mogessie, B., Schuh, M., Romet-Lemonne, G., Carlier, M. F. Spire and Formin 2 synergize and antagonize in regulating actin assembly in meiosis by a ping-pong mechanism. *PLoS Biol*. 2014, v.12(2):e1001795.

Moreau, V., Frischknecht, F., Reckmann, I., Vincentelli, R., Rabut, G., Stewart, D., e Way, M. A complex of N-WASP and WIP integrates signalling cascades that lead to actin polymerization. *Nat Cell Biol*. 2000, v.2(7), p.441-8.

Morel, E., Parton, R. G., Gruenberg, J. Annexin A2-dependent polymerization of actin mediates endosome biogenesis. *Dev Cell*. 2009, v.16(3), p.445-57.

Morrison, D. K. MAP kinase pathways. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012,4:a011254

Moss, B. Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996, v.93, n.21, Oct 15, p.11341- 8.

Moss, B. Poxvirus entry and membrane fusion. *Virology*. 2006, v.344, n.1, Jan 5, p.48- 54.

Moss, B. Poxviridae: The Viruses and Their Replication. In: B. N. Fields, Knipe, D. M., Howley, P.M. (6th Ed.) *Virology*, 2013, p.2129-2159. 2013.

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

Nagasse-Sugahara, T. K., J. J. Kisielius, et al. Human vaccinia-like virus outbreaks in Sao Paulo and Goias States, Brazil: virus detection, isolation and identification. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2004, v.46, n.6, p.315-22.

Neidel, S., Maluquer de Motes, C., Mansur, D. S., Strnadova, P., Smith, G. L., Graham, S. C. Vaccinia virus protein A49 is an unexpected member of the B-cell Lymphoma (Bcl)-2 protein family. *J Biol Chem*. 2015, v. 290(10), p.5991-6002.

Newsome, T.P., Scaplehorn, N., e Way, M. Src mediates a switch from microtubule- to actin-based motility of Vaccinia virus. *Science*. 2004, v.306(5693), p. 124-129.

Newsome, T.P., Weisswange, I., Frischknecht, F., e Way, M. Abl collaborates with Src family kinases to stimulate actin-based motility of vaccinia virus. *Cell. Microbiol*. 2006, v.8(2), p.233-241.

Ninomiya-Tsuji, J., Kishimoto, K., Hiyama, A., Inoue, J., Cao, Z., Matsumoto, K. The kinase TAK1 can activate the NIK-I kappaB as well as the MAP kinase cascade in the IL-1 signalling pathway. *Nature*. 1999, v.398(6724), p.252-6.

Nishina, H., et al. Physiological roles of SAPK/JNK signaling pathway. *J Biochem*. 2004, v.136, n.2, p.123-6.

Oda, S., Schroder, M., Khan, A. R. Structural basis for targeting of human RNA helicase DDX3 by poxvirus protein K7. *Structure*, 2009,v.17(11), p.1528-1537.

Oliveira, D. B., Assis, F. L., Ferreira, P. C., Bonjardim, C. A., de Souza Trindade, G., Kroon, E. G., Abrahão, J. S. Group 1 Vaccinia virus zoonotic outbreak in Maranhao State, Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 2013, v.89(6), p.1142-5.

Oliveira, L.C. Papel exercido pelos reguladores transcricionais Egr-1 e c-Fos sobre a disseminação do Vaccinia virus. Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 2013.

Ostermeier, C. and Brünger, A.T. Structural basis of Rab effector specificity: Crystal structure of the small G protein Rab3A complexed with the effector domain of rabphilin- 3A. *Cell*. 1999, v.96, p.363–374.

Otto, I.M. et al. The p150-Spir protein provides a link between c-Jun N-terminal kinase function and actin reorganization. *Curr. Biol.* 2000,v.10, p.345–348

Ovsyannikova, I. G., Kennedy, R. B., O'Byrne, M., Jacobson, R. M., Pankratz, V. S., Poland, G. A. Genome-wide association study of antibody response to smallpox vaccine. *Vaccine.* 2012, v.30(28), p.4182-9.

Parrish, S. & Moss, B. Characterization of a Vaccinia virus mutant with a deletion of the D10L gene encoding a putative negative regulator of gene expression. *J Virol.* 2006, v.80(2), p.553-61.

Parrish, S. & Moss, B. Characterization of a second Vaccinia virus mRNA-decapping enzyme conserved in poxviruses. *J Virol.* 2007, v.81(23), p.12973-8.

Pearson, G., F. Robinson, et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev.* 2001, v.22, n.2, p.153-83.

Pechlivanis, M., Samol, A., and Kerkhoff, E. Identification of a short Spir interaction sequence at the C-terminal end of formin subgroup proteins. *J. Biol. Chem.* 2009, v.284, p.25324-25333.

Pereira, A. C. T. C. Aspectos da interação entre Vaccinia virus e a célula hospedeira: significado funcional desempenhado pelas MAPKs JNK e ERK na biologia viral. (Tese de Doutorado). Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2007.

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. A Vaccinia Virus-Driven Interplay between the MKK4/7-JNK1/2 Pathway and Cytoskeleton Reorganization. *J Virol.* 2012, v. 86(1), p.172-84.

Perino, J., Foo, C. H., Spehner, D., Cohen, G. H., Eisenberg, R. J., Crance, J. M., Favier, A. L. Role of sulfatide in vaccinia virus infection. *Biol Cell.* 2011, v. 103(7), p.319-31.

Pfender, S., Kuznetsov, V., Pleiser, S., Kerkhoff, E., Schuh, M. Spire-type actin nucleators cooperate with Formin-2 to drive asymmetric oocyte division. *Curr Biol.* 2011, v.21(11), p.955-60.

Pleiser, S., Rock, R., Wellmann, J., Gessler, M. and Kerkhoff, E. Expression patterns of the mouse Spir-2 actin nucleator. *Gene. Expr. Patterns.* 2010, v.10, p.345–350.

Pleiser, S., Banchaabouchi, M. A., Samol-Wolf, A., Farley, D., Welz, T., Wellbourne-Wood, J., Gehring, I., Linkner, J., Faix, J., Riemenschneider, M. J., Dietrich, S., Kerkhoff, E. Enhanced fear expression in Spir-1 actin organizer mutant mice. *Eur J Cell Biol.* 2014, v.93(5-6), p.225-37.

Postigo, A., Martin, M.C., Dodding, M.P. e Way, M. Vaccinia-induced EGFR-MEK signaling and the antiapoptótico protein F1L synergize to suppress cell death. *Cell. Microbiol.* 2009, v.11(8), p.1208-1218.

Quinlan, M.E., Heuser, J.E., Kerkhoff, E. and Mullins, R.D. *Drosophila* Spire is an actin nucleation factor. *Nature.* 2005, v.433, p.382-388.

Quinlan, M.E., Hilgert, S., Bedrossian, A., Mullins, R.D., and Kerkhoff, E. Regulatory interactions between two actin nucleators, Spire and Cappuccino. *J. Cell. Biol.* 2007, v.179, p.117-128.

Quinlan, M. E. Direct interaction between two actin nucleators is required in *Drosophila* oogenesis. *Development.* 2013, v.140, p.4417-4425

Rahighi, S., et al. Specific recognition of linear ubiquitin chains by NEMO is important for NF-kappaB activation. *Cell.* 2009, v.136(6), p.098–1109.

Reddy, S. P., Mossman, B. T. Role and regulation of activator protein-1 in toxicant-induced responses of the lung. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2002, v. 283(6), p.1161-78.

Reeves, P.M., Bonnarius, B., Lebeis, S., McNulty, S., Christensen, J., Swimm, A., Chahroudi, A., Chavan, R., Feinberg, M.B., Veach, D., Bornmann, W., Sherman, M., e Kalman, D. Disabling poxviru pathogenesis by inhibition of Abl-family tyrosine kinases. *Nat. Med.* 2005, v.11(7), p.731-739.

Rizopoulos, Z., Balistreri, G., Kilcher, S., Martin, C. K., Syedbasha, M., Helenius, A., Mercer, J. Vaccinia Virus Infection Requires Maturation of Macropinosomes. *Traffic*. 2015. [Epub ahead of print]

Roberts, K. L. & G. L. Smith. Vaccinia virus morphogenesis and dissemination. *Trends Microbiol.* 2008, v.16, n.10, p.472-9.

Rosales-Nieves, A.E. et al. Coordination of microtubule and microfilament dynamics by *Drosophila* Rho1, Spire and Cappuccino. *Nat. Cell Biol.* 2006, v.8, p.367–376.

Rothwarf, D. M., Zandi, E., Natoli, G., Karin, M. IKK-gamma is an essential regulatory subunit of the I kappa B kinase complex. *Nature*. 1998, v.395(6699), p.297-300.

Santos, C. R., Blanco, S., Sevilla, A., Lazo, P. A. Vaccinia virus B1R kinase interacts with JIP1 and modulates c-Jun-dependent signaling. *J Virol.* 2006, v.80(15), p.7667-75.

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

Schatzmayr, H. G., Costa, R. V., Gonçalves, M. C., D'Andréa, P. S., Barth, O. M. Human and animal infections by vaccinia-like viruses in the state of Rio de Janeiro: A novel expanding zoonosis. *Vaccine*. 2011.

Scherer, D. C., Brockman, J. A., Chen, Z., Maniatis, T., Ballard, D. W. Signal-induced degradation of I kappa B alpha requires site-specific ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995, v.92(24), p.11259-11263

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

Schroder, M., Baran, M., Bowie, A. G. Viral targeting of DEAD box protein 3 reveals its role in TBK1/IKKepsilon-mediated IRF activation. *Embo J*. 2008, v.27(15), p. 2147-2157.

Schuh, M. An actin-dependent mechanism for long-range vesicle transport. *Nat Cell Biol.* 2011, v.13(12), p.1431-6.

Schumacher, N., Borawski, J. M., Leberfinger, C. B., Gessler, M. and Kerkhoff. E. Overlapping expression pattern of the actin organizers Spir-1 and formin-2 in the developing mouse nervous system and the adult brain. *Gene. Expr Patterns.*2004, v.4, p.249-255.

Schweneker, M., Lukassen, S., Späth, M., Wolferstätter, M., Babel, E., Brinkmann, K., Wielert, U., Chaplin, P., Suter, M., Hausmann, J. The vaccinia virus O1 protein is required for sustained activation of the extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 and promotes viral virulence. *J Virol.* 2012, v.86(4), p.2323-36

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

Shaulian, E., Karin, M. AP-1 in cell proliferation and survival. *Oncogene.* 2001, v.20(19), p.2390-400.

Shaulian, E., Karin, M. AP-1 as a regulator of cell life and death. *Nat. Cell.Biol.*2002, v.4, p.131–136.

Shaulian, E. AP-1 – the Jun proteins: Oncogenes or tumor suppressors indisguise? *Cell Signal.*2010, v.22, p.894–899.

Silva, P. N., J. A. Soares, et al. Differential role played by the MEK/ERK/EGR-1 pathway in orthopoxviruses vaccinia and cowpox biology. *Biochem J.* 2006, v.398, n.1, p.83-95.

Sitar, T., Gallinger, J., Ducka, A. M., Ikonen, T. P., Wohlhoefer, M., Schmoller, K. M., Bausch, A. R., Joel, P., Trybus, K. M., Noegel, A. A., Schleicher, M., Huber. R., Holak, T. A. Molecular architecture of the Spire-actin nucleus and its implication for actin filament assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011, v.108(49), p.19575-80.

Smith, G. L. & G. Mcfadden. Smallpox: anything to declare? *Nat Rev Immunol.* 2002, v.2, n.7, p.521-7.

Smith, G. L., Murphy, B. J., et al. Vaccinia virus motility. *Annu Rev Microbiol.* 2003, v.57, p.323-42.

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

Smith, G. L., Benfield, C. T., Maluquer de Motes, C., Mazzon, M., Ember, S. W., Ferguson, B. J., Sumner, R. P. Vaccinia virus immune evasion: mechanisms, virulence and immunogenicity. *J Gen Virol.* 2013, v.94(Pt 11), p.2367-92.

Soares, J. A., F. G. Leite, et al. Activation of the PI3K/Akt pathway early during vaccinia and cowpox virus infections is required for both host survival and viral replication. *J Virol.* 2009, v.83, n.13, p.6883-99.

Sodeik, B. & Krijnse-Locker, J. Assembly of vaccinia virus revisited: de novo membrane synthesis or acquisition from the host? *Trends Microbiol.* 2002, v.10, p.15-24.

Stack, J., Haga, I. R., Schroder, M., Bartlett, N. W., Maloney, G., Reading, P. C., Fitzgerald, K. A., Smith, G. L., Bowie, A. G. Vaccinia virus protein A46R targets multiple Toll-like-interleukin-1 receptor adaptors and contributes to virulence. *J Exp Med.* 2005, v.201(6):, p.1007-1018

Stack, J., Bowie, A. G. Poxviral protein A46 antagonizes Toll-like receptor 4 signaling by targeting BB loop motifs in Toll-IL-1 receptor adaptor proteins to disrupt receptor: adaptor interactions. *J Biol Chem.* 2012, v. 287(27), p.22672-82.

Stack, J., Hurst, T. P., Flannery, S. M., Brennan, K., Rupp, S., Oda, S., Khan, A. R., Bowie, A. G. Poxviral protein A52 stimulates p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation by causing tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) self-association leading to transforming growth factor β -activated kinase 1 (TAK1) recruitment. *J Biol Chem.* 2013, v. 288(47), p.33642-53.

Tan, S. Y. Medicine in Stamps- Edward Jenner (1749-1823): conqueror of smallpox. *Singapore Med J.* 2004, v.45 (11), p.507-508.

Theurkauf, W., Smiley, S., Wong, M. and Alberts, B. Reorganization of the cytoskeleton during *Drosophila* oogenesis: implications for axis specification and intercellular transport. *Development*. 1992, v.115, p.923-936.

Tittel, J., Welz, T., Czogalla, A., Dietrich, S., Samol-Wolf, A., Schulte, M., Schwille, P., Weidemann, T., Kerkhoff, E. Membrane targeting of the Spir-formin actin nucleator complex requires a sequential handshake of polar interactions. *J Biol Chem*. 2015, v.290(10), p.6428-44.

Tokunaga, F. et al. Involvement of linear polyubiquitylation of NEMO in NF- κ B activation. *Nature Cell Biol*. 2009, v.11, p.123–132.

Tokunaga, F. et al. SHARPIN is a component of the NF- κ B-activating linear ubiquitin chain assembly complex. *Nature*. 2011, v.471, p.633–636.

Torres, A. A. et al. Activation of JNK/c-Jun during *Cowpox virus* infection down-regulates IL-6 expression. 2016, manuscrito em preparação

Trindade, G. S., F. G. Da Fonseca, et al. Aracatuba virus: a vaccinia-like virus associated with infection in humans and cattle. *Emerg Infect Dis*. 2003, v.9, n.2, p.155-60.

Trindade, G. S., Z. I. Lobato, et al. 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*. 2006, v.75, n.3, p.486-90.

Trindade, G. S., G. L. Emerson, et al. Brazilian vaccinia viruses and their origins. *Emerg Infect Dis*. 2007, v.13, n.7, p.965-72. 2

Unterholzner L. The interferon response to intracellular DNA: why so many receptors? *Immunobiology*. 2013, v.218(11), p.1312-21.

Vallabhapurapu, S., Karin, M. Regulation and function of NF- κ B transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol*. 2009, v.27, p.693-733

Vogel, S., Sárdy, M., Glos, K., Korting, H. C., Ruzicka, T., Wollenberg, A. The Munich Outbreak of Cutaneous Cowpox Infection: Transmission by Infected Pet Rats. *Acta Derm Venereol.* 2011.

Wada, T. and Penninger, J., M. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene.*2004, v.23, p.2838–2849.

Wang, C., Deng, L., Hong, M., Akkaraju, G. R., Inoue, J., Chen, Z. J. TAK1 is a ubiquitin-dependent kinase of MKK and IKK. *Nature.* 2001, v.412(6844), p.346-51.

Wellington, A., Emmons, S., James, B., Calley, J., Grover, M., Tolia, P. and Manseau, L. Spire contains actin binding domains and is related to ascidian posterior end mark-5. *Development.*1999, v.126, p.5267-5274.

Whitmarsh, A. J., Davis, R. J. Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J Mol Med*, 1996 v.74(10), p.589-607

Wienecke, R., Wolff, H., Schaller, M., Meyer, H., Plewig, G. Cowpox virus infection in an 11 year-old girl. *J Am Acad Dermatol.* 2000, v. 42, p.892-4.

Wisdom, R. AP-1: one switch for many signals. *Exp Cell Res.* 1999, v.253(1), p.180-5.

Wu, C. J., Conze, D. B., Li, T. Srinivasula, S. M. & Ashwell, J. D. Sensing of Lys 63- linked polyubiquitination by NEMO is a key event in NF- κ B activation. *Nature Cell Biol.* 2006, v.8, p.398–406.

Yang, Z., Cao, S., Martens, C. A., Porcella, S. F., Xie, Z., Ma, M., Shen, B., Moss B. Deciphering Poxvirus Gene Expression by RNA Sequencing and Ribosome Profiling. *J Virol.* 2015, Apr 22. [Epub ahead of print]

Zandi, E., Rothwarf, D. M., Delhase, M., Hayakawa, M., Karin, M. The I κ B kinase complex (IKK) contains two kinase subunits, IKK α and IKK β , necessary for I κ B phosphorylation and NF- κ B activation. *Cell.* 1997, v.91(2), p.243-252
