

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

**A expressão de interleucina-6 durante infecção pelo  
*Orthopoxvirus Cowpox* é regulada pelas MAPKs JNK1/2**

Alice Abreu Torres

Belo Horizonte, Fevereiro de 2012

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

**A expressão de interleucina-6 durante infecção pelo  
*Orthopoxvirus Cowpox* é regulada pelas MAPKs JNK1/2**

Alice Abreu Torres

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia).

**Orientador:** Prof. Dr. Cláudio Antônio Bonjardim

Belo Horizonte, Fevereiro de 2012

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Cláudio, pela confiança e orientação durante o desenvolvimento deste trabalho, bem como pela convivência ao longo dos meus 6 anos de Laboratório de Vírus;

À Profa Erna, À Profa Giliane e ao Prof. Paulo, pela disponibilidade em ajudar sempre;

Ao Prof. Jônatas, pelas discussões, correções e ajuda ao longo do desenvolvimento deste trabalho;

À Profa. Marisa B. Bonjardim por ter me apresentado ao Laboratório de Vírus;

À Ângela, ao João, e à Andreza, que são os verdadeiros responsáveis pelo bom andamento e funcionamento Laboratório;

Aos Drs. Bruno S.A.F. Brasil e Breno M. Silva, pela disponibilidade em compor a banca examinadora;

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;

Ao doutorando Jonas D. Albarnaz, pela ajuda imensa na realização de experimentos, na discussão de resultados, pela amizade e pela companhia, sem os quais metade deste trabalho não teria sido realizado;

Aos demais GTS, de hoje e de ontem, pelos ensinamentos, pelo companheirismo e pela ajuda durante o desenvolvimento deste trabalho;

À Dra. Graciela K. Lima, sempre disposta ajudar com a PCR em tempo real;

Aos demais amigos Labvirianos, por me proporcionarem risadas e compartilharem as lágrimas, tornando o Laboratório a nossa segunda casa;

Aos amigos da bio, do departamento e outros amigos, por sempre torcerem por mim;

Aos meus familiares, por serem sempre um exemplo;

Aos meus pais e as minhas irmãs, pelo amor e apoio incondicional, mesmo sem entenderem nada do que estudo!

## SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	5
LISTA DE FIGURAS .....	8
LISTA DE TABELAS .....	10
LISTA DE ABREVIATURAS.....	11
RESUMO.....	13
ABSTRACT .....	14
I. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	15
II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
1. Os Poxvírus .....	19
1.1. Histórico e Perspectivas .....	19
1.2. Família Poxviridae .....	21
2. Aspectos Gerais da Biologia dos Poxvírus .....	24
2.1. Morfologia .....	24
2.2. Genoma .....	27
2.3. Ciclo de multiplicação dos Poxvírus .....	30
2.3.1. Adsorção e penetração .....	30
2.3.2. Expressão gênica .....	33
2.3.3. Replicação do genoma .....	33
2.3.4. Morfogênese e liberação das partículas virais .....	34
3. Resposta Imune contra os Poxvírus .....	36
3.1. Resposta Imune Inata .....	36
3.2. Resposta Imune Adaptativa .....	37
3.3. Citocinas .....	38
4. Interação Poxvírus-Hospedeiro .....	42
5. MAPK (proteínas quinases ativadas por mitógenos).....	47
5.1. Quinase c-Jun amino terminal (JNK1/2) /SAPKs .....	50
5.1.1. JNK e os vírus .....	51

III. OBJETIVOS .....	53
1. Objetivo Geral .....	53
2. Objetivos Específicos.....	53
IV. MATERIAL E MÉTODOS .....	54
1. Células .....	54
1.1. Células BSC-40 .....	54
1.2. Células selvagem (WT) e knockout (KO) para JNK1/2 .....	54
1.3. Células A31 expressando dominância negativa para c-Jun (DN c-Jun) e células controle transfectadas com o vetor vazio (pELFIN) .....	54
1.4. Células RAW 264.7 .....	54
2. Animais .....	55
2.1. Macrófagos intraperitoniais de camundongos.....	55
3. Vírus.....	56
3.1. Produção dos estoques virais .....	56
3.2. Purificação viral .....	56
3.3. Titulação viral .....	57
3.4. Análise da Multiplicação viral .....	57
4. Anticorpos e Reagentes.....	57
5. Infecção .....	58
6. Extração de Proteínas Totais .....	58
7. Transferência de “Western” .....	59
8. Extração do RNA Total .....	60
9. Tratamento de RNAs com DNase .....	60
10. Transcrição Reversa.....	61
11. PCR em Tempo Real.....	61
12. ELISA.....	63
V. RESULTADOS.....	64

1. PCR em tempo real para os genes HPRT, IL-6 e TNF- $\alpha$ .....	64
2. Expressão e secreção de IL-6 durante infecção pelo CPXV e VACV nos MEFs JNK WT e KO .....	69
3. Cinética de expressão de IL-6 durante infecção pelo CPXV nos MEFs JNK1/2 WT e KO .....	72
4. Expressão de TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-12 durante infecção pelo CPXV nos MEFs JNK1/2 WT e KO .....	74
5. Expressão de IL-6 durante infecção pelo CPXV nas células expressando dominância negativa de c-Jun .....	76
6. Avaliação da multiplicação do CPXV e da ativação de JNK1/2 após a infecção em macrófagos primários e transformados (células RAW 264.7) .....	78
7. Expressão de IL-6 e TNF- $\alpha$ em macrófagos transformados (células RAW 264.7) e primários após infecção pelo CPXV .....	81
VI. DISCUSSÃO.....	86
VII.CONCLUSÃO.....	93
PERSPECTIVAS.....	94
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1:</b> Morfologia da partícula viral dos <i>Orthopoxvirus</i> .....	25
<b>FIGURA 2:</b> Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão das três formas virais do VACV. ....	26
<b>FIGURA 3:</b> Representação esquemática do genoma dos Poxvírus.....	29
<b>FIGURA 4:</b> Esquema representando o Ciclo de Multiplicação dos Poxvírus.. .....	32
<b>FIGURA 5:</b> Algumas proteínas de <i>Vaccinia virus</i> (VACV) relacionadas à evasão da resposta imune do hospedeiro.....	43
<b>FIGURA 6:</b> Ativação das MAPKs ERK e JNK, pelo VACV e CPXV. ....	46
<b>FIGURA 7:</b> Representação esquemática das cascatas de sinalização das MAP Quinases.....	49
<b>FIGURA 8:</b> Gráficos representativos da amplificação tanto da curva padrão relativa quanto de cDNAs resultantes da reação de transcrição reversa na presença (com RT) ou na ausência (sem RT) da enzima transcriptase reversa e respectivas curvas de dissociação, utilizando os iniciadores para o gene HPRT .. .....	66
<b>FIGURA 9:</b> Gráficos representativos da amplificação tanto da curva padrão relativa quanto de cDNAs resultantes da reação de transcrição reversa na presença (com RT) ou na ausência (sem RT) da enzima transcriptase reversa e respectivas curvas de dissociação, utilizando os iniciadores para o gene TNF- $\alpha$ .....	67
<b>FIGURA 10:</b> Gráficos representativos da amplificação tanto da curva padrão relativa quanto de cDNAs resultantes da reação de transcrição reversa na presença (com RT) ou na ausência (sem RT) da enzima transcriptase reversa e respectivas curvas de dissociação, utilizando os iniciadores para o gene IL-6.....	68
<b>FIGURA 11:</b> Expressão e secreção de IL-6 após infecção pelo vírus VACV e CPXV em MEFs JNK1/2 WT e KO... .....	71
<b>FIGURA 12:</b> Expressão de transcritos de IL-6 durante a infecção pelo vírus CPXV em MEFs JNK1/2 WT e KO... .....	73
<b>FIGURA 13:</b> Expressão de transcritos mRNA de TNF- $\alpha$ após infecção pelo vírus CPXV em MEFs JNK1/2 WT e KO .....	75

<b>FIGURA 14:</b> Expressão de transcritos de IL-6 após infecção pelo vírus CPXV em células A31 transfectadas com o vetor vazio (pELFIN2) e expressando dominância negativa para c-Jun (DN8cJun). .....	77
<b>FIGURA 15:</b> Multiplicação do CPXV em macrófagos de camundongo .....	79
<b>FIGURA 16:</b> Cinética de fosforilação das MAPKs JNK1/2 durante infecção pelo vírus CPXV em macrófagos de camundongo. ....	80
<b>FIGURA 17:</b> Expressão de transcritos de IL-6 e TNF- $\alpha$ durante infecção pelo vírus CPXV em macrófagos intraperitoniais de camundongo .....	82
<b>FIGURA 18:</b> Expressão de transcritos de IL-6 e TNF- $\alpha$ durante infecção pelo vírus CPXV em células RAW 264.7. ....	85

## **LISTA DE TABELAS**

<b>TABELA 1.</b> Classificação dos Poxvírus de vertebrados.....	23
<b>TABELA 2.</b> Algumas citocinas e suas funções na resposta imune a infecção viral.	41
<b>TABELA 3.</b> Iniciadores utilizados para a avaliação da expressão dos mRNAs de citocinas inflamatórias em MEFs e em macrófagos murinos.....	62

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ATF:** Fator de Ativação Transcricional  
**ATI:** Proteína de Inclusão do Tipo Acidófila  
**BR:** Brighton Red  
**BSA:** Albumina Bovina Sérica  
**CEV:** Vírus Envelopado associado à Célula  
**c-Fos:** Fator de Transcrição c-Fos  
**c-Jun:** Fator de Transcrição c-Jun  
**CPXV:** *Cowpox virus*  
**DMEM:** Meio Mínimo de Eagle, modificado por Dulbecco  
**DN:** Dominante negativo  
**DNA:** Ácido Desoxirribonucléico  
**DTT:** Ditioneitol  
**ECP:** Efeito Citopático  
**EDTA:** Ácido Etilenodiaminotetracético  
**EEV:** Vírus Envelopado Extracelular  
**Egr-1:** Gene de Resposta Precoce ao Crescimento  
**ERK:** Proteína Quinase Ativada por Sinal Extracelular  
**EV:** Vírus envelopado  
**GTPase:** Enzima Hidrolisadora de GTP (Guanosina trifosfato)  
**H.p.i.:** Horas pós-infecção  
**HPRT:** Enzima hipoxantina guanina fosforibosiltransferase  
**HSV:** *Herpes simplex virus*  
**IEV:** Vírus Envelopado Intracelular  
**IFN:** Interferon  
**IL:** Interleucina  
**IMV:** Vírus Maduro Intracelular  
**IRF:** Fator Regulador de Interferon  
**ITR:** Inversões Terminais Repetitivas  
**IV:** Vírus Imaturo  
**JNK:** Proteína Quinase c-Jun amino-terminal  
**Kb:** Kilobases  
**kDA:** Kilodalton

**KO:** “*knockout*” (nocaute)  
**M.O.I:** Multiplicidade de Infecção  
**MAPK:** Proteína Quinase Ativada por Mitógeno  
**MEF:** Fibroblasto Embrionário de Camundongo  
**MPXV:** *Monkeypox virus*  
**mRNA:** RNA Mensageiro  
**MV:** Vírus Maduro  
**PCR :** Reação em Cadeia da Polimerase  
**PBS:** Solução Salina Tamponada com Fosfato  
**PRV:** *Pseudorabies virus*  
**qPCR:** PCR em tempo real  
**RNA:** Ácido Ribonucléico  
**RPM:** Rotações por Minuto  
**SAPK:** Proteína Quinase Ativada por Estresse  
**SDS:** Duodecil Sulfato de Sódio  
**TLR:** Receptor do Tipo Toll  
**TNF:** Fator de Necrose Tumoral  
**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*  
**WR:** Western Reserve  
**WT:** “*Wild type*” (selvagem)  
**WV:** *Wrapped Virions* (Vírus Envelopado Intracelular)

## RESUMO

Os *Orthopoxvirus Vaccinia* (VACV) e *Cowpox* (CPXV) pertencem à família *Poxviridae*, que compreende os maiores e mais complexos vírus animais de DNA, que se replicam exclusivamente no citoplasma de células hospedeiras. Apesar do gênero *Orthopoxvirus* ser o mais estudado da família, pouco ainda se sabe sobre as interações CPXV-células do hospedeiro. Uma vez que essas interações desempenham importante papel na biologia viral, o Grupo de Transdução de Sinal do Laboratório de Vírus (ICB-UFMG) vem estudando, ao longo dos últimos anos, a ativação de proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs) em resposta à infecção pelos *Orthopoxvirus*. Nosso grupo demonstrou previamente que estes *Orthopoxvirus* ativam as proteínas quinases ERK e JNK culminando com a fosforilação e conseqüente ativação do fator de transcrricional c-Jun, um substrato comum de ambas as vias. Entretanto, as MAPKs JNK1/2 não são necessárias para a multiplicação desses vírus, apesar de serem importantes da disseminação do VACV. Sabendo que a produção de citocinas pode ser regulada pela via de JNK durante a infecção por diversos vírus, nós decidimos investigar o papel das MAPKs JNK1/2 na expressão de citocinas pró-inflamatórias após a infecção pelos vírus VACV e CPXV. Primeiramente, através de PCR em tempo real e ELISA, nós demonstramos que a infecção pelo CPXV leva a uma maior indução da expressão e secreção da citocina IL-6, em comparação com o VACV, em células selvagens e nocautes para JNK1/2. Também mostramos que há um aumento significativo da expressão do mRNA de IL-6 nas células KO em relação às WT após a infecção pelo CPXV, principalmente no tempo de 12 hpi. Esse resultado também foi observado em macrófagos de camundongos, através do tratamento com o inibidor farmacológico JNK inh. VIII. Utilizando células dominante negativa para o fator transcrricional c-Jun (DNc-Jun), também foi observado uma maior expressão do mRNA de IL-6 nas células DN em relação às células controle. Resultados preliminares também mostraram que a inibição de JNK1/2 leva a redução da expressão de transcritos da citocina TNF- $\alpha$ , tanto em fibroblastos quanto em macrófagos de camundongo. Em suma, esse trabalho sugere a participação da via JNK/c-Jun na regulação da expressão do mRNA de IL-6 após a infecção pelo CPXV, contribuindo, assim, para um melhor entendimento da complexa relação vírus-hospedeiro.

## ABSTRACT

The Orthopoxviruses *Vaccinia* (VACV) and *Cowpox* (CPXV) belong to the *Poxviridae* family, the largest and more complex animal DNA viruses, whose replication occurs in the cytoplasmic compartment of the infected cells. Even though *Orthopoxvirus* genus is the most studied, little is known about *Orthopoxvirus Cowpox* (CPXV)-host cell interactions. As virus-host cell interaction plays a decisive role in viral biology, the “Grupo de Transdução de Sinal” of the Laboratório de Vírus (ICB-UFMG) have been studying the activation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) in response to Orthopoxviruses infections. Previously, we demonstrated that these Orthopoxviruses activates the protein kinases ERK and JNK leading to the phosphorylation of the transcription factor c-Jun, a common substrate on both signaling pathways. However, JNK 1/2 was not required for proper VACV and CPXV replication, although they are important in VACV dissemination. Since it has been shown that production of cytokine is regulated by JNK 1/2 during the infection with diverse viruses, we sought to investigate the expression of pro-inflammatory cytokines upon VACV and CPXV infection. By means of quantitative reverse transcription-PCR and ELISA, we demonstrated that CPXV infection of wild-type (WT) or JNK 1/2 knock-out (KO) mouse embryonic fibroblasts (MEFs) leads to a higher induction and secretion of IL-6 cytokine than VACV infection. We also showed a significant increase in IL-6 mRNA expression in KO cells when compared to WT MEFs, mainly at 12 hpi. This result was also confirmed with murine macrophages, by using the JNK inhibitor VIII. We also demonstrated an increase in IL-6 mRNA expression in cells infected with CPXV and expressing dominant-negative c-Jun mutation (DNc-Jun), when compared to infected control cells. Preliminary results also showed that JNK1/2 inhibition results in a reduction of the transcriptional expression of TNF- $\alpha$  in MEFs as well as in murine macrophages. Taken together, our data suggest that the JNK/c-Jun pathway exerts a negative regulation of IL-6 mRNA expression upon CPXV infection, leading, thus, to a better understanding of the complex relationship between virus and their host cells.

## I. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

Os vírus são pequenos agentes infecciosos que possuem uma estrutura simples, sendo constituídos basicamente de um genoma, que pode ser de DNA ou RNA, fita simples ou dupla, envolvidos por um arcabouço protéico (capsídeo), podendo ainda ser revestido ou não por um envelope lipídico. Por toda sua simplicidade estrutural e seu reduzido número de genes, os vírus não possuem toda maquinaria biossintética necessária para sua multiplicação, e por isso, são dependentes da célula hospedeira para se multiplicarem, sendo considerados então, organismos intracelulares obrigatórios.

Os Poxvírus, membros da família *Poxviridae*, são vírus grandes e complexos de DNA dupla fita linear, capazes de se replicar no citoplasma de suas células hospedeiras. A família é dividida em duas subfamílias, *Chordopoxvirinae* e *Entomopoxvirinae*, cujos membros infectam, respectivamente, vertebrados e insetos. A subfamília *Chordopoxvirinae* é ainda subdividida em nove gêneros, dentre os quais o mais estudado é o gênero *Orthopoxvirus*. A varíola, cujo agente causador (*Variola virus*) pertence a este gênero, foi a doença infecciosa que provocou o maior número de óbitos já registrado. A doença foi declarada erradicada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 1980, resultado da descoberta do inglês Edward Jenner, o qual observou a existência de proteção cruzada contra a varíola gerada pela inoculação de outro *Orthopoxvirus*, processo que deu origem a vacinação. Ainda hoje, esses vírus continuam sendo alvos de diversas pesquisas que buscam novos agentes antivirais e vacinas mais seguras, devido ao temor da utilização do *Variola virus* como arma biológica.

Além do *Variola virus*, outros *Orthopoxvirus* podem causar infecções eventuais em humanos, como o *Cowpox virus* (CPXV) e o *Vaccinia virus* (VACV), que foram usados nas campanhas de vacinação contra a varíola. O CPXV é um vírus de roedor, endêmico na maioria dos países da Europa e alguns países da Ásia, podendo ser adquirido por humanos através dos roedores ou de outros hospedeiros acidentais como vacas e gatos. O VACV é o protótipo do gênero, porém sua origem e hospedeiros naturais permanecem desconhecidos, embora tenha se detectado a presença do VACV em macacos da Amazônia e roedores silvestres peridomiciliares. Recentemente, no Brasil, têm sido relatados vários surtos de *Vaccinia* bovina causados por vírus relacionados ao *Vaccinia*, com acometimento

também de ordenhadores e danos a economia, sendo este então mais um motivo que torna relevante o estudo da biologia dos Poxvírus.

Os vírus dependem das funções celulares de seus hospedeiros para completarem seu ciclo de multiplicação, e para que isso ocorra da melhor maneira possível, os vírus modificam o meio intracelular de modo a otimizar sua multiplicação e ao mesmo tempo, escapar da resposta imune do hospedeiro contra a infecção viral.

De maneira geral, a resposta antiviral do hospedeiro ocorre em duas fases, sendo a primeira não específica (Resposta Imune Inata), e segunda fase específica (Resposta Imune Adaptativa), sendo ambas essenciais no combate aos vírus. A resposta imune inata compreende interferons, sistema complemento, células natural killer, entre outros fatores, enquanto a resposta imune adaptativa envolve células T e B. Ambas as respostas envolvem a ação de citocinas, que são proteínas regulatórias que medeiam processos essenciais de comunicação intercelular durante a defesa antiviral, sendo amplamente produzidas por células de defesa como dendríticas, macrófagos e linfócitos T, dentre outras. As citocinas podem ser produzidas pelo hospedeiro, tanto em resposta a infecção viral, quanto induzidas pelo vírus, e neste caso, pode favorecer sua patogênese. Os Poxvírus desenvolveram estratégias imunomodulatórias, de forma a evadir a resposta imune do hospedeiro, através de produção de múltiplas proteínas que interferem na indução ou atividade do sistema complemento e das principais citocinas com atividades antivirais.

Assim, os vírus adquiriram mecanismos para manipular as vias sinalizadores celulares responsáveis por regular importantes funções, tais como, proliferação, diferenciação e sobrevivência celulares, incluindo as repostas antivirais como apoptose e produção de citocinas, de forma a criar um ambiente intracelular mais propício a sua multiplicação.

Entre as vias sinalizadoras que regulam importantes processos celulares, destacam-se as vias das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs). Esta é uma via evolutivamente conservada entre os eucariotos e está envolvida no controle de muitos processos fundamentais, que incluem proliferação, sobrevivência, apoptose, diferenciação, metabolismo e motilidade, em resposta a

diversos estímulos extracelulares. Dentre as vias das MAPKs, destaca-se a via das quinases c-Jun amino terminal (JNKs), inicialmente classificada como proteínas quinase ativadas por estresse (SAPKs), mas sendo também um mediador crítico na transdução do sinal em resposta a estimulação por citocinas e alguns fatores de crescimento. Diversos estudos demonstraram o papel de JNK na regulação de processos como sobrevivência celular, apoptose, proliferação e resposta imune. Já foram descritos vários mecanismos pelas quais os vírus, entre os quais os Poxvírus, manipulam a via das MAPKs em prol do seu sucesso multiplicativo e/ou disseminativo.

Na tentativa de melhor entender a interação vírus-hospedeiro, nos últimos anos, o Grupo de Transdução do Sinal da UFMG vem estudando a fundo a ativação e a relevância biológica de vias de sinalização, dentre elas aquela das MAPKs, durante a infecção pelos vírus VACV e CPXV. Foi demonstrado que a via MEK/ERK é ativada pelo VACV e CPXV durante todo o seu ciclo multiplicativo, porém é essencial somente para a multiplicação do VACV. Em outros estudos, observou-se a ativação da via MKK/JNK desde tempos precoces até tempos tardios de infecção por ambos os vírus, entretanto, apesar dessa via não ser essencial para a multiplicação desses vírus, observa-se uma desorganização acentuada nas redes de microtúbulos e actina após a infecção pelo VACV, levando a uma desregulação da liberação de partículas envelopadas. Foram também observadas as ativações de importantes fatores de transcrição, como c-Fos, Egr-1 e c-Jun, após a infecção por estes vírus.

PEREIRA e LEITE, em suas teses de doutorado, tentaram avaliar se as MAPKs JNK1/2 estariam envolvidas na resposta celular antiviral, através da análise da indução das citocinas IL-6, IL-10 e TNF- $\alpha$  em células selvagem e nocaute para estas quinases infectadas pelo VACV. Porém os resultados não foram conclusivos e permanece a hipótese de que um dos papéis de JNK durante a infecção pelos *Orthopoxvirus* seria a imunomodulação das respostas do hospedeiro, uma vez que já foi observada a indução da produção de citocinas regulada pela via de JNK durante a infecção por diversos vírus. Sabe-se que o VACV e o CPXV ativam essas quinases durante a infecção e estudos demonstraram que a infecção de fibroblastos humanos com o *Vaccinia virus* linhagem WR, induz a transcrição e a conseqüente

secreção de IL-6 e de IL-1 $\beta$ , sugerindo que estas citocinas possuem um importante papel na patogênese deste vírus.

Deste modo, este trabalho buscou um melhor entendimento da contribuição das proteínas quinases JNK1/2 na expressão de citocinas inflamatórias durante a infecção pelos *Orthopoxvirus Vaccinia* e *Cowpox*, de maneira que possamos continuar esclarecendo alguns fatores que tecem essa complexa interação entre vírus e célula hospedeira.

## II. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1. Os Poxvírus

#### 1.1. Histórico e Perspectivas

Os Poxvírus foram de grande importância no surgimento e desenvolvimento da imunologia e vacinologia, criadas dois séculos atrás pelos estudos científicos do inglês Edward Jenner na prevenção da varíola (HILLEMAN, 2000).

A varíola, causada pelo *Variola virus* (VARV), foi uma grande pandemia que matou centenas de milhares de pessoas desde o primeiro surto registrado no Egito Antigo, cerca de 3000 anos atrás, até sua extinção, sendo aproximadamente 500 milhões de óbitos só no século passado. Após a campanha de vacinação em massa da Organização Mundial de Saúde, o último caso de varíola foi diagnosticado em 1977, na Somália, sendo 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. O Dr. Edward Jenner notou que ordenhadores que entravam em contato com vacas acometidas de Varíola bovina (ocasionada pelo *Cowpox virus* - CPXV - outro *Orthopoxvirus*) permaneciam protegidas 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).

No dia 14 de maio de 1796, Jenner inoculou o CPXV, isolado da mão infectada de uma ordenhadora, em James Phipps, um menino de 8 anos, e posteriormente, desafiou o menino com o VARV, demonstrando que o garoto era resistente a varíola (MOSS, 1996). Esse novo processo ficou conhecido como vacinação (do latim, *vacca*), e com esta realização singular, foram poupadas as vidas de cerca de 60 a 100 milhões de indivíduos que poderiam morrer de varíola (McFADDEN, 2010).

Durante o século XIX, o uso da vacina de Jenner contra a varíola se espalhou pelo mundo. As amostras de vírus vacinais eram obtidas inicialmente de crostas de lesões em vacas ou cavalos e eram mantidas por vacinação braço a braço ou por inoculação em bezerros, até o desenvolvimento da vacina liofilizada, em 1950.

Curiosamente, 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 vetor oncolítico e para expressão de proteínas recombinantes (MOSS, 1996; FENNER, 2000; MOSS, 2007).

Muitos fatores ajudaram na erradicação da varíola, e o principal deles é o fato do VARV ser restrito apenas a espécie humana, não possuindo reservatórios animais conhecidos (McFADDEN, 2004; BULLER & BRAY, 2004). Após a OMS declarar a varíola erradicada, as campanhas de vacinação foram interrompidas, exceto para trabalhadores de laboratório e membros das forças armadas de alguns países. Hoje, somente dois centros de pesquisa no mundo possuem amostras deste vírus: o CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*, EUA) e o Instituto Vektor (*State Research Center of Virology and Biotechnology*, Rússia) (McFADDEN, 2010).

A varíola foi erradicada, porém os estudos sobre os Poxvírus continuam sendo relevantes, principalmente se considerarmos que com a interrupção da campanha de vacinação, as gerações não vacinadas e indivíduos imunocomprometidos são altamente susceptíveis a infecções causadas por esses vírus. 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).

Destaca-se ainda a re-emergência de zoonoses humanas causadas por Poxvírus, como em 2003, quando ocorreu um surto de monkeypox em humanos nos EUA, a qual foi decorrente da importação de roedores africanos 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 (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). Casos de infecção pelo CPXV também tem sido reportados, 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, sendo que em 7 destes casos o CPXV foi transmitido de ratos infectados adquiridos de diferentes pet-shops da cidade que possuíam o mesmo fornecedor (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, da imunologia e de sua patogênese (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* é ainda subdividida em nove gêneros (TABELA 1), e a família *Entomopoxvirinae* é ainda subdividida em três gêneros (MOSS, 2007; ICTV, 2009).

Dentro da subfamília *Chordopoxvirinae*, o gênero mais bem estudado é *Orthopoxvirus*, e diversos vírus pertencentes a este gênero são capazes de infectar seres humanos, incluindo o *Variola virus*, que foi erradicado em 1977; o *Vaccinia virus*, que foi utilizado na campanha de vacinação contra a varíola; o *Monkeypox virus*, que circula principalmente em animais selvagens da África; e o *Cowpox virus*,

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, 2007; 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 seu hospedeiro natural (SMITH & LAW, 2004; MOSS, 2007), 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 dentre os animais.

Sobre o CPXV, é importante também destacar que apesar de ser uma infecção rara em humanos, ela é uma doença de pele potencialmente fatal, sendo transmitida somente por contato direto com lesões de pele de animais infectados. Normalmente as infecções humanas são adquiridas de gatos domésticos, e não se conhece nenhum caso de transmissão entre pessoas, entretanto auto-inoculação pode ocorrer raramente (BAXBY *et al.*, 1994; BAXBY *et al.* 1997; VOGEL *et al.*, 2011). Acredita-se que o CPXV seja o vírus ancestral dos *Orthopoxvirus* e recentemente, foi sugerida a reclassificação de algumas amostras desse vírus como espécies diferentes (CARROLL *et al.*, 2011; SCHATZMAYR *et al.*, 2011).

Dentre todos os Poxvírus, somente o *Variola virus* e o *Molluscum contagiosum virus* (gênero *Molluscipoxvirus*) infectam somente humanos, uma vez que não são conhecidos outros reservatórios destes vírus na natureza. Entretanto, outros Poxvírus, além dos *Orthopoxvirus* citados acima, podem causar infecções eventuais em humanos, sob a forma de zoonoses, como alguns *Parapoxvirus* e *Tanapox virus* (LEWIS-JONES, 2004; DAMON, 2007).

**TABELA 1 - Classificação dos Poxvírus de vertebrados** - A família *Poxviridae*, subfamília *Chordopoxvirinae*, apresenta 9 gêneros, sendo uma espécie, *Squirrel poxvirus*, ainda não classificada em gênero (não estabelecido). Fonte: ICTVdb/2009.

<b>Família: <i>Poxviridae</i></b>	<b>(2 subfamílias)</b>
<b>Subfamília: <i>Chordopoxvirinae</i></b>	<b>(9 gêneros)</b>
Gênero: <i>Avipoxvirus</i>	(10 espécies)
Gênero: <i>Capripoxvirus</i>	(3 espécies)
Gênero: <i>Cervidpoxvirus</i>	(1 espécie)
Gênero: <i>Leporipoxvirus</i>	(4 espécies)
Gênero: <i>Molluscipoxvirus</i>	(1 espécie)
Gênero: <i>Orthopoxvirus</i>	(9 espécies)
Gênero: <i>Parapoxvirus</i>	(4 espécies)
Gênero: <i>Suipoxvirus</i>	(1 espécie)
Gênero: <i>Yatapoxvirus</i>	(2 espécies)
Gênero: <i>Não estabelecido</i>	(1 espécie)
<b>Subfamília: <i>Entomopoxvirinae</i></b>	<b>(3 gêneros)</b>

## 2. Aspectos Gerais da Biologia dos Poxvírus

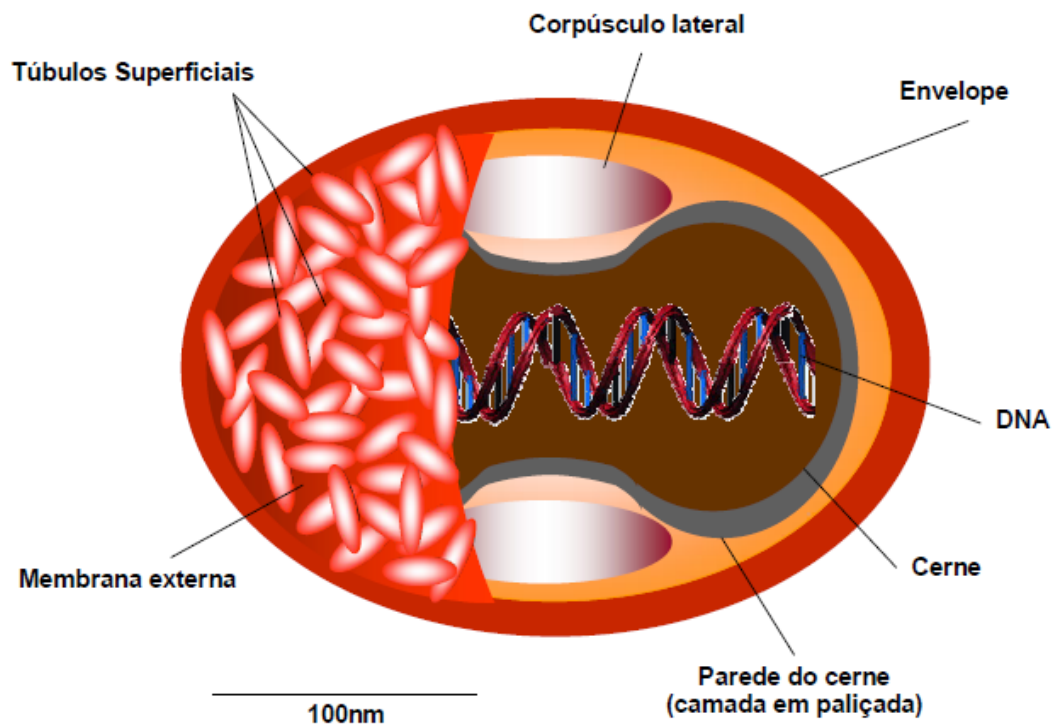
### 2.1. Morfologia

Os Poxvírus 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 lipídeos e proteínas tubulares externas, uma membrana, um cerne, que contém o genoma, e dois corpúsculos laterais, de composição química e função ainda desconhecidas (FIGURA 1) (MOSS, 2007).

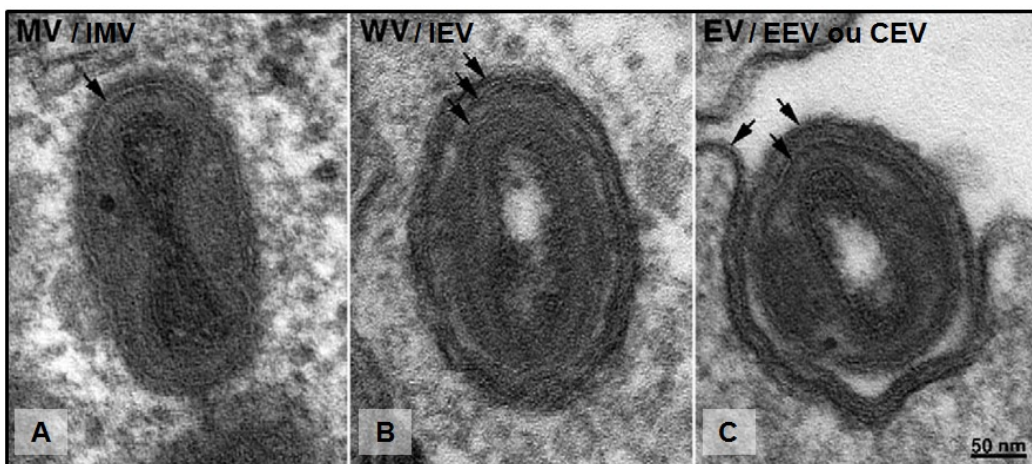
Algumas formas virais apresentam ainda uma membrana adicional, denominada envelope, sendo este o componente mais externo do vírus. Assim, podem ser distinguidas três partículas virais (FIGURA 2): o MV (vírus maduro), o WV (vírus envelopado intracelular) e o EV (vírus extracelular), segundo nomenclatura recente proposta por MOSS (2006).

O MV possui uma única membrana e constitui a maior parte da progênie viral, sendo liberado somente quando ocorre a lise celular. O WV consiste de MVs circundados por duas bicamadas lipídicas adicionais derivadas do complexo de Golgi e é encontrado intracelularmente. O EV consiste do WV exocitado, podendo ser encontrado tanto aderido à superfície celular (anteriormente denominada CEV – vírus envelopado aderido à célula), quanto livre no meio extracelular (anteriormente denominada EEV – vírus envelopado extracelular) (MOSS, 2006; CONDIT *et al.*, 2006).

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 quatro grandes polipeptídios em uma estrutura denominada nucleossoma. (SODEIK & KRIJNSE-LOCKER, 2002).



**FIGURA 1 - Morfologia da partícula viral dos *Orthopoxvirus*.** Esquema representativo da partícula EV 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.



**FIGURA 2: Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão das três formas virais do VACV.** (A) MV (vírus maduro) ou IMV (vírus maduro intracelular) - a seta aponta a única membrana desta partícula. (B) WV ou IEV (vírus envelopado intracelular) - a seta mais interna apontando a membrana do IMV e as outras duas, as membranas resultantes do envelopamento. (C) EV (vírus extracelulares) ou EEV (vírus envelopado extracelular) e CEV (vírus envelopado associado à célula) - uma seta indicando a membrana externa do IEV, que se fundiu à membrana plasmática, e as outras duas setas, a membrana interna remanescente do IEV (envelope) e a membrana do IMV. Fonte: modificado de MOSS, 2006.

## 2.2. Genoma

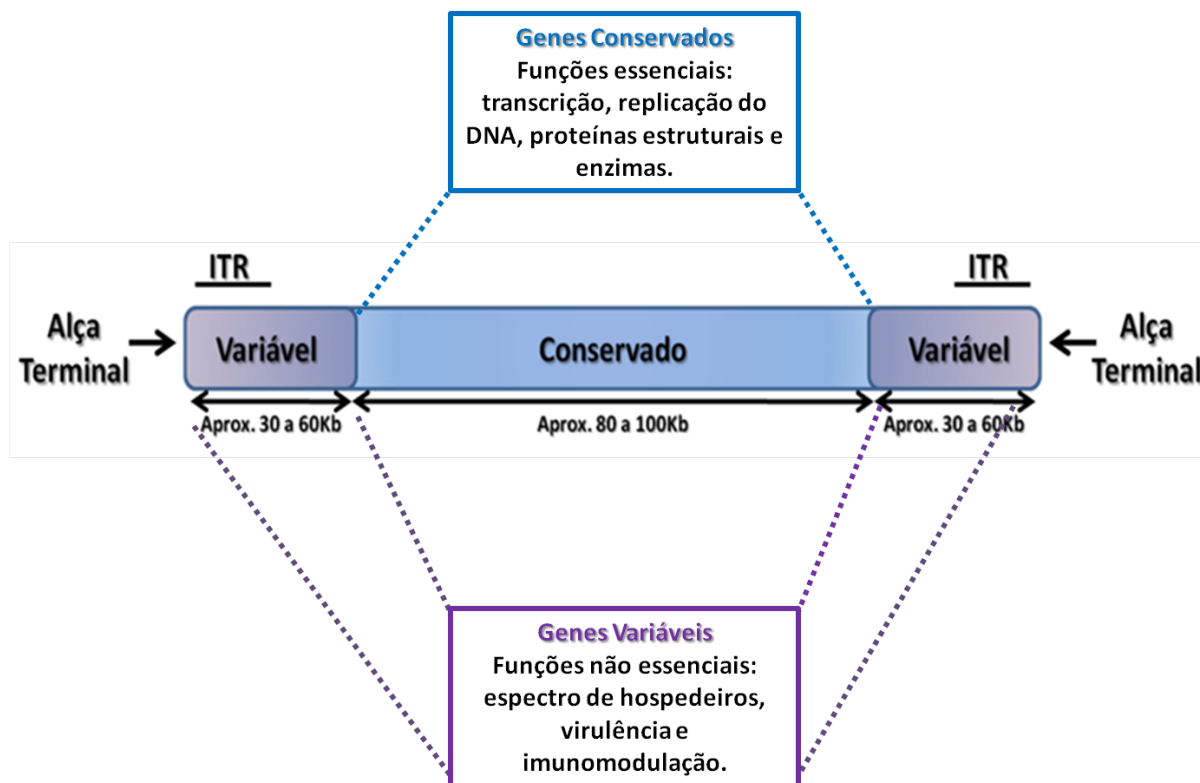
Como dito anteriormente, os Poxvírus possuem genoma de DNA dupla fita linear, com o tamanho variando entre 134 kb nos Parapoxvírus até mais que 300 kb em alguns Avipoxvírus, sendo de 200 kb para o VACV e 220 kb para o CPXV, contendo aproximadamente 200 genes. As extremidades das duas fitas de DNA são 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, 2007).

Em todos os Poxvírus, o genoma possui seqüências terminais repetidas e invertidas (ITRs), de aproximadamente 12 kb, sendo estas idênticas, mas com orientações opostas. Muitos genes dessas regiões terminais são relacionados à interação vírus-hospedeiros, tais como proteínas que inibem processos antivirais, entre elas apoptose, apresentação e reconhecimento de antígenos e funções dos interferons (LEFKOWITZ *et al.*, 2006; MOSS, 2007).

Seqüências completas de genomas de vários Poxvírus estão disponíveis, pelo menos de um membro de cada gênero da subfamília *Chordopoxvirinae*. Como características gerais da organização destes genomas pode se citar que as ORFs não apresentam sobreposições nem íntrons e que os genes localizados na região central do genoma (cerca de 90 genes) são altamente conservados entre os Poxvírus e geralmente estão relacionados com funções essenciais para a replicação e montagem da partícula viral. Já os genes localizados nas extremidades do genoma são mais variáveis e relacionados a funções consideradas não essenciais, tais como espectro de hospedeiros, virulência e imunomodulação (FIGURA 3) (CONDIT & NILES, 2002; SMITH & McFADDEN, 2002, MOSS, 2007).

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 leitura 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, 2007).



**FIGURA 3: Representação esquemática do genoma dos Poxvírus.** 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 Poxvírus**

Diferentemente dos outros vírus de genoma DNA, que possuem seu ciclo multiplicativo no compartimento nuclear das células infectadas, o ciclo de multiplicação dos Poxvírus acontece totalmente no citoplasma das células hospedeiras. O ciclo mais bem estudado é o do VACV, mas as características essenciais são bastante conservadas entre os outros Poxvírus (FIGURA 4) (McFADDEN, 2005).

### **2.3.1. Adsorção e penetração**

O ciclo de replicação do VACV é uma complexa cascata de eventos que começa com a adsorção da partícula viral à superfície celular e subsequente fusão da membrana viral e da membrana celular. Duas partículas infecciosas podem iniciar o ciclo de multiplicação, o MV e o EV, se ligando a diferentes receptores celulares, ainda desconhecidos. Ambas as partículas possuem diferentes glicoproteínas na superfície viral e penetram na célula de modos diferentes (McFADDEN, 2005; ROBERTS & SMITH, 2008).

Existem evidências de que proteínas de superfície do MV podem facilitar a adesão do VACV à célula hospedeira através da ligação às glicosaminoglicanas (GAGs) celulares e que esta interação possui um importante papel na adsorção viral (SMITH *et al.*, 2003). As proteínas A27 e H3 se ligam ao sulfato de heparina e a D8 se liga ao sulfato de condroitina. Entretanto, essa ligação não é essencial para que ocorra a penetração e parece ser dependente do tipo celular (MOSS, 2007). Recentemente também foi demonstrado que glicosfingolipídios são importantes para a infectividade do VACV, sugerindo a participação dessas moléculas como um receptor celular alternativo para a ligação desse vírus (PERINO *et al.*, 2011). Quanto à partícula EV, só existem evidências indiretas de que proteínas virais de envelope se liguem a receptores celulares (SMITH *et al.*, 2003).

Sobre o mecanismo pelo qual ocorre a penetração do VACV, acredita-se que ocorra a fusão entre a membrana externa do MV e a membrana celular, independente de pH, com a liberação do cerne no citoplasma da célula hospedeira (MOSS, 2006). Este processo, denominado desnudamento primário, não é afetado por inibidores de transcrição ou de síntese protéica. Após entrar no citoplasma, o

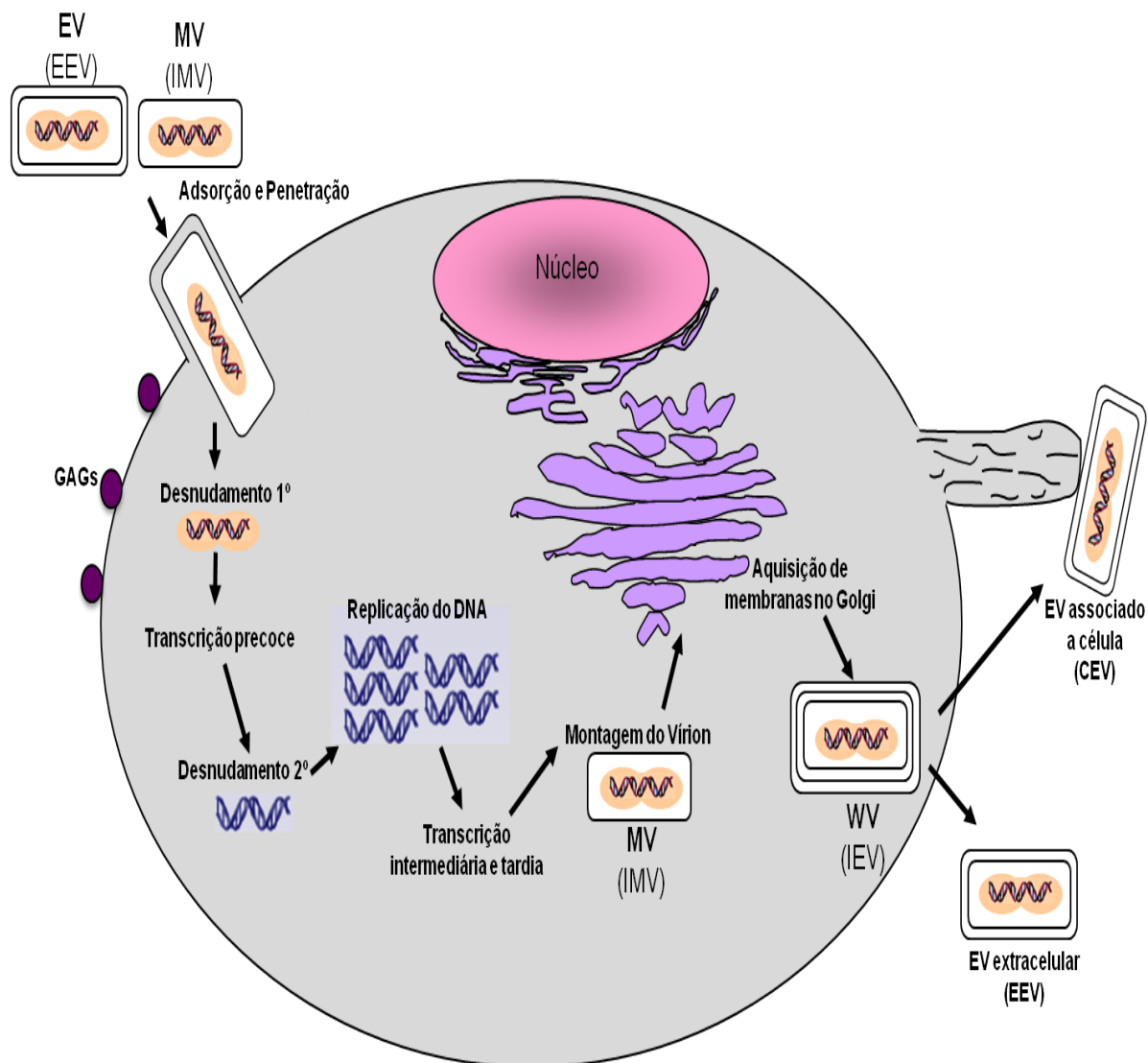
cerne viral é transportado da periferia celular, através de microtúbulos, até o local onde é iniciada a síntese de mRNA virais (MOSS, 2007).

Diferentemente, a penetração do EV ocorreria através de endocitose, sendo necessária a acidificação dos vacúolos endocíticos para romper a membrana externa do EV. Uma vez exposta, ocorreria a fusão da membrana com a vesícula endocítica e a posterior liberação do cerne no citoplasma da célula hospedeira (MOSS, 2006; ROBERTS & SMITH, 2008, SCHMIDT *et al.*, 2011).

Recentemente, dois estudos corroboraram a via endocítica como sendo aquela utilizada pelo EV durante o processo de penetração, apesar de discordarem quanto ao exato mecanismo pelo qual isto ocorreria. Ambos os estudos mostraram que o EV liga-se a protrusões citoplasmáticas ou filopódios e desloca-se via actina até o corpo celular, onde é internalizado por endocitose, independente da via mediada por clatrina ou cavéola (HUANG *et al.*, 2008), ou por macropinocitose (MERCER & HELENIUS, 2008; SCHMIDT *et al.*, 2011).

Diante de todos esses resultados, é provável que mais de uma via de penetração seja utilizada, dependendo tanto da linhagem viral quanto do tipo celular. Importante ressaltar que a fusão é mediada por um grupo de proteínas da membrana do MV que, por sua vez, são conservadas em todos os Poxvírus. Dessa maneira, supõe-se que o mecanismo de entrada seja comum a todos os membros da família *Poxviridae* (MOSS, 2006; ROBERTS & SMITH, 2008; WHITEBECK *et al.*, 2009).

Existem evidências de que a adsorção/penetração do VACV é associada a eventos rápidos de sinalização de diversas cascatas de proteínas quinases do hospedeiro, e é provável que esses eventos possam influenciar nos estágios subsequentes da replicação viral (McFADDEN, 2005).



**FIGURA 4: Esquema Representando o Ciclo de Multiplicação dos Poxvírus.** As duas formas infectivas dos Poxvírus, o vírus extracelular (EV) e o vírus maduro (MV) iniciam o seu ciclo ao se ligarem e penetrarem na célula, ocorrendo o desnudamento primário. Ainda no cerne, ocorre a transcrição de genes precoces e após a síntese destas proteínas ocorre o desnudamento secundário e a conseqüente liberação do DNA no citoplasma. Após a replicação deste DNA, ocorre a transcrição dos genes intermediários e tardios. Finalmente, tem-se a montagem do vírus que são liberados na sua maioria através da lise celular (MV). Parte dos MVs adquire duas camadas de membrana adicionais, derivadas das cisternas trans-Golgi (WV) e são liberadas em processos que são dependentes de actina (CEV) ou independente da mesma (EEV), constituindo ambos os vírus extracelulares (EVs). *Ver texto para detalhes.* Fonte: adaptado de SLIVA & SCHNIERLE, 2007.

### **2.3.2. Expressão gênica**

Semelhante ao que ocorre nos Herpesvírus, 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, 2007).

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, 2007).

Em seguida, ocorre o desnudamento secundário, com a degradação das nucleoproteínas que constituem o cerne e a conseqüente liberação do DNA viral no citoplasma da célula hospedeira, que funciona como molde para a replicação do genoma e subseqüentes estágios de transcrição. Ao contrário da transcrição precoce, que está somente sob o controle de fatores transcricionais virais, os estágios de transcrição intermediária e tardia exigem cooperação dos fatores de transcrição do hospedeiro para uma expressão gênica eficiente (McFADDEN, 2005).

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, fatores de transcrição dos genes precoces, além de proteínas envolvidas na morfogênese e evasão imune (CONDIT & NILES, 2002; MOSS, 2007).

### **2.3.3. Replicação do genoma**

A replicação do genoma dos Poxvírus ocorre no citoplasma das células hospedeiras, até mesmo em células anucleadas, iniciando-se entre 1 e 2 horas após a infecção e gerando cerca de 10.000 cópias do genoma por célula, das quais metade serão empacotadas na progênie viral (MOSS, 2007).

A liberação do DNA viral no citoplasma ocorre apenas após a síntese das proteínas precoces, sem a qual não há o desnudamento do cerne. Os sítios

citoplasmáticos aonde ocorrem a replicação do DNA e montagem das partículas virais são denominados “fábricas virais”, sendo áreas do citoplasma eletrondensas à microscopia eletrônica (MOSS, 2007). Os Poxvírus codificam todas as proteínas essenciais para replicação de DNA viral.

O modelo clássico da replicação do DNA dos Poxvírus envolve a clivagem da estrutura em forma de grampo presente na extremidades do DNA, sendo que a extremidade 3' OH dentro da alça terminal serve como iniciadora da replicação e alongação da cadeia de DNA pela polimerase viral. A replicação do DNA então leva à formação de concatâmeros, que são posteriormente resolvidos em moléculas maduras de DNA (MOSS, 2007; BEAUD, 1995). Entretanto, este modelo está em discussão devido a recente descoberta de uma proteína viral (D5) com atividade de DNA primase (DE SILVA *et al.*, 2007; DE SILVA *et al.*, 2009). Assim, propõem-se um novo modelo na qual existiria a síntese de iniciadores de RNA pela proteína D5, ao invés da clivagem da extremidade do DNA viral.

#### **2.3.4. Morfogênese e liberação das partículas virais**

A formação da progênie viral é iniciada nas “fábricas virais”. As primeiras estruturas distintas morfologicamente são as chamadas crescentes, compostas de lipídeos e proteínas virais. As crescentes aumentam de tamanho, adquirem forma circular, tornando-se os virions imaturos (IV), que possuem componentes do cerne viral (MOSS, 2007; ROBERTS & SMITH, 2008).

Em seguida, ocorre a transição de IV para vírus maduros (MV). Nesse processo, há o empacotamento do genoma viral e a clivagem proteolítica das proteínas do cerne, com conseqüente mudança da forma da partícula, de circular para o formato de tijolo. Os MVs de alguns poucos Poxvírus, como o *Cowpox*, ficam retidos dentro de corpúsculos de inclusão do tipo acidófilos (ATI), que são estruturas protéicas bem definidas e grandes. Para a maior parte de progênie viral, a morfogênese se encerra nesse ponto, e os MVs são liberados somente após a lise da célula (MOSS, 2007; ROBERTS & SMITH, 2008).

Alguns MVs deixam as fábricas virais em um processo que envolve o transporte em microtúbulos, e são transportados até o centro organizador de microtúbulos (MTOC), onde adquirem duas membranas adicionais da rede do trans-

Golgi ou de endossomos, formando os WVs (McFADDEN, 2006; SMITH & LAW, 2004). Sabe-se que as proteínas A27 do MV e B5 e F13 do WV são essenciais para a formação dessas partículas envelopadas. As partículas WV são então transportadas até a periferia celular, também através de microtúbulos, com participação das proteínas virais A36 e F12 (ROBERTS & SMITH, 2008).

Quando atingem a superfície celular, a membrana externa dos WVs se funde a membrana plasmática da célula formando os EVs (vírus extracelulares). Algumas partículas dos EVs podem ser liberadas no meio extracelular como EEV (vírus envelopado extracelular), enquanto outras permanecem aderidas à superfície celular, sendo denominadas CEV (vírus envelopado associado à célula). Os CEVs são então propulidos em direção a células vizinhas pela indução da formação de caudas de actina pelos vírions. O balanço entre a formação de EEVs e CEVs depende tanto da célula hospedeira quanto da linhagem do vírus (SMITH & LAW, 2004; McFADDEN, 2005; ROBERTS & SMITH, 2008). Recentemente, também foi proposto a participação da molécula fosfoinositídeo 5 –fosfatase SHIP2 associada a proteínas viral A34 na regulação da disseminação desses vírus, aparentemente inibindo a liberação dos EEVs (McNULTY *et al.*, 2011).

Sendo assim, o VACV pode ser disseminado de diversas maneiras: (i) disseminação célula a célula dos MVs, após a lise celular; (ii) disseminação célula a célula através dos CEVs presentes nas caudas de actina; (iii) disseminação célula a célula ou (iv) para células distantes, dos EEVs. Os EEVs são os mais importantes na disseminação viral dentro do hospedeiro (SMITH & LAW, 2004; McFADDEN, 2005; ROBERTS & SMITH, 2008).

### 3. Resposta Imune contra os Poxvírus

De maneira geral, a resposta antiviral do hospedeiro é bifásica, com efetores inatos tais como interferons (IFNs), células natural killer (NK) e macrófagos na primeira fase, e resposta adaptativas específicas das células T e B numa segunda fase. Ambas as fases são essenciais no reconhecimento e combate de patógenos (HAGA & BOWIE, 2005).

Em relação aos Poxvírus, ainda não se tem grande conhecimento de como hospedeiros humanos e animais respondem a infecção por esses vírus. Grande parte dos dados são gerados através da infecção de camundongos pelo VACV e mostram que tanto a resposta imune humoral como a celular, possuem funções essenciais na geração de proteção contra infecções por *Orthopoxvirus* (XU *et al.*, 2004; PUTZ *et al.*, 2006).

#### 3.1. Resposta Imune Inata

A resposta imune inata, ou não específica, é a primeira linha de defesa contra as infecções virais e responsável por iniciar a resposta imune adaptativa (específica), através da produção de citocinas e da estimulação do processo de inflamação. A inflamação corresponde a uma reação inespecífica contra estímulos nocivos, como toxinas e patógenos, e é caracterizada por dor, vermelhidão, calor e inchaço no sítio de infecção. Os mediadores da inflamação são as citocinas, que uma vez produzidas por células infectadas, recrutam leucócitos, tais como macrófagos e neutrófilos, para o local da inflamação, onde é criado um microambiente que impede a disseminação viral. A inflamação é um dos aspectos mais importantes da defesa do hospedeiro contra microrganismos invasores, mas pode também auxiliar na patogênese, uma vez que a resposta inflamatória é capaz de levar a danos adicionais o tecido do hospedeiro (FLINT *et al.*, 1999; MADIGAN *et al.*, 2004; AKIRA, 2011).

Os macrófagos possuem uma importante função como células apresentadoras de antígeno (APC) na ativação de células T e no início da resposta imune específica. Os camundongos que tiveram seus macrófagos deletados são incapazes de controlar a infecção pelo VACV por deficiência na apresentação de antígeno. Além disso, células presentes no infiltrado inflamatório secretam citocinas

inflamatórias e antivirais, tais como fator de necrose tumoral (TNF) e interferons (IFNs) (FLINT *et al.*, 1999; SEET *et al.*, 2003).

Os IFNs constituem um grupo de proteínas secretadas que induzem o estado antiviral em células infectadas ou não infectadas. Existem três classes de IFNs, sendo todas cruciais contra a infecção pelos Poxvírus. Entretanto, a secreção de IFN tipo I ( $\alpha/\beta$ ) constituem o mecanismo antiviral chave do sistema imune inato. Esse sistema emprega diversos receptores de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), tais como receptores do tipo Toll, RIG-I e MDA5 que detectam infecções através de moléculas únicas produzidas por vírus, como por exemplo RNA dupla-fita. A sinalização desencadeada pela ativação desses receptores levam a produção de IFN, e conseqüentemente, a indução de um estado antiviral induzido por IFN. A maioria das células pode ser estimulada a produzir IFN tipo I, sendo as células dendríticas as principais produtoras dessa citocina. Essas células também possuem funções tais como apresentação de antígeno e estimulação de células T (BARCHET *et al.*, 2005; HAGA & BOWIE, 2005; TANTILIPKORN & AUEWARAKU, 2011).

Células NK são atraídas aos sítios de infecção em parte pela resposta inflamatória. Essas células possuem uma ação citotóxica contra células infectadas pelo VACV *in vitro* e sua deleção *in vivo* está associada ao aumento da virulência deste vírus. A apoptose é um processo natural e complexo que ocorre em resposta a uma variedade de estímulos, e pode ser considerada parte da resposta imune inata, uma vez que a infecção viral pode induzir a apoptose. Esse processo também é utilizado contra os Poxvírus (FLINT *et al.*, 1999; HAGA & BOWIE, 2005).

### **3.2. Resposta Imune Adaptativa**

A resposta imune adaptativa compreende a resposta humoral e a resposta celular. A resposta imune humoral está envolvida na erradicação de microrganismos presentes no sangue e fluídos, através da geração de anticorpos, enquanto a resposta imune celular é responsável pela erradicação de microrganismos presentes dentro de células, sendo mediada pelas células T. A linhagem de linfócitos T é diferenciada em células T citotóxicas e células T helper (Th), pela presença de antígenos de superfície (CD), sendo as células Th contendo o antígeno CD4+ e as células T citotóxicas o antígeno CD8+. As células T CD8+

desempenham um importante papel no controle das infecções virais. Após sua ativação, essas células têm papel na eliminação direta das células infectadas, além de secretarem citocinas que inibem a multiplicação viral e fatores que recrutam outras células do sistema imune. Posteriormente a resposta mediada pelas células T, as células B produzem anticorpos (resposta humoral) capazes de neutralizar as partículas virais (FANG *et al.*, 2005; PRECOPIO *et al.*, 2007; AKIRA, 2011)

A resposta humoral mostrou-se tendo um papel principal na proteção contra os *Orthopoxvirus* em estudos em modelos animais. Já a resposta imune celular mediada pelas células T CD8+ previne a mortalidade e medeia a recuperação do hospedeiro durante a infecção primária. Acredita-se que tanto células T CD4+ como células CD8+ apresentam papéis importantes e complementares na eliminação de uma infecção aguda por *Orthopoxvirus* (PUTZ *et al.*, 2007). Recentemente, GOMES e colaboradores (2012) analisaram a resposta imune celular de pacientes infectados agudamente pelo VACV em surtos zoonóticos no Brasil. Seus resultados mostraram que há uma menor quantidade e menor ativação de células B, e que apesar de presentes, células T CD4+ são também menos ativadas, assim como monócitos e macrófagos, nos pacientes infectados em comparação com os não infectados. Resultados similares também foram observados em camundongos Balb/C infectados experimentalmente com amostras do VACV isoladas desses surtos, mostrando que esse vírus é capaz de modular as células do sistema imune durante a infecção aguda em humanos.

### **3.3. Citocinas**

Para que as células do sistema imune sejam ativadas, elas devem se comunicar, e esse processo é mediado por proteínas solúveis denominadas citocinas. Citocinas são proteínas regulatórias de baixo peso molecular produzidas por diferentes tipos celulares, principalmente macrófagos e linfócitos T, em resposta a diferentes estímulos, como agentes infecciosos, tumores ou estresse. As citocinas modulam a comunicação entre as células do sistema imunológico entre si, ou entre células do sistema imune e células somáticas. (ABBAS, 2007; BAK & MIKKELSEN, 2010)

Apesar das citocinas serem estruturalmente diversas, elas compartilham muitas propriedades, tais como: (i) a ação das citocinas é geralmente pleiotrópica,

ou seja, uma citocina pode agir em diferentes tipos celulares; (ii) a ação das citocinas é geralmente redundante, ou seja, diferentes citocinas podem exercer a mesma função; (iii) citocinas geralmente influenciam a síntese e ação de outras citocinas; e (iiii) as citocinas exercem suas atividades pela ligação a receptores específicos e ativação da expressão gênica em células que contêm esses receptores. Muitas vias transmitem os sinais que desencadeiam a produção de citocinas, entre elas, a via das MAPKs (FLINT *et al.*, 1999; PRADERVAND *et al.*, 2006; ABBAS *et al.*, 2007).

Diversas citocinas são conhecidas, entre elas diferentes tipos de interleucinas, quimiocinas (que são citocinas quimioatrativas de células) e IFNs. Quanto as suas ações biológicas, as citocinas podem ser mediadoras e reguladoras da imunidade inata e da imunidade adaptativa, além de estimuladoras da hematopoiese (ABBAS *et al.*, 2007). As citocinas participam de quase todas as etapas da resposta a infecção viral, incluindo o controle da inflamação e a indução do estado antiviral das células. As citocinas com papel na inflamação podem ser divididas em: 1) citocinas pró-inflamatórias: TNF (Fator de Necrose Tumoral)- $\alpha$ , interleucina (IL)-6 e IFN (interferon)- $\gamma$ , que induzem as respostas inflamatórias agudas e crônicas; 2) quimiocinas: MIP (Proteína Inflamatória de Macrófagos) -1 $\alpha$ , RANTES (Regulated on Activation, Normal T Expressed and Secreted), as quais estão envolvidas na quimiotaxia de leucócitos, e MIC-1 (Proteína-1 Quimioatrativa de Macrófagos) está envolvida na quimiotaxia de monócitos; e 3) citocinas anti-inflamatórias: IL-4 e IL-10, que limitam a magnitude e a extensão da inflamação (DINARELLO, 2000; PRADERVAND *et al.*, 2006; ABBAS *et al.*, 2007).

As funções resumidas das citocinas estudadas neste trabalho estão na TABELA 1. IL-6 foi originalmente identificada como um fator de diferenciação de células B, mas hoje sabe-se que IL-6 é uma citocina multifuncional que regula tanto a resposta imune quando a hematopoiese. IL-6 possui um papel crítico na diferenciação celular, bem como pode estar envolvida em processos relacionados a produção de anticorpos por células B, diferenciação de células T citotóxicas, entre outras (AKIRA *et al.*, 1990; HIRANO, 1991; KISHIMOTO *et al.*, 1992; ABBAS *et al.*, 2007). TNF- $\alpha$  é outra importante citocina pró-inflamatória, que tem papel na regulação da diferenciação celular, proliferação e morte, bem como nas respostas

imune inata e adaptativa, estando envolvida em uma ampla variedade de doenças humanas (QIDWAI & KHAN, 2011).

A produção de citocinas pode ocorrer tanto por indução viral, quanto em resposta a infecção viral. Como resposta a infecção viral, foi relatada uma potente atividade antiviral de diversas citocinas tais como, IL-2, IL-12, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  em caso de infecção de camundongos pelo VACV. Em contraste, a expressão de IL-4 mostrou aumentar a virulência do VACV. Camundongos nocautes para as citocinas IFN- $\gamma$ , IFN  $\alpha/\beta$  e IL-6 foram altamente susceptíveis a infecção por Poxvírus (RAMSHAW *et al.*, 1997).

No caso da produção de citocinas induzidas pela infecção viral, ROKITA e colaboradores (1998), demonstraram que a infecção de fibroblastos humanos com o *Vaccinia virus* linhagem WR induz a transcrição e a conseqüente secreção de IL-6 e de IL-1 $\beta$  e, dessa maneira, sugeriram que estas citocinas possuem um importante papel na patogênese deste vírus. Posteriormente, mostrou-se que o *Variola virus* induz a secreção de concentrações elevadas de IL-6, IL-8 e IFN- $\alpha/\beta$  associadas a disseminação viral exacerbada, em infecção experimental de macacos (JAHRLING *et al.*, 2004).

**TABELA 2. Algumas citocinas e suas funções na resposta imune a infecção viral.**

Fonte: adaptado de FLINT *et al.*, 1999

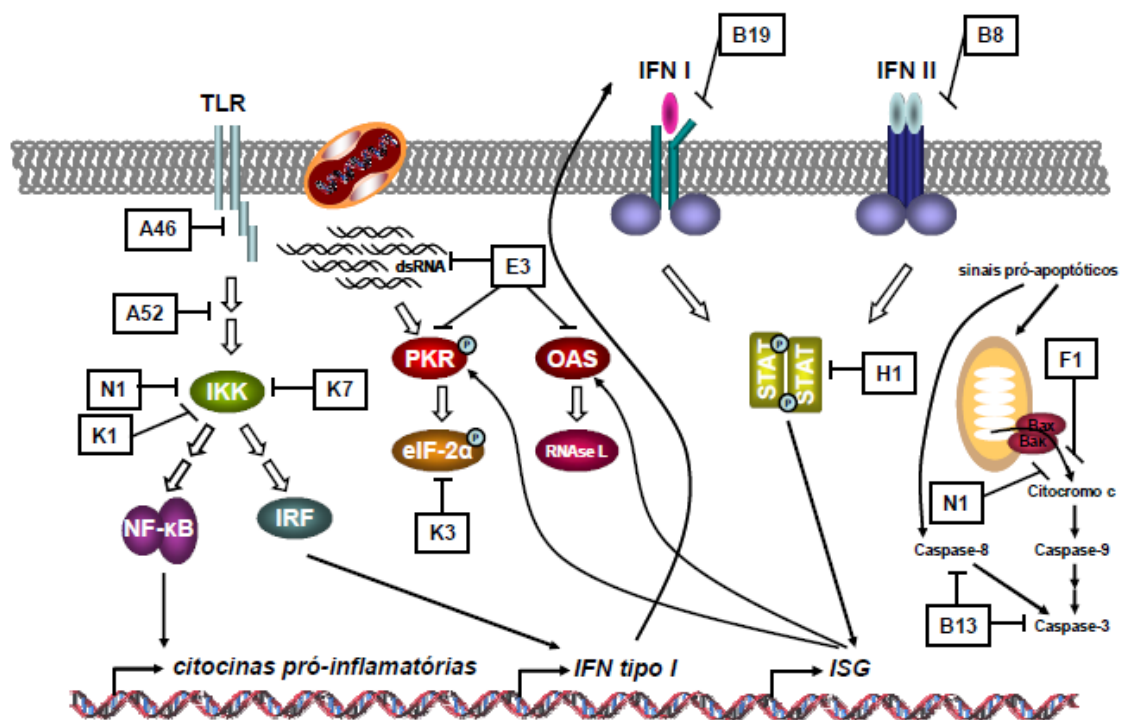
CITOCINAS	FUNÇÃO
TNF- $\alpha$	Ativa neutrófilo, induz a resposta inflamatória, potencializa a lise de algumas células infectadas por vírus.
IL-6	Produzido em resposta a IL-1 e TNF- $\alpha$ , estímulo o crescimento de células B, co-estimulador da células T.
IL-10	Promove o crescimento e diferenciação de células B, inibe a função dos macrófagos.
IL-12	Potente estimulador do crescimento de células NK e de sua atividade, promove a diferenciação de células T CD8+ imaturas

#### 4. Interação Poxvírus-Hospedeiro

Para que os vírus tenham sucesso em seu ciclo multiplicativo, eles necessitam dispor de estratégias para escapar da resposta antiviral do hospedeiro e manter a célula viável até a geração da progênie. Logo após a entrada dos vírus, a resposta imune do hospedeiro pode bloquear sua disseminação e levar a sua eliminação. Como visto, os primeiros mecanismos da resposta imune contra os vírus são inespecíficos e envolvem interferons, sistema complemento, citocinas, células natural killer, seguidos por mecanismos específicos como células T citotóxicas e produção de anticorpos (MOSS 2007).

Durante a co-evolução vírus-hospedeiros, os Poxvírus desenvolveram estratégias em resposta a essa pressão seletiva, de forma a manipular e evadir a resposta imune do hospedeiro, através de produção de múltiplas proteínas que interferem na indução ou atividade do sistema complemento e das principais citocinas (FIGURA 5). Essas proteínas inibitórias podem ser agrupadas em três classes principais: virocinas, que se assemelham a citocinas do hospedeiro ou a reguladores imunes solúveis; viroceptores que são receptores celulares alterados que sequestram ligantes; e proteínas intracelulares que interferem em vias sinalizadoras e efetoras. Os produtos dos genes E3L e K3L são exemplos dessa última classe, uma vez que antagonizam os efeitos do sistema interferon ao contraporem a atividade da Proteína Quinase dependente de RNA (PKR) e da 2'-5' Oligoadenilato sintetase (OAS), respectivamente (PERDIGUERO & ESTEBAN, 2009).

Como exemplo de viroceptores, o VACV codifica a proteína B19, que se associa a membrana plasmática de células infectadas e não infectadas, onde se ligam moléculas de IFN do tipo I, bloqueando seus efeitos antivirais (EVERETT & McFADDEN, 2002). Outros genes virais codificam viroceptores que impedem a ligação de TNF, IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , e a subsequente sinalização desencadeada por estas citocinas.



**FIGURA 5. Algumas proteínas de *Vaccinia virus* (VACV) relacionadas à evasão da resposta imune do hospedeiro.** A célula dispõe de receptores de padrão molecular capazes de detectar componentes estruturais de agentes patogênicos, dentre eles os vírus. Uma vez ativados, os TLRs transmitem o sinal através de uma cascata de proteínas sinalizadoras, culminando com a ativação de fatores de transcrição como NF- $\kappa$ B e IRF (fator regulatório de interferon), que induzem a expressão de citocinas pró-inflamatórias e IFN do tipo I, importantes para conter a disseminação da infecção. Cinco proteínas codificadas pelo VACV, entre elas a A52, interceptam esta cascata sinalizadora e são importantes fatores de virulência. A ligação dos IFN dos tipos I e II aos seus receptores cognatos também é bloqueada por proteínas codificadas por VACV, por exemplo a B19 que é uma proteína ligadora de IFN- $\alpha/\beta$ . PKR e OAS (oligoadenilato sintase) são dois ISG essenciais na resposta antiviral, cuja ativação depende de dsRNA (RNA fita dupla). Quando ativadas, PKR inativa a tradução através da fosforilação do eIF-2 $\alpha$  enquanto OAS leva à ativação da RNase L. As proteínas virais E3 e K3 inibem este sistema de defesa do hospedeiro pois são ligadora de dsRNA e homólogo do fator de iniciação da tradução eIF-2  $\alpha$ , respectivamente. Fonte: adaptado de PERDIGUERO & ESTEBAN, 2009.

Outro exemplo de proteína viral que participa da manipulação da resposta imune do hospedeiro é a A46. Essa proteína foi um dos primeiros inibidores virais da via de sinalização desencadeada pelos receptores do tipo Toll (TLRs) descrito (FITZGERALD *et al.*, 2005). A sinalização através dos TLRs é desencadeada por interações entre o domínio TIR (Receptor Toll-like de Interleucina-1) dos receptores e moléculas adaptadores. O proteínas A46 contém o domínio TIR, se ligando a moléculas adaptadores celulares e interferindo na ativação das Proteínas Quinases Ativadas por Mitógenos (MAPKs), ERK (quinase regulada por sinal extracelular), JNK (c-jun N-terminal quinase) e p38MAPK, além dos fatores transcricionais NFκB (Fator nuclear κB) e IRF-3 (fator regulador de Interferon 3) (PERDIGUERO & ESTEBAN, 2009; STACK *et al.*, 2005). O bloqueio destas vias sinalizadoras impede a expressão de IFNs do tipo I e citocinas pró-inflamatórias (STACK *et al.*, 2005, BONJARDIM *et al.*, 2009; McFADDEN, 2005). Foi descrito que essa proteína é importante para a virulência do VACV uma vez que a deleção do gene A46R tornou o vírus atenuado em modelo murino intranasal (PERDIGUERO & ESTEBAN, 2009).

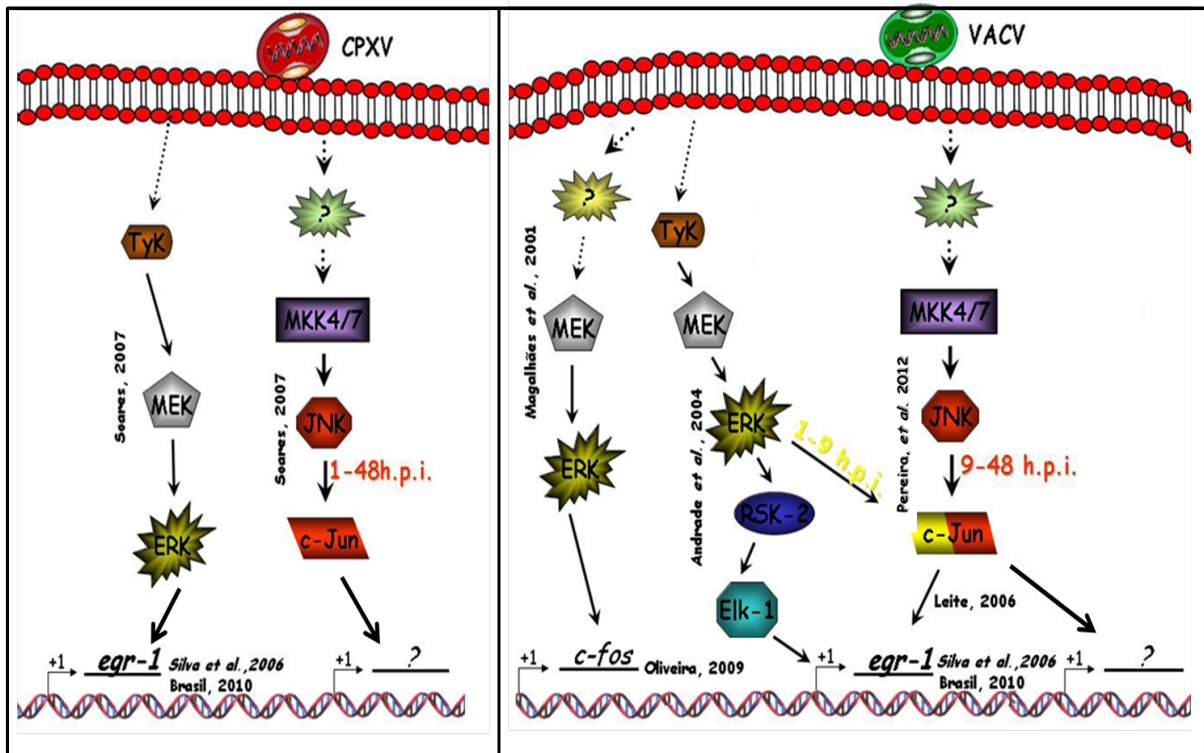
A ativação e bloqueio das diversas vias sinalizadoras celulares de modo a alterar o ambiente intracelular tornando-o mais propício à geração e disseminação virais, reflete nos tipos celulares que são permissivos ou restritivos à multiplicação de um determinado vírus, ou seja, no tropismo viral. Tais 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). Por exemplo, o VACV é capaz de estimular mitogenicamente células quiescentes, induzindo a proliferação de células não infectadas, através da secreção do fator de crescimento do *Vaccinia virus* (VGF) (BULLER *et al.*, 1988; SEET *et al.*, 2003).

Para os Poxvírus, células permissivas são aquelas nas quais o vírus penetra e completa seu ciclo de multiplicação, enquanto as células restritivas são aquelas nas quais os vírus penetram, mas não conseguem completar seu ciclo de multiplicação. Normalmente, as células permissivas são aquelas metabolicamente ativas capazes de prover toda a maquinaria traducional necessária para a multiplicação viral, e que não ativem as vias sinalizadoras antivirais (McFADDEN, 2005). Apesar de grande parte das linhagens celulares de mamíferos ser permissiva a infecção do VACV, sabe-se que em macrófagos e monócitos sanguíneos de

coelho, a replicação do VACV é lenta e o vírus matura assincronicamente. (BUCHMEIER, 1979). Em macrófagos peritoniais de camundongos, o ciclo de replicação do VACV é abortivo, sendo expressas somente as proteínas precoces, sem detecção de síntese de DNA e de proteínas virais tardias, e sem a montagem dos vírions da progênie (HUMLOVA *et al.*, 2002).

Estudos do Grupo de Transdução de Sinal do Laboratório de Vírus demonstraram que os vírus VACV e CPXV são capazes de estimular vias sinalizadoras intracelulares relacionadas à proliferação e à sobrevivência, como, por exemplo, a via das MAPKs (Proteínas Quinases Ativadas por Mitógenos), favorecendo o sucesso de sua multiplicação (DE MAGALHÃES *et al.*, 2001; ANDRADE *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2006; SOARES *et al.*, 2009, PEREIRA *et al.*, 2012). Foi demonstrado que a via MEK/ERK/EGR-1 é ativada pelos vírus VACV e CPXV, sendo essencial para a multiplicação de VACV, desde que a sua inibição causou uma significativa redução da progênie viral, mas não para o CPXV. Durante a infecção pelo VACV, ativação da via MEK/ERK é parcialmente desencadeada pela proteína viral VGF (FIGURA 6) (DE MAGALHÃES *et al.*, 2001; ANDRADE *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2006; BRASIL, 2010).

Estudos do nosso grupo também mostraram que ocorre a ativação das MAPKs MKK4/7/JNK1/2 durante a infecção por VACV e CPXV e, que para o VACV, apesar da formação de MVs não ser afetada na ausência JNK1/2, observa-se uma desorganização acentuada nas redes de microtúbulos e actina, levando a uma desregulação no tráfico viral para periferia da células e no aumento da liberação de partículas envelopadas (SOARES, 2007; LEITE, 2010, PEREIRA *et al.*, 2012). Durante a infecção pelo VACV, a fosforilação do fator de transcrição c-Jun é regulada temporalmente por ERK e JNK e exerce importante papel na geração e disseminação da progênie viral (PEREIRA, 2007; LEITE, 2010, dados não publicados) (FIGURA 6).



**FIGURA 6: Ativação das MAPKs ERK e JNK, pelo VACV e CPXV.** A infecção pelos vírus VACV e CPXV leva a ativação das vias das MAPKs ERK e JNK, de forma sustentada ao longo de seu ciclo de multiplicação. Na infecção pelo VACV, a ativação da via de ERK se inicia em tempos precoces da infecção, e culmina com a expressão/ativação de Elk-1, c-Jun, c-fos e *egr-1*. Na infecção pelo CPXV, a ativação da via de ERK se inicia em tempos precoces da infecção, e culmina com a expressão de *egr-1*. A ativação da via de JNK ocorre a partir de 1 hpi, na infecção de ambos os vírus, se estendendo até tempos tardios de 48 hpi, também levando a ativação de c-Jun.

## 5. MAPK (proteínas quinases ativadas por mitógenos)

As células respondem aos estímulos físicos e químicos do ambiente, como alterações na quantidade de nutrientes, fatores de crescimento, citocinas, alterações no pH, radiação e mecanismos de estresse, de modo a gerar uma resposta biológica que as tornem mais aptas a sobrevivência nessas condições. Esses sinais físicos e químicos controlam vários aspectos da função celular, incluindo migração, proliferação, diferenciação e morte. Muitas vias de transdução do sinal cooperam e participam nesse processo culminando na alteração da expressão gênica, entre elas, a via das Proteínas Quinases Ativadas por Mitógenos (MAPKs) (DAVIS, 2000; CARGNELLO & ROUX, 2011).

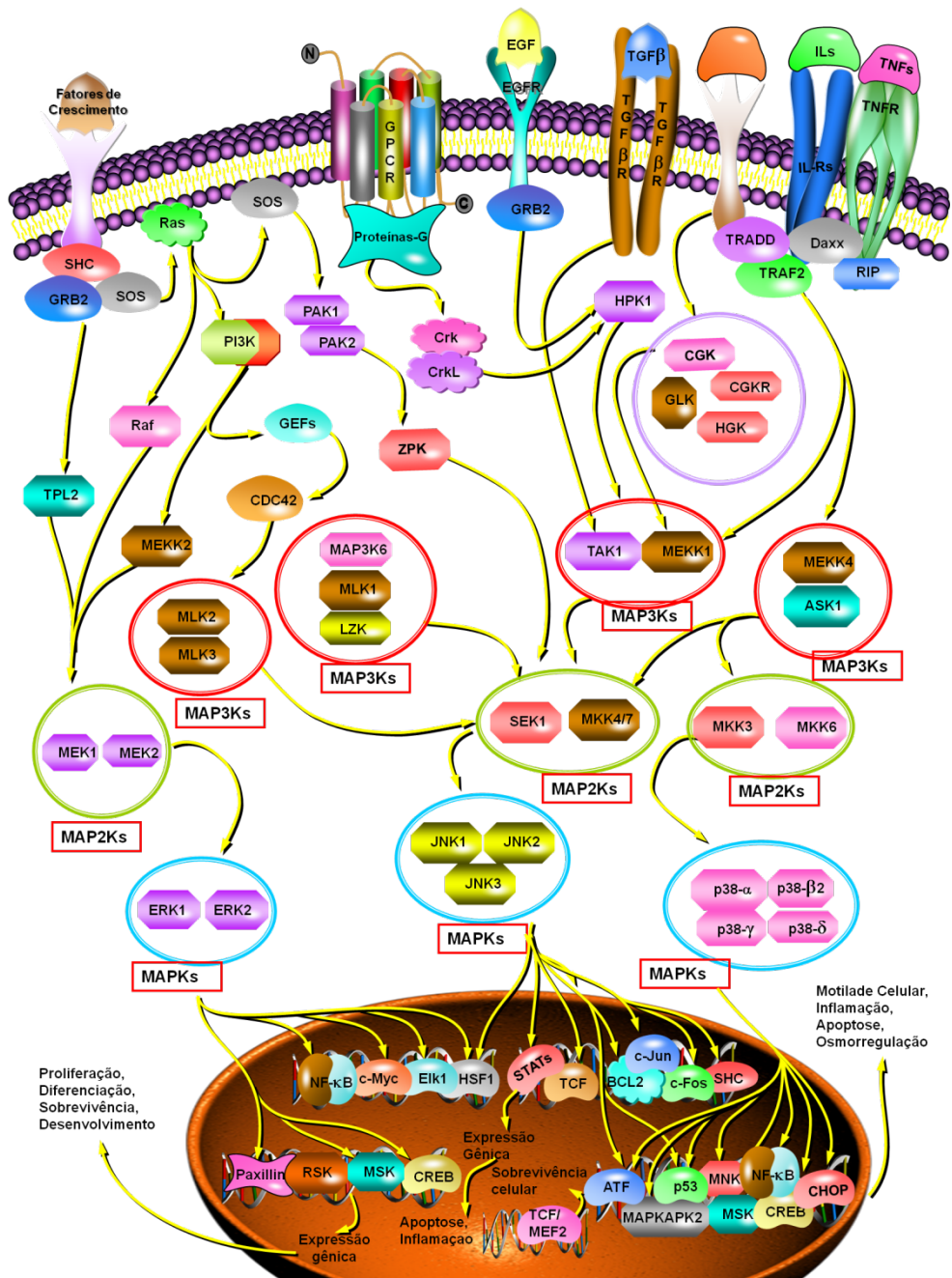
A via das MAPKs é composta por uma família de quinases transdutoras de sinais da membrana celular até o núcleo, em resposta a uma variedade de estímulos, incluindo fatores de crescimento, estresse, hormônios, entre outros. Todas as células eucarióticas possuem múltiplas vias das MAPKs, sendo esta bastante conservada entre elas (KYRIAKIS & AVRUCH, 2001; WADA & PENNINGER, 2004; DHANASEKARAN & JOHNSON, 2007).

Essas cascatas contêm pelo menos três proteínas quinases em série que culminam na ativação de uma MAPK funcional. Assim, uma MAPK quinase quinase (MAPKKK), é ativada através de fosforilação e/ou interação com GTPases associada à membrana, e por sua vez fosforila resíduos de serina e treonina de uma MAPK quinase (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 translocar-se para o núcleo, regulando diretamente a atividade de fatores de transcrição e, assim, controlando a expressão gênica (PEARSON *et al.*, 2001; KYRIAKIS & AVRUCH, 2001).

Atualmente é reconhecido que a superfamília das MAPKs possui várias vias de sinalizações distintas, entre elas a das proteínas quinases reguladas por sinais extracelulares (ERK1/2) e a das proteínas quinases ativadas por estresse (SAPKs): quinases c-Jun N-terminal (JNK) e das quinases p38 (FIGURA 7) (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).

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 (PEARSON *et al.*, 2001; COWAN & STOREY, 2003; CARGNELLO & ROUX, 2011).



**FIGURA 7: Representação esquemática das cascatas de sinalização das MAP Quinases.** As MAPKs são proteínas quinases que podem ser ativadas por diferentes sinais extracelulares, transduzindo esses sinais para vários compartimentos celulares, principalmente o núcleo, onde é direcionada a execução de programas genéticos apropriados, incluindo ativação da transcrição gênica, síntese protéica, proliferação, morte e diferenciação celular. As MAPKs estão organizadas num módulo de três proteínas quinases que consiste de uma MAPKKK (MAPK kinase kinase), ativadora de uma MAPKK (MAPK kinase) que por sua vez ativa uma MAPK (MAP kinase), 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 [www.sabiosciences.com](http://www.sabiosciences.com).

## 5.1. Quinase c-Jun amino terminal (JNK1/2) /SAPKs

Estudos bioquímicos, em 1990, identificaram e purificaram as proteínas quinases JNK1/2, de 54 e 47 KDa, descritas como associadas a microtúbulos e ativada por cicloheximida. Também descobriu-se que JNK fosforilava o fator transcricional c-Jun, além de se ligar a sua região amino terminal. JNK1/2 são ativadas em células após o tratamento com citocinas, por exemplo, TNF e IL-1, e por exposição a várias formas de estresses ambientais, como estresse osmótico e radiação. 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, criando dez isoformas de JNK, variando entre 46-54 KDa. Entretanto, o significado funcional dessas isoformas ainda não foi totalmente esclarecido (DAVIS, 2000; HIMES, 2006).

Embora inicialmente classificada como proteínas quinase ativada 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 crescimentos. Sabe-se que JNK1/2 têm participação na respostas imune, no desenvolvimento e sobrevivência de macrófagos, além de um envolvimento crítico no desenvolvimento embrionário de mamíferos, participando da regulação de processos como sobrevivência celular, apoptose e proliferação (BARR & BOGOYEVITCH, 2001; NISHINA *et al.*, 2004; HIMES *et al.*, 2006). Já foi demonstrado também que a ativação de JNK1/2 é responsável pela expressão gênica de citocinas tais como IL-6 e IL-1 (NISHITAI *et al.*, 2004).

A via sinalizadora que culmina com a ativação de JNK1/2 envolve um grande número de MAPKKK, 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 fosforilar as proteínas anti-apoptóticas, Bcl-2 e Bcl-

xL, e proteínas envolvidas na migração celular (FIGURA 7) (DAVIS, 2000; BARR & BOGOYEVITCH, 2001; HUANG *et al.*, 2004).

### 5.1.1. JNK e os vírus

Diante do papel de JNK1/2 na regulação de processos celulares como proliferação, sobrevivência, desenvolvimento, apoptose, inflamação, alterações do citoesqueleto e migração celular, é de se esperar que os vírus manipulem a atividade desta proteína quinase com o objetivo de criar um ambiente celular mais propício ao sucesso da geração e da disseminação da progênie, e como forma de conseguir se evadir das respostas antivirais do hospedeiro.

Como mostrado anteriormente, já foi observado a ativação de JNK1/2 durante a infecção pelos vírus VACV e CPXV (FIGURA 6). Sabe-se também que JNK e outras MAPKs tem papel na infecção por outros vírus, tendo papel tanto em processos de replicação viral, como na apoptose (HUANG *et al.*, 2011).

Alguns vírus da família *Herpesviridae*, entre eles o *Herpes simplex* (HSV-1), o *Varicela-Zoster virus* (VZV) e o *Pseudorabies virus* (PRV), ativam a via de JNK1/2 e outras MAPKs. Por exemplo, o HSV-1 ativa as vias de JNK1/2 e p38 e os fatores de transcrição c-Jun e ATF-2, levando a produção de IL-10 em células T, resultando na supressão da resposta imune celular e facilitando a replicação viral (SLOAN & JEROME, 2007). Em células epiteliais de córnea humana, observa-se que a ativação de JNK, p38, ERK e NF- $\kappa$ B constituem uma resposta celular à infecção pelo HSV1 que culmina com a síntese de IL-6 e a indução de uma resposta inflamatória (TERASAKA *et al.*, 2009). O VZV também é capaz de ativar JNK1/2 que participa da resposta celular à infecção e inibe a replicação viral (RAHAUS *et al.*, 2004). Em contraste, em fibroblastos humanos a ativação de JNK1/2 mostrou-se essencial para a multiplicação desse vírus (ZAPATA *et al.*, 2007). Em outro trabalho, DESLOGES e colaboradores (2008) mostraram que células de melanoma e fibroblastos infectadas pelo VZV secretam IL-8 de maneira dependente de JNK1/2, porém essa citocina não seria essencial para a replicação do vírus. Quanto ao PRV, observou-se que o vírus ativa as vias de p38 e JNK, o que leva a produção da citocina TNF- $\alpha$ . A inibição dessas vias leva a redução da produção de TNF e consequente inibição da apoptose gerada pela infecção viral, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (YEH *et al.*, 2008). Foi demonstrado também que o Herpesvírus sarcoma de

Kaposi-associado (KSHV) possui uma proteína chamada vFLIP que é capaz de ativar a via JNK/AP1 levando a ativação do promotor de IL-6 e induzindo a expressão dessa citocina (AN *et al.*, 2003).

O vírus da encefalomielite murina (TMEV), pertencente a família *Picornaviridae*, promove a expressão de IL-27 em macrófagos, devido ativação das vias TLR3, TLR7 e JNK (HAUSE *et al.*, 2007). Foi demonstrado também que o *Human immunodeficiency virus 1* (HIV-1) membro da família *Retroviridae*, leva a diminuição da produção da citocina IL-12, através da inibição seletiva da via de JNK (MA *et al.*, 2009). Um vírus membro da família *Baculoviridae*, pertencente ao gênero *Nucleopolyhedrovirus* (NPV), leva a fosforilação das MAPKs ERK1/2, p38 e JNK em células aviárias semelhantes a macrófagos. A inibição da via de p38 abole a expressão de IL-12 e de IFN- $\gamma$  e a produção de óxido nítrico (NO), o bloqueio de JNK inibe somente a expressão das citocinas, enquanto a inibição de ERK1/2 resulta num aumento da expressão das citocinas e de NO (HAN *et al.*, 2009).

Em conjunto, todos esses dados demonstram a íntima relação entre os vírus, dentre eles os *Orthopoxvirus*, alvo de estudo deste trabalho, e as vias sinalizadoras celulares, as quais são finamente manipuladas em favor de uma multiplicação viral bem sucedida. Essa manipulação pode ser através da ativação ou inibição de uma via específica, porém o sucesso ou não dessa modulação varia de acordo com a espécie viral e com a linhagem celular infectada, sendo que vírus relacionados podem manipular a mesma via diferentemente. Assim, nota-se a importância de um melhor esclarecimento das relações entre os vírus e seus hospedeiros.

### III. OBJETIVOS

#### 1. Objetivo Geral

Investigar o papel das MAPKs JNK1/2 na expressão das citocinas inflamatórias IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$  e IL-10, durante a infecção pelo *Orthopoxvirus Cowpox*.

#### 2. Objetivos Específicos

2.1. Avaliar a expressão e produção da citocina inflamatória IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ , e IL-10, durante a infecção pelo *Orthopoxvirus Cowpox* em MEFs selvagens e nocautes para JNK.

2.2. Avaliar a cinética de expressão da citocina inflamatória IL-6 após infecção pelo *Orthopoxvirus Cowpox* em MEFs selvagens e nocautes para JNK na ausência e presença do inibidor farmacológico JNK VIII.

2.3. Avaliar a expressão e produção da citocina inflamatórias IL-6, durante a infecção pelo *Orthopoxvirus Cowpox* nas células A31 expressando dominância negativa para c-Jun (DNc-Jun) e células transfectadas com o vetor vazio (pELFIN).

2.4. Caracterizar a cinética de ativação das MAPKs JNK1/2 em macrófagos (M $\Phi$ ) intraperitoniais de camundongos e células RAW 264.7, durante a infecção pelo *Orthopoxvirus Cowpox*.

2.5. Avaliar a multiplicação do *Orthopoxvirus Cowpox* após infecção de M $\Phi$  e células RAW 264.7;

2.6. Avaliar e comparar a expressão dos mRNAs das citocinas inflamatórias acima durante a infecção de M $\Phi$  e células RAW pelo *Orthopoxvirus Cowpox* em presença e ausência do inibidor farmacológico JNK VIII.

## **IV. MATERIAL E MÉTODOS**

### **1. Células**

#### **1.1. Células BSC-40**

As células BSC-40, que são uma linhagem contínua de células epiteliais derivadas de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*), foram gentilmente cedidas pelo Dr. Bernard Moss (National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Bethesda, Maryland, Estados Unidos). Elas foram cultivadas em meio mínimo de Eagle autoclavável (Auto pow), suplementado com 6% de soro fetal bovino (SFB), antibióticos (gentamicina a 40µg/mL e penicilina a 200U/mL) e antifúngico (anfotericina B a 1,5 µg/mL); e foram mantidas a 37°C, sob atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5%. A linhagem BSC-40 foi utilizada para a produção de VACV-WR e CPXV-BR e para os ensaios de titulação viral.

#### **1.2. Células selvagem e knockout para JNK1/2**

Os fibroblastos embrionários murinos (MEFs) selvagem (WT) e *knockout* (KO) para JNK1/2 (TOURNIER *et al.*, 2000) foram gentilmente cedidos pelo Dr. Roger Davis (University of Massachusetts Medical School, EUA). Os MEFs JNK1/2 WT e KO foram cultivados em meio DMEM, suplementado com 7% de SFB e com os antibióticos penicilina (200U/mL) e gentamicina (20µg/mL).

#### **1.3. Células A31 expressando dominância negativa para c-Jun (DNc-Jun) e células controle transfectadas com o vetor vazio (pELFIN)**

As células DNc-Jun e contendo o vetor vazio (pELFIN), foram obtidas no laboratório durante o mestrado da aluna Flávia Gama, através de transfecção estável por fosfato de cálcio (AUSUBEL *et al.*, 1994) com os plasmídios pEF/c-jundnM (mutante expressando dominância negativa para o fator de transcrição c-Jun murino) e pELFIN (vetor vazio), conforme descrito em LEITE, 2006. Estes plasmídios foram gentilmente cedidos pelo Dr. Jewed Alam da “Alton Ochsner Foundation”, New Orleans/LS (ALAM *et al.*, 1999).

Estas células foram cultivadas em meio DMEM, suplementado de 10% (DNc-Jun) ou 7% (pELFIN) de SFB, 200 µg/mL de G418 - Sulfato de Geneticina e os mesmos antibióticos utilizados para as células BSC-40 (veja item 1.1.).

#### **1.4. Células RAW 264.7**

A linhagem de células RAW 264.7, macrófagos transformados pelo vírus da leucemia murina Abelson, foi gentilmente cedida pelo Dr. Aristóbolo Mendes da Silva (Departamento de Morfologia, ICB/UFMG) e cultivada em DMEM suplementado de 10% de SFB e os mesmos antibióticos utilizados para as células BSC-40; e foram mantidas a 37°C, sob atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5%.

## **2. Animais**

Os camundongos da linhagem C57BL/6 foram obtidos do Centro de Bioterismo da UFMG e foram mantidos no biotério do Departamento de Microbiologia, com livre acesso à ração e à água, sob ciclo claro/escuro, de acordo com as normas estabelecidas pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CETEA), desta Universidade.

### **2.1. Macrófagos intraperitoniais de camundongos**

O cultivo primário de macrófagos (MΦ) intraperitoniais foi obtido através da injeção intraperitoneal de tioglicolato a 4% estéril em camundongos fêmeas com 6 semanas de idade. Foi utilizado 1,5mL de tioglicolato por animal e após 96h, os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical, seguindo as recomendações do CETEA. Após desinfecção com etanol 70%, o peritônio de cada animal foi lavado com 5mL de DMEM gelado sem SFB e suplementado com gentamicina a 40µg/mL. Os lavados peritoniais foram coletados em tubos de 50mL e centrifugados a 1.200rpm por 10min a 4°C (rotor A384 – Sorvall RT6000B). O precipitado celular foi suspenso em DMEM suplementado com SFB a 5% e gentamicina a 40µg/mL, e as células viáveis foram contadas pelo método de exclusão de azul de Tripán.

Os MΦ foram semeados em placas de seis poços (2 × 10<sup>6</sup> células por poço) e incubados por 3h a 37°C, sob atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5%, para a adesão das células ao substrato. Após este período, as células foram lavadas com DMEM sem soro e foi adicionado DMEM suplementado com SFB a 5% e gentamicina. Após 24h, os MΦ foram utilizados para a realização dos experimentos.

### **3. Vírus**

O vírus *Vaccinia* WR (linhagem *Western Reserve*) foi gentilmente cedido pelo Dr. Flávio Guimarães da Fonseca (Departamento de Microbiologia, ICB/UFMG), e o vírus *Cowpox* BR (linhagem *Brighton Red*) foi gentilmente cedido pelo Dr. C. Jungwirth (Universität Würzburg, Alemanha). Os estoques virais foram obtidos após a infecção de células BSC-40 e purificação dos vírus produzidos em colchão e gradiente de sacarose conforme método descrito por JOKLIK, 1962.

#### **3.1. Produção dos estoques virais**

Células BSC-40 foram cultivadas em garrafas de 150cm<sup>2</sup> até atingirem a confluência, quando foram infectadas com VACV-WR ou CPXV-BR, utilizando-se MOI (multiplicidade de infecção) de 0,01 pfu (unidades formadoras de placa), em meio sem SFB, e foram mantidas por 1h a 37°C para a adsorção viral. Após a adsorção, meio suplementado com 1% de SFB foi adicionado. A seguir, 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 lavadas em PBS, 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.

#### **3.2. 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 (MgCl<sub>2</sub> 1mM; Tris-HCl 10mM pH 7,0; KCl 10mM), e centrifugadas a 2.500rpm por 15min 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 2h a 4°C (rotor AH 629 Sorvall), para a remoção dos restos celulares. O sedimento foi suspenso em tampão Tris-HCl 10mM pH8,0, e submetido a sonicação por 2 ciclos de 30s (Sonic Desmembrator-50, Fisher Scientific). A seguir, a suspensão viral foi centrifugada em gradiente de sacarose, variando de 25 a 40%, a 12.000rpm por 45min a 4°C (rotor AH 629 Sorvall). A banda inferior formada após a centrifugação, correspondente às partículas virais completas e infecciosas do tipo MVs (ou IMV), foi coletada e

centrifugada em tampão Tris-HCl 10mM pH8,0 a 20.000rpm por 1h 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.

### **3.3. 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 foram cultivadas em placas de seis poços (poço de 9,6cm<sup>2</sup>), por 16h, até atingirem cerca de 100% de confluência. Foram então inoculadas 200µl de uma série de diferentes diluições às culturas recém confluídas, realizadas na razão de 10, da suspensão contendo o vírus a ser titulado; sendo uma cultura mantida como controle. Após 1h de adsorção viral, foi adicionado meio contendo 1% de SFB. A revelação foi realizada após 48h de infecção, através da fixação das culturas com formol a 10% por 30min e coloração com solução de cristal violeta a 1% (p/v) em etanol 20%, por 15min. As culturas contendo entre 30 e 300 placas de lise foram utilizadas para a determinação do título viral, expresso em pfu/mL (unidades formadoras de placa por mL).

### **3.4. Análise da Multiplicação viral**

Macrófagos intraperitoniais e células RAW 264.7 foram contados e implantados em placas de 6 poços para atingir a confluência de aproximadamente 90% após 24 horas. Posteriormente, foram infectadas a MOI de 10. Após 3, 6, 12, 24, 48 horas as células foram lavadas duas vezes com PBS 1x e congeladas com 1 mL desta solução. As células foram então congeladas e descongeladas 3 vezes para promover a lise celular e liberação das partículas virais, e o lisado celular foi centrifugado a 12.000 rpm por 1 minuto a 4°C e o sobrenadante titulado (conforme descrito anteriormente no item 3.3) em células BSC-40.

## **4. Anticorpos e reagentes**

Os anticorpos anti-fosfo-c-Jun, anti-fosfo-JNK1/2 e anti-IgG de coelho e camundongos conjugados a peroxidase foram adquiridos da Cell Signalling Technology-Beverly, MA, EUA. O anticorpo anti-β-actina foi adquirido da Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil. O inibidor farmacológico JNK inhibitor VIII (N-(4-Amino-5-

cyano-6-ethoxypyridin-2-yl)-2-(2,5-dimethoxyphenyl) acetamide) foi adquirido da Calbiochem - Merck (Darmstadt, Germany).

O antibiótico Geneticina (G418 Sulfato) foi adquirido da Gibco BRL Life Technologies, Grand Island, N.Y., EUA, sendo utilizada de acordo com as recomendações do fabricante em concentrações ótimas para a inibição específica de seu alvo.

## **5. Infecção**

Células JNK1/2 WT e KO, RAW 264.7 e MΦ intraperitoniais foram cultivadas em placas de seis poços até atingirem 90% de confluência, quando foram (células JNK1/2 WT e KO) ou não carenciadas (RAW 264.7 e MΦ intraperitoniais) em meio DMEM suplementado com 1% de SFB, por no mínimo 12h. O objetivo do carenciamento é minimizar o estímulo mitogênico exercido pelos componentes do SFB, sincronizando as células no estado quiescente (fase G0 do ciclo celular). As células foram infectadas com CPXV-BR ou VACV-WR a MOI de 5, em meio sem SFB e mantidas por 1h, sob agitação intermitente, para a adsorção viral. A seguir, o meio foi removido, sendo substituído por DMEM contendo 1% de SFB e as células foram incubadas por tempos variando de 1h a 48h. Quando inibidores farmacológicos foram utilizados, as células foram pré-tratadas 30min antes da infecção, e os mesmos foram mantidos no meio de cultura durante todo o tempo de infecção.

Para analisar o papel de JNK1/2 na expressão de citocinas, após os diferentes tempos de infecção, foi removido o sobrenadante celular, a monocamada foi lavada duas vezes com PBS e congelada com 1mL do reagente TRIzol, para posterior extração de RNA total.

Para avaliar a ativação biológica de JNK durante a infecção viral em macrófagos intraperitoniais e RAW 264.7, após os diferentes tempos de infecção, foi removido o sobrenadante celular, a monocamada foi lavada duas vezes com PBS e congelada, para posterior extração de proteínas totais.

## **6. Extração de Proteínas Totais**

Como dito acima, após o tempo de infecção, as células foram lavadas duas vezes com PBS e congeladas. Posteriormente, as células foram lisadas diretamente

da monocamada celular com tampão de lise gelado [Triton X-100 1%; Tris-HCl 100mM pH 8,0; EDTA 0,2mM; glicerol 20% (v/v); NaCl 200mM; NaVO<sub>3</sub> (ortovanadato de sódio) 1mM; NaF (fluoreto de sódio) 50mM PMSF (fenilmetilsulfonilfluoreto) 1mM; aprotinina 5µg/mL; leupeptina 2,5µg/mL; DTT 1mM], 150µL/garrafa durante 30 minutos no gelo. A seguir, as células foram raspadas e coletadas em tubos de 1,5mL. O lisado foi clarificado através de centrifugação a 13.000rpm por 20min a 4°C em microcentrífuga (Eppendorf 5417R), para eliminação dos restos celulares. O sobrenadante foi coletado e a concentração de proteínas totais foi determinada por espectrofotometria, utilizando o kit Bio-Rad Assay (Bio-Rad Laboratories). Em seguida, as proteínas foram distribuídas em alíquotas e mantidas a -20°C.

## 7. Transferência Western

Tampão LB ("loading buffer") 5× [Tris-HCl 0,5M pH 6,8; β-mercaptoetanol 5%; azul de bromofenol 0,1% (p/v); glicerol 20% (p/v)] foi adicionado a alíquotas de cerca de 40µg/amostra das proteínas totais, que foram, então, desnaturadas por 5min a 99°C. As proteínas então foram fracionadas em gel de 10% poliacrilamida/SDS (PAGE) a 100V e transferidas para membrana de nitrocelulose (*Hybond ECL*, GE Healthcare), conforme o protocolo do "Kit Bio-Rad Transference" (Bio-Rad Laboratories, USA). Após a transferência, as membranas foram coradas com Ponceau 1% para a verificação da eficiência da mesma, além da informação sobre a equivalência das quantidades de proteínas utilizadas. A seguir, as membranas foram bloqueadas durante 1 hora 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. As membranas reutilizadas para sondagem com diferentes anticorpos foram incubadas com tampão de remoção ( $\beta$ -mercaptoetanol 100mM; SDS 2%; Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8), por 30min a 56°C. Após este tempo, as membranas foram lavadas repetidamente (cerca de cinco vezes) em PBS/Tween-20, coradas com Ponceau 1%, bloqueadas e incubadas com os anticorpos, como descrito acima.

## **8. Extração do RNA Total**

O RNA total foi obtido através de extração com o reagente TRIzol LS (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, 0,4mL de TRIzol foi adicionado diretamente a cada poço da placa de cultivo, e o lisado foi homogeneizado com o auxílio de uma pipeta, transferido para um tubo de 1,5mL e mantido por 5 minutos a temperatura ambiente. A seguir, adicionaram-se 206 $\mu$ L de clorofórmio a cada tubo. Os tubos foram agitados manualmente por 15s e incubados por 10 minutos a temperatura ambiente. Após centrifugação a 12000 x g por 15min a 4°C, a fase aquosa contendo o RNA foi coletada e transferida para um novo tubo de 1,5mL. O RNA foi precipitado com 266 $\mu$ L de isopropanol por tubo. Os tubos foram mantidos por 10min a temperatura ambiente e centrifugados a 12000 x g por 10min a 4°C. Os precipitados de RNA foram lavados com 533 $\mu$ L de etanol a 75%. Os tubos foram agitados em vórtex e centrifugados a 7500 x g por 5min a 4°C. Os precipitados de RNA foram secos ao ar por 10min, suspensos em água tratada com DEPC (dietilpirocarbonato) e quantificados em espectrofotômetro Nano Drop (Thermo Scientific).

## **9. Tratamento de RNAs com DNase**

Os RNAs extraídos com o reagente de TRIzol foram tratados com DNase previamente a transcrição reversa. O protocolo foi feito conforme a orientação do fabricante da DNase RNase free (Biolabs). Tampão de DNase 10x (3 $\mu$ L) e 1 unidade de DNase I (1 $\mu$ L) foram adicionados a 26 $\mu$ L da solução contendo RNA, e a mistura foi incubada a 37 °C durante 10 minutos, para melhor ação da enzima. Em seguida, os tubos foram colocados em gelo, e foi acrescido 0,5 $\mu$ L de EDTA (a 0,5M) a mistura, para uma concentração final de 5 mM de EDTA. O EDTA protege os RNAs durante o passo seguinte, de inativação da DNase a 75°C por 10 minutos. Logo em seguida ao tratamento, foi feita a transcrição reversa.

## 10. Transcrição Reversa

Para a síntese do cDNA (DNA complementar), 1-2µg de RNA foram adicionados à mistura de reação a seguir: tampão da transcriptase reversa (Tris-HCl pH 8,3 50mM; KCl 75mM; MgCl<sub>2</sub> 3mM; DTT 10mM), oligonucleotídeo dT 0,4µM, dNTP (deoxirribonucleotídeo trifosfato) 500µM, 200U de transcriptase reversa MMLV (vírus da leucemia murina Moloney) (Promega) e água deionizada tratada com DEPC q.s.p. 25µL. Antes de serem adicionados à mistura de reação, o RNA, o oligonucleotídeo dT e água deionizada tratada com DEPC q.s.p. 15µL foram desnaturados a 70°C por 5min e, posteriormente, mantidos no gelo por 2min. A reação de transcrição reversa foi realizada por 1h a 42°C, em termociclador (Eppendorf).

## 11. PCR em Tempo Real

O PCR em tempo real foi realizado em equipamento Step ONE Real Time PCR System (Applied Biosystems). A mistura de reação foi a seguinte: 5µL de Master Mix SYBR Green (Applied Biosystems), 0,2µM de cada iniciador (*forward* e reverso), 1µL de cDNA diluído 1:3 e água deionizada q.s.p. 10µL. As condições de reação foram: desnaturação inicial de 10min a 95°C, seguida de 40 ciclos de 15s a 95°C e 1min a 60°C. Após o fim da reação, a especificidade dos produtos amplificados foi confirmada através da curva de dissociação, observando-se a temperatura específica de dissociação (T<sub>m</sub>) para cada um dos alvos, e somente as amostras que apresentaram um único pico de dissociação com a T<sub>m</sub> específica para cada alvo foram consideradas para análise dos resultados dos experimentos seguintes. Os iniciadores para a análise dos níveis de mRNA de citocinas inflamatórias são mostrados na TABELA 3.

Controles positivos foram obtidos no laboratório durante o doutorado da aluna Graciela Kunrath Lima, através da realização de uma PCR comum com os mesmos oligonucleotídeos que foram utilizados na PCR em tempo real, utilizando como amostra os cDNAs oriundos dos macrófagos intraperitoneais infectados pelo HSV-1, descrito em LIMA, 2010. A análise das reações de PCR em tempo real foi feita pelo método da quantificação relativa por curva padrão, para o qual foram geradas uma curva padrão para o gene testado e uma para o gene constitutivamente expresso HPRT (hipoxantina guanina fosforibosiltransferase), baseada em diluições seriadas

dos controles positivos em base logarítmica de dez. Para cada uma das diluições foi atribuído um valor arbitrário (correspondente à respectiva diluição) e uma regressão linear foi feita (software SDS 2.0). As curvas foram consideradas apenas quando o valor de R2 foi superior a 0,95. A partir da curva, foram calculados os valores de cada amostra. Estes valores foram normalizados pelos valores respectivos do gene constitutivo, e os valores das células infectadas foram comparados aos dos MOCKs (células não infectadas). Os resultados foram plotados como aumento relativo, em unidades arbitrárias. Todas as reações foram feitas em duplicata ou triplicata. Os resultados da PCR em Tempo Real foram analisados através do teste Two-way ANOVA (Análise de Variância) e Bonferroni pós-teste, utilizando-se o software GraphPad Prism 5 para Windows.

**TABELA 3.** Iniciadores utilizados para a avaliação da expressão dos mRNAs de citocinas inflamatórias em MEFs e em macrófagos murinos.

Iniciador	Sequência 5'-3'	Alvo	Tamanho do Produto (pb)	Tm (°C)
<b>F</b>	CATCTTCTCAAATTCGAGTGACAA	TNF- $\alpha$	174	85,1
<b>R</b>	CCCAACATGGAACAGATGAGGGT			
<b>F</b>	ACGGCCTTCCCTACTTCACA	IL-6	124	79,3
<b>R</b>	CCACGATTTCCAGAGAACA			
<b>F</b>	FGGAAGCACGGCAGCAGAATA	IL-12 p40	142	81,2
<b>R</b>	AACTTGAGGGAGAAGTAGGAATGG			
<b>F</b>	GGTTGCCAAGCCTTATCGGA	IL-10	191	81,0
<b>R</b>	ACCTGCTCCACTGCCTTGCT			
<b>F</b>	GTTGATACAGGCCAGACTTTGTTG	HPRT	142	76,9
<b>R</b>	GATTCAACTTGCGCTCATCTTAGG			

<sup>a</sup>forward; <sup>b</sup>reverso

## 12. ELISA

Os sobrenadantes das células infectadas foram utilizados para a dosagem de IL-6, segundo descrito pelo fabricante do kit (BD, USA). Basicamente, 100 uL/poço do anticorpo de captura (5,5 uL/mL), diluídos em PBS estéril (pH 7,4), foram adicionados a cada placa (NUNC MaxiSorb, 96-poços). Estas foram então vedadas e incubadas a 4°C por 16 horas. O conteúdo de cada placa foi retirado e esta foi lavada 3 vezes (300 (uL/poço) com um tampão de lavagem (PBS/TWEEN 20 0,05%). Após este procedimento, foram adicionados 200 uL/poço do tampão de bloqueio (SFB 10% em PBS). As placas foram incubadas a temperatura ambiente por no mínimo uma hora. O procedimento de lavagem foi repetido e foram adicionados 100 uL/poço das amostras de sobrenadante e padrões diluídos em tampão de diluição (SFB 10% em PBS), e incubados a temperatura ambiente por uma hora. O procedimento de lavagem foi repetido e foram adicionados 100 uL/poço do anticorpo de detecção (5,55 µL/mL) diluído em tampão de diluição (o mesmo das amostras e padrões). As placas foram incubadas a temperatura ambiente por 1 hora. Após outro procedimento de lavagem, foram adicionados 100 µL/poço do substrato TMB e as placas foram incubadas por 30 minutos, em temperatura ambiente, protegidas da luz. Após este período, foram adicionados 50 µL/poço de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2M para interromper a reação. As placas foram lidas em espectrofotômetro Asys (Analítica) a 450 nm.

## V. RESULTADOS

### 1. PCR em tempo real para os genes HPRT, IL-6 e TNF- $\alpha$

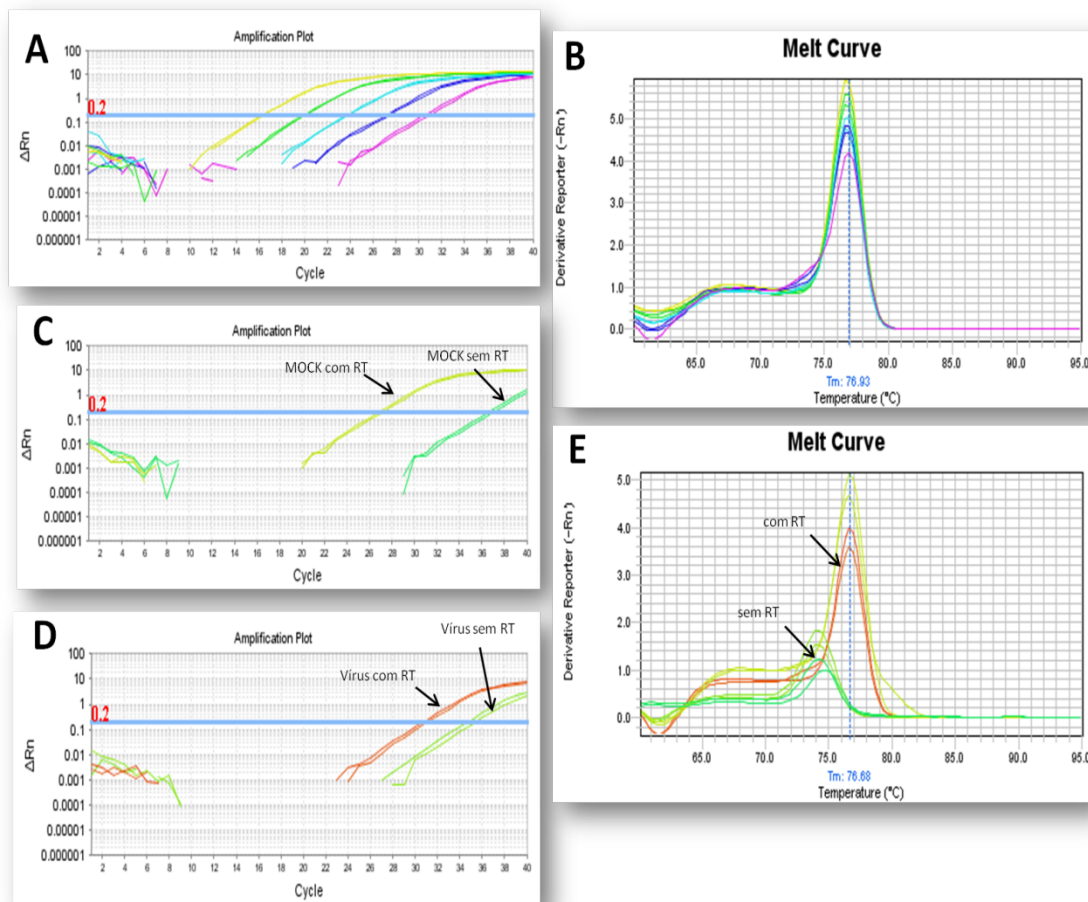
Antes de começar a avaliação da expressão de citocinas induzidas após infecção viral, decidiu-se testar a especificidade dos controles e dos iniciadores utilizados na PCR em tempo real. Como mencionado nos materiais e métodos, os controles positivos utilizados durante as reações de PCR em tempo real (qPCRs) para os alvos HPRT, IL-6 e TNF- $\alpha$  foram obtidos no laboratório, segundo LIMA, 2010. A fim de se estabelecer a curva padrão para cada alvo, foram feitas diluições seriadas decimais desses padrões, variando entre  $10^{-5}$  a  $10^{-10}$  para os genes HPRT e IL-6, e  $10^{-4}$  a  $10^{-9}$  para o gene TNF- $\alpha$ . Após a qPCR, foi feita a análise das curvas de dissociação gerada por cada diluição amplificada para confirmação da especificidade da reação. Além disso, com o objetivo de verificar a qualidade da extração de RNA bem como da reação de transcrição reversa, foram feitas reações de qPCR com cDNAs oriundos da extração de RNA total de MEFs JNK1/2 selvagens infectados ou não, tratados com DNase e submetidos a transcrição reversa na presença (com RT) ou ausência (sem RT) da enzima transcriptase reversa MMLV (FIGURAS 8, 9 e 10).

Para o alvo HPRT, a temperatura de dissociação das diferentes diluições do controle foi de aprox. 77°C (FIGURA 8A e B). Nas reações onde o cDNA de MEFs foi usado como molde para amplificação de transcritos deste gene, observa-se a amplificação específica somente no cDNAs com RT, onde a temperatura de dissociação foi praticamente a mesma dos controles positivos. A amplificação observada nos cDNAs sem RT teve uma menor temperatura de dissociação, aproximadamente dois graus a menos (FIGURA 8C a E). Isso nos indica que os iniciadores utilizados são específicos para o alvo que desejamos.

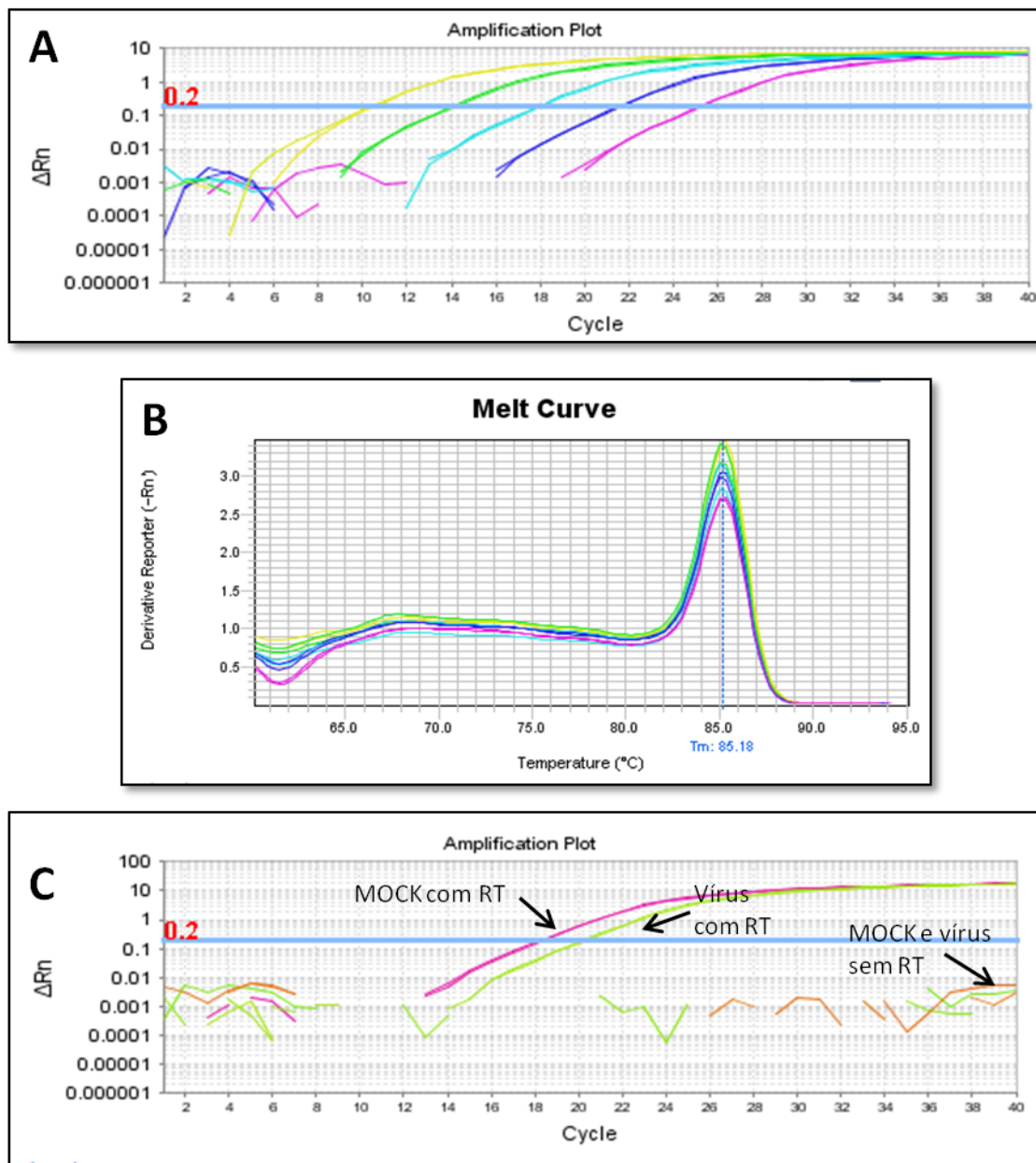
Em relação ao alvo TNF- $\alpha$ , a temperatura de dissociação dos controles foi de aprox. 85°C (FIGURA 9A e B). Nas reações para amplificação desse alvo a partir do cDNA de MEFs, observa-se a amplificação somente nas amostras que foram submetidas a RT, onde a temperatura de dissociação foi a mesma dos controles positivos (85°C). Não houve nenhuma amplificação nos cDNAs sem RT (FIGURA 9C a E), confirmando a especificidade dos iniciadores utilizados.

Já para o alvo IL-6, a temperatura de dissociação dos controles foi de aprox. 79°C (FIGURA 10A e B). Entretanto, nas reações onde utilizamos o cDNA de MEFs como amostra, observou-se uma amplificação específica independente do cDNA ter sido submetido ou não a transcrição reversa na presença da enzima transcriptase reversa (FIGURA 10C a E), apesar do tratamento dos RNAs com a enzima DNase. Entretanto, podemos observar que a amplificação dos cDNAs do MOCK com ou sem RT e do vírus sem RT ocorreram aproximadamente no mesmo ciclo (Ct=34), enquanto a amplificação do cDNA da amostra referente ao vírus com RT, amostra na qual se espera ter uma maior quantidade de mRNA do gene alvo devido à indução de sua expressão em resposta à infecção, ocorreu no ciclo 26. A diferença de 8 ciclos na amplificação destes cDNAs é bem significativa, indicando que há consideravelmente mais cDNA, cerca de 256 vezes mais, referente aos transcritos de IL-6 do que de DNA referente ao genoma celular. Dessa maneira, apesar dessa amplificação indesejada, continuamos os ensaios de qPCR com esses iniciadores por considerar que seria possível detectar uma maior expressão de transcritos de IL-6 nas células após a infecção viral quando comparados as células não infectadas, que praticamente não expressam essa citocina. Além disso, algumas amostras também foram submetidas ao teste de ELISA para avaliar a secreção de IL-6, o que descartaria que os resultados obtidos através da qPCR não seriam duvidosos.

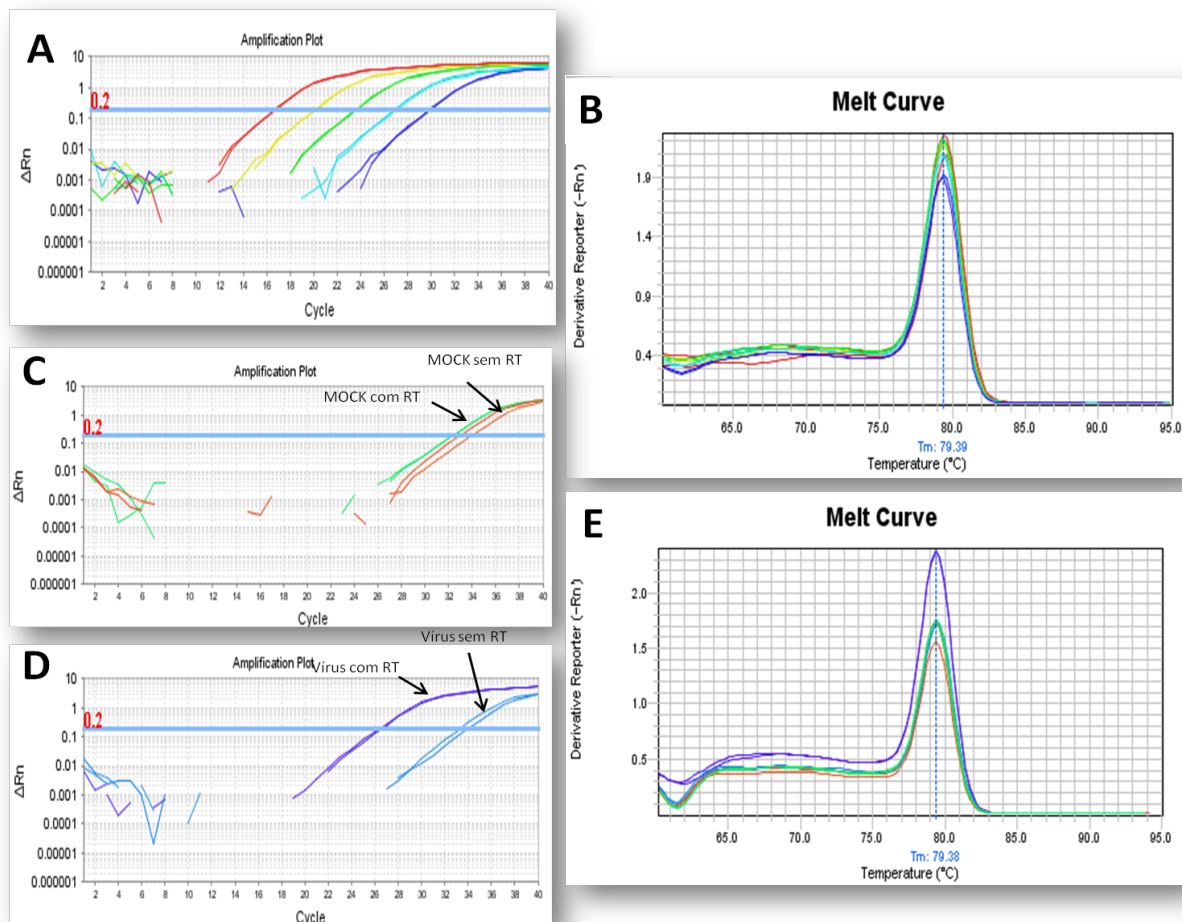
Vale ressaltar que novos iniciadores para IL-6 tentaram ser desenhados, porém aparentemente sem sucesso, uma vez que todas as opções se alinhavam em sequências inespecíficas quando utilizado o programa BLAST.



**Figura 8 - Gráficos representativos da amplificação tanto da curva padrão relativa quanto de cDNAs resultantes da reação de transcrição reversa na presença (com RT) ou na ausência (sem RT) da enzima transcriptase reversa e respectivas curvas de dissociação, utilizando os iniciadores para o gene HPRT. A) Amplificação das diluições seriadas do controle positivo para HPRT variando entre  $10^{-5}$  e  $10^{-10}$ . B) Curva de dissociação dos amplificados em A, com a temperatura de dissociação igual a 76,9°C. C e D) Amplificação do cDNA de células não infectadas (MOCK) e infectadas pelo CPXV, respectivamente, utilizando iniciadores para o gene HPRT. E) Curva de dissociação dos amplificados em C e D.**



**FIGURA 9 - Gráficos representativos da amplificação tanto da curva padrão relativa quanto de cDNAs resultantes da reação de transcrição reversa na presença (com RT) ou na ausência (sem RT) da enzima transcriptase reversa e respectivas curvas de dissociação, utilizando os iniciadores para o gene TNF- $\alpha$ . A) Amplificação das diluições seriadas do controle positivo para TNF- $\alpha$  variando entre  $10^{-4}$  e  $10^{-9}$ . B) Curva de dissociação dos amplificados em A, com a temperatura de dissociação igual a 85°C. C) Amplificação do cDNA de células não infectadas (MOCK) e infectadas pelo CPXV, respectivamente, utilizando iniciadores para o gene TNF- $\alpha$ . A curva de dissociação das amplificados é igual a da curva padrão relativa.**



**FIGURA 10 - Gráficos representativos da amplificação tanto da curva padrão relativa quanto de cDNAs resultantes da reação de transcrição reversa na presença (com RT) ou na ausência (sem RT) da enzima transcriptase reversa e respectivas curvas de dissociação, utilizando os iniciadores para o gene IL-6. A) Amplificação das diluições seriadas do controle positivo para IL-6 variando entre  $10^{-5}$  e  $10^{-10}$ . B) Curva de dissociação dos amplificados em A, com a temperatura de dissociação igual a  $79,4^\circ\text{C}$ . C e D) Amplificação do cDNA de células não infectadas (MOCK) e infectadas pelo CPXV, respectivamente, utilizando iniciadores para o gene IL-6. F) Curva de dissociação dos amplificados em D e E.**

## **2. Expressão e secreção de IL-6 durante infecção pelo VACV e CPXV nos MEFs JNK WT e KO**

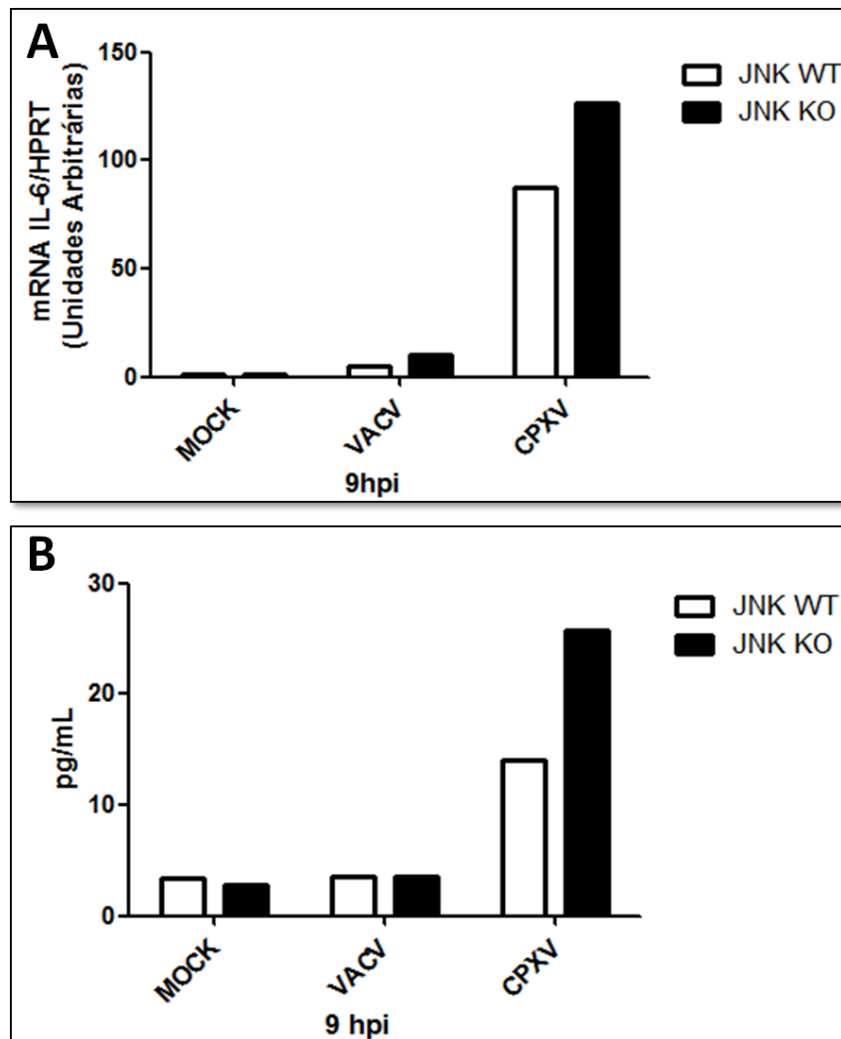
Estudo prévios realizados pelo Grupo de Transdução do Sinal (PEREIRA, 2007; SOARES, 2007; LEITE, 2010) mostraram que as MAPKs JNK1/2 são ativadas pelos vírus VACV e CPXV durante toda a infecção. Em relação ao VACV, sabe-se que essa via está relacionada à regulação do citoesqueleto celular e da disseminação das formas envelopadas EEV durante a infecção por esse vírus (PEREIRA *et al.*, 2012). Sabendo que, além do papel de JNK1/2 na regulação do citoesqueleto, essas proteínas também participam de diversas outras respostas biológicas da célula, decidiu-se verificar outros possíveis papéis dessas MAPKs durante a infecção pelos vírus VACV e CPXV, como por exemplo, na resposta inflamatória celular desencadeada durante a infecção viral.

Diversos trabalhos já demonstraram que diversos fibroblastos são capazes de expressar a citocina pró-inflamatória IL-6 após diferentes estímulos, inclusive após infecções virais (VAN DAMME, *et al.*, 1989; KURANE *et al.*, 1992; APTE, 1995; MOLET *et al.*, 2001; BOTERO *et al.*, 2008; TURNER *et al.*, 2009; PARK, *et al.*, 2011). Assim, decidiu-se verificar como se daria a expressão do mRNA de IL-6 nos MEFs selvagem e nocaute para JNK1/2, após 9 horas de infecção pelos vírus VACV e CPXV, através de qPCR. Como observado na FIGURA 11A, ocorre um aumento de transcritos de IL-6 após infecção pelos dois vírus quando comparados às células não infectadas (MOCK). Entretanto, a expressão do mRNA de IL-6 induzida pelo VACV é muito baixa, chegando a cerca de 20 vezes menos que a expressão induzida pelo CPXV.

Pode-se observar também que a expressão de transcritos de IL-6 nos MEFs JNK1/2 KO é superior à expressão nos MEFs WT, tanto na infecção pelo VACV quanto no CPXV, chegando a aumentar 1,5 vez nas células KO em relação as WT, após a infecção pelo CPXV.

A fim de se corroborar que a expressão aumentada de transcritos de IL-6 também acarretava na tradução desta citocina, decidiu-se analisar sua secreção através de ELISA, seguindo as mesmas condições acima. Como pode ser observado na FIGURA 11B, a infecção pelo VACV aparentemente não acarretou na produção de IL-6, uma vez que a quantidade desta citocina ficou praticamente igual

aos níveis das células não infectadas. Entretanto, confirmando os dados da qPCR, a infecção pelo CPXV leva a uma indução não só da transcrição, como da tradução e secreção de IL-6. Também podemos observar que essa produção é ainda maior nos MEFs JNK1/2 KO quando comparados aos MEFs selvagens.

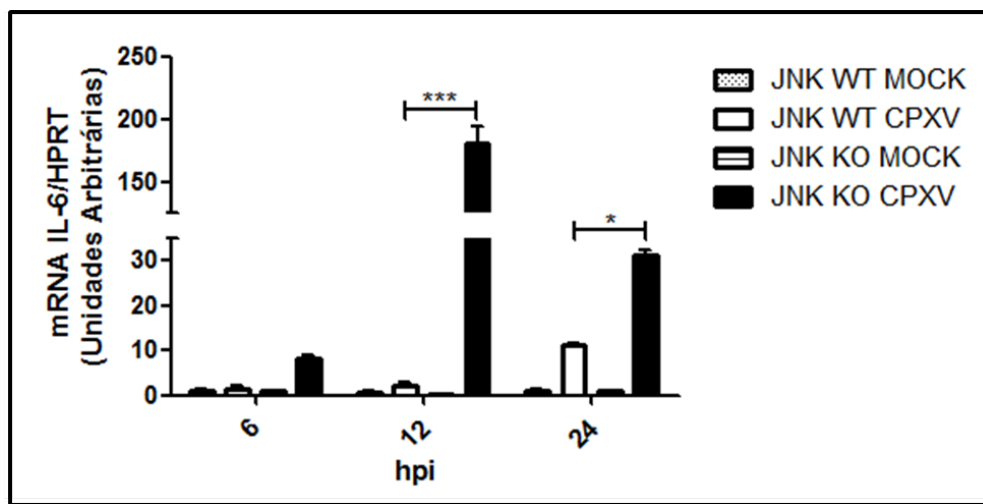


**FIGURA 11 - Expressão e secreção de IL-6 após infecção pelo vírus VACV e CPXV em MEFs JNK1/2 WT e KO.** A) RNA total extraído de MEFs WT e KO em A e B, foram tratados com DNase, submetidos a transcrição reversa seguida de PCR em tempo real para a detecção dos níveis de expressão de IL-6. Cada reação foi feita em duplicata e a expressão de IL-6 foi normalizada em relação ao gene constitutivo HPRT. As análises foram feitas pelo método da curva padrão relativa. B) Sobrenadante coletado dos MEFs WT e KO foram submetidos a teste de ELISA para a detecção da produção de IL-6.

### **3. Cinética de expressão de IL-6 durante infecção pelo CPXV nos MEFs JNK1/2 WT e KO**

Uma vez que a infecção pelo VACV parece não induzir a transcrição de IL-6 nem a sua produção, decidiu-se analisar somente o efeito da infecção pelo CPXV na cinética de expressão e produção desta citocina nos MEFs JNK1/2 WT e KO, a fim de se determinar quão significativo seria o papel dessa MAPK na regulação da produção de IL-6 após a infecção viral.

Assim, MEFs JNK1/2 WT e KO foram infectados pelo CPXV, durante os tempos de 6, 12 e 24 horas, e o RNA total foi extraído para realização de qPCR. Assim como no resultado mostrado anteriormente, observou-se um aumento de expressão do mRNA de IL-6 nos MEFs deficientes em JNK1/2 em comparação aos selvagens, em todos os tempos analisados (FIGURA 12), sendo a diferença significativa nos tempos de 12 e 24 horas após a infecção ( $p < 0.001$  e  $p < 0.05$ , respectivamente). Em 12 hpi, a quantidade relativa de transcritos de IL-6 chega a ser aproximadamente 100 vezes maior nos MEFs nocaute em comparação aos selvagens. Observa-se também que a expressão do mRNA de IL-6 é bem baixa no tempo de 6 hpi, atingindo seu pico máximo no tempo de 12 hpi nas células KO e 24 hpi nas células WT.



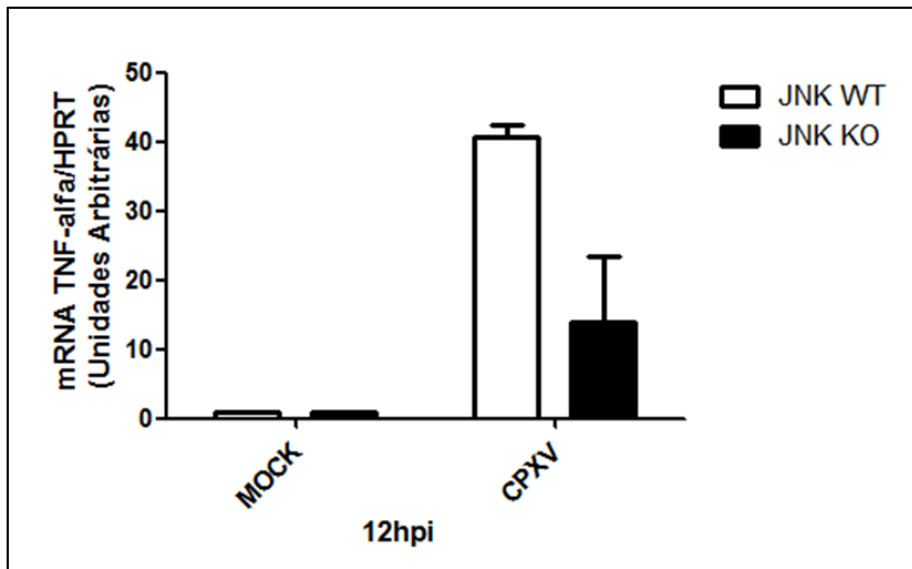
**FIGURA 82 - Expressão de transcritos de IL-6 durante a infecção pelo vírus CPXV em MEFs JNK1/2 WT e KO.** MEFs WT e KO foram ou não infectados pelo CPXV durante 6, 12 e 24 horas, para detecção dos níveis de expressão do mRNA de IL-6. As reações de PCR em tempo real foram feitas em duplicatas, após extração de RNA, tratamento com DNase e transcrição reversa. A expressão de IL-6 foi normalizada em relação ao gene constitutivo HPRT. As análises foram feitas pelo método da curva padrão relativa. A análise estatística foi feita utilizando-se teste Two-way ANOVA, e as barras representam o S.E.M. \*\*\*  $p < 0.001$  e \*  $p < 0.05$  indica as diferenças entre as barras apontadas.

#### **4. Expressão de TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-12 durante infecção pelo CPXV nos MEFs JNK1/2 WT e KO**

Também foi analisada a expressão dos mRNAs das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-10 e IL-12 nos MEFs JNK WT e KO infectados pelo CPXV. Para tal, MEFs JNK1/2 WT e KO foram infectados pelo CPXV, e após 12 horas, o RNA total foi extraído, processado e submetido a qPCR.

Em relação a IL-10 e IL-12, não foi possível detectar a expressão dessas citocinas pelos MEFs infectados ou não (dados não mostrados).

Já em relação à TNF- $\alpha$ , observa-se uma menor quantidade relativa desse transcrito nos MEFs KO quando comparados aos MEFs WT, em 12hpi (FIGURA 13). Entretanto, uma cinética para determinar como ocorre a expressão do mRNA dessa citocina durante a infecção ainda será realizada e analisada para confirmar o quão significativa seria a diferença observada.



**FIGURA 13 - Expressão de transcritos de TNF- $\alpha$  após infecção pelo vírus CPXV em MEFs JNK1/2 WT e KO.** MEFs WT e KO foram infectados ou não pelo vírus CPXV durante 12 horas, para detecção dos níveis de expressão de TNF- $\alpha$ . As reações de PCR em tempo real foram feitas em duplicatas, após extração de RNA, tratamento com DNase e transcrição reversa. A expressão de TNF- $\alpha$  foi normalizada em relação ao gene constitutivo HPRT. As análises foram feitas pelo método da curva padrão relativa. A análise estatística foi feita utilizando-se teste Two-way ANOVA, e as barras representam o S.E.M.

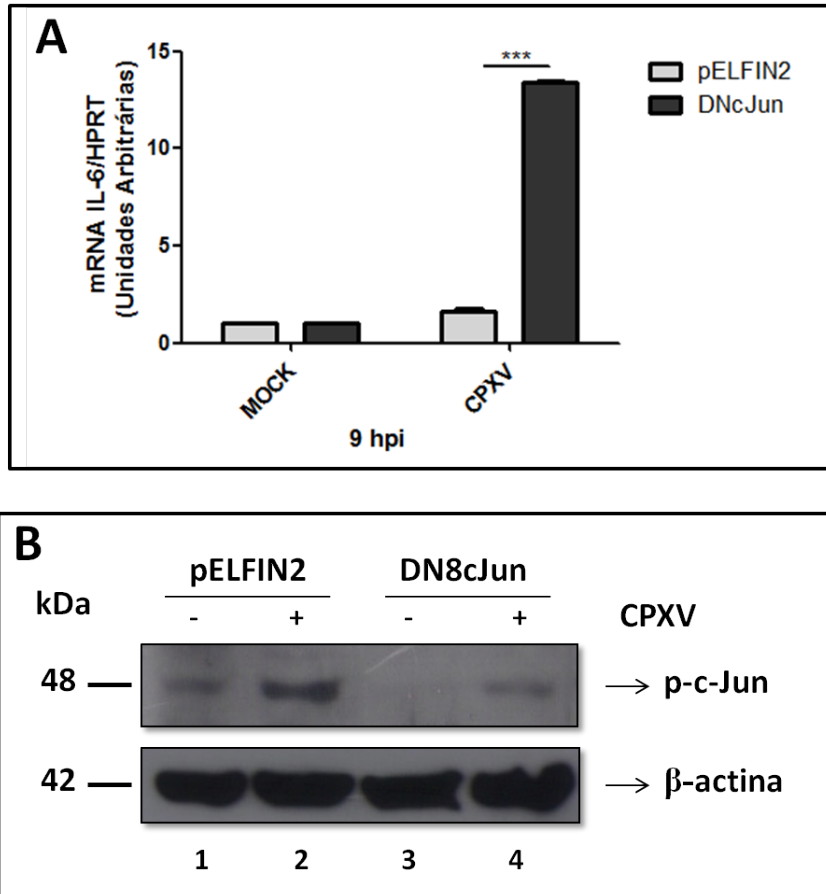
## **5. Expressão de IL-6 durante infecção pelo CPXV nas células expressando dominância negativa de c-Jun**

LEITE, em 2010, demonstrou que o fator transcricional c-Jun é um dos alvos de ativação das MAPKs JNK1/2 durante infecção pelo VACV e CPXV. Decidiu-se então, verificar se c-Jun também estaria tendo um papel na regulação da expressão do mRNA de IL-6 durante infecção pelo CPXV. Para tal, células A31 controle (transfectadas com o vetor vazio pELFIN2), ou expressando dominância negativa para c-Jun (DN8cJun), foram infectadas pelo CPXV. Após 9 horas de infecção, as células tiveram seu RNA total extraído, processado e submetido a qPCR.

Observou-se que na condição de dominância negativa para o fator transcricional c-Jun, ocorre um aumento significativo ( $p < 0.001$ ), cerca de 12 vezes mais, da expressão de transcritos de IL-6 em comparação com as células controle, após a infecção pelo CPXV (FIGURA 14A). O mesmo experimento foi feito após infecção pelo VACV (dados não mostrados) e observa-se que a expressão de IL-6 nas células pELFIN (controle) após a infecção pelo VACV é semelhante ao MOCK, havendo um aumento da expressão dessa citocina nos DN, porém, assim como observado nos MEFs, essa expressão é muito pequena se comparada à induzida pelo CPXV. Pode-se verificar também que essas células (A31) expressam níveis bem menores de transcritos de IL-6 (FIGURA 12 e 14A), em comparação aos MEFs.

Paralelamente, foi realizada a extração de proteínas totais de ambas as células infectadas ou não pelo CPXV para confirmar a ativação de c-Jun nas células controle durante a infecção, bem como a dominância negativa nas células DN, como pode ser visto na FIGURA 14B, canaletas 2 e 4.

Em conjunto, esses resultados sugerem que há uma regulação negativa da expressão de mRNA de IL-6 pela via JNK/c-Jun após a infecção pelo CPXV, uma vez que quando essa via é inibida, há um aumento significativo da expressão de transcritos dessa citocina.



**FIGURA 14 - Expressão de transcritos de IL-6 após infecção pelo vírus CPXV em células A31 transfectadas com o vetor vazio (pELFIN2) e expressando dominância negativa para c-Jun (DN8cJun).** A) As células pELFIN2 ou DN8cJun foram infectadas ou não pelo vírus CPXV durante 9 horas, para detecção dos níveis de expressão de IL-6. As reações de PCR em tempo real foram feitas em duplicatas, após extração de RNA, tratamento com DNase e transcrição reversa. A expressão de IL-6 foi normalizada em relação ao gene constitutivo HPRT. As análises foram feitas pelo método da curva padrão relativa. A análise estatística foi feita utilizando-se teste Two-way ANOVA, e as barras representam o S.E.M.. \*\*\*  $P < 0.001$  indica as diferenças entre as barras apontadas. B) As células pELFIN2 ou DN8cJun foram ou não infectadas pelo vírus CPXV durante 9 horas. Proteínas totais foram extraídas e submetidas (30 $\mu$ g) a fracionamento eletroforético seguida de transferência para membrana de nitrocelulose. Após bloqueio de sítios inespecíficos, as membranas foram incubadas com anticorpo primário anti-p-c-Jun (diluição 1:1000), seguido de incubação com anticorpo secundário conjugado à peroxidase (diluição 1:3000) e revelação. O controle interno das quantidades de proteínas foi feito pelo uso do anticorpo primário anti- $\beta$ -actina (diluição 1:3000). As massas moleculares das proteínas são indicadas na direita da FIGURA. Estes resultados são representativos de pelo menos duas repetições experimentais.

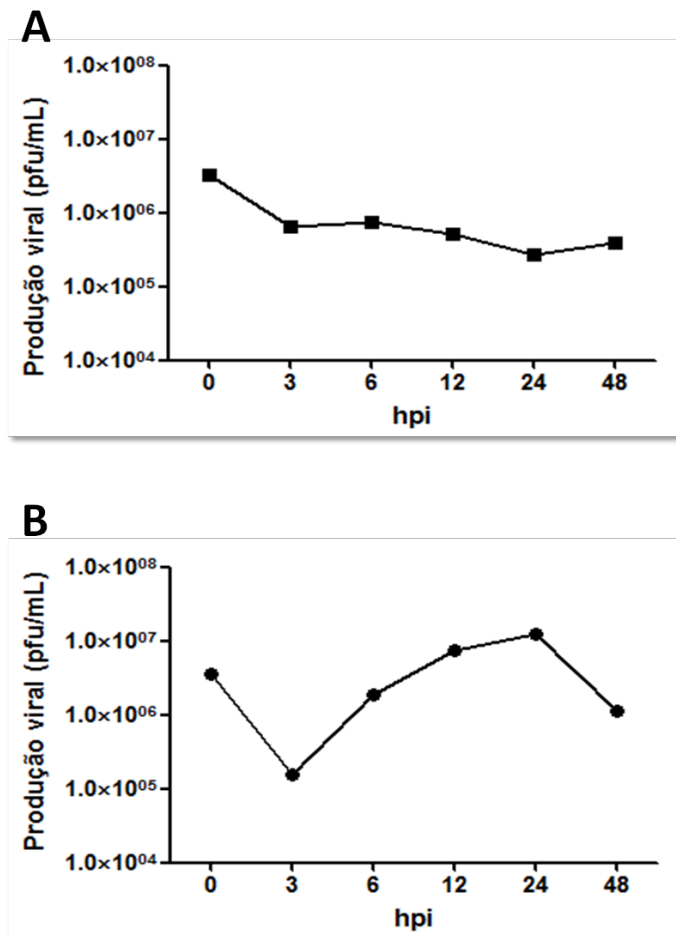
## **6. Avaliação da multiplicação do CPXV e da ativação de JNK1/2 após a infecção em macrófagos primários e transformados (células RAW 264.7)**

Uma vez que macrófagos são células inflamatórias típicas produtoras de citocinas, decidiu-se investigar os efeitos da inibição da via JNK/c-Jun sobre a expressão do mRNA das citocinas IL-6 e TNF- $\alpha$  após infecção pelo CPXV nessas células. Assim, tanto cultivo primário de macrófagos intraperitoneais de camundongo (M $\Phi$ ), induzidos pelo tioglicolato, como a linhagem RAW 264.7 de macrófagos transformados de camundongos, foram infectados a fim de se tentar corroborar os resultados obtidos em fibroblastos.

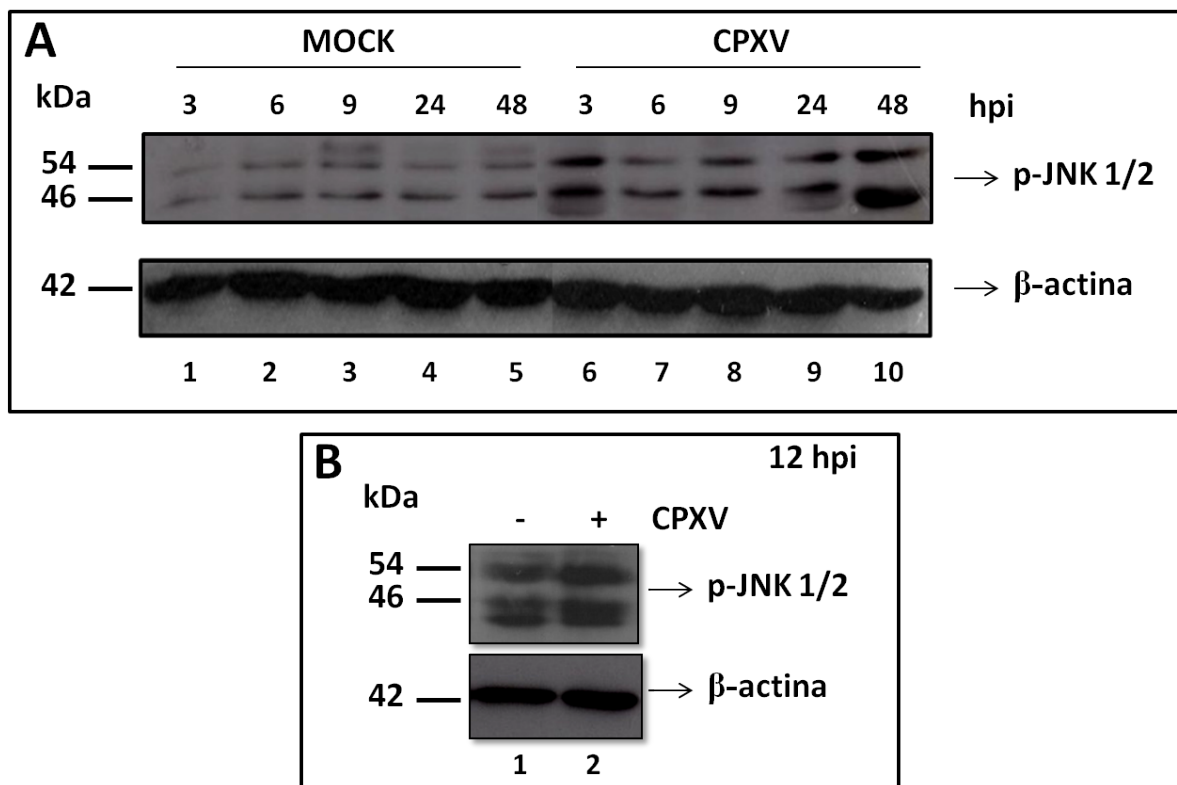
Primeiramente, foi avaliada tanto a multiplicação do CPXV nessas células, quanto à ativação de JNK1/2 após infecção por esse vírus. Como mostrado na FIGURA 15A, os M $\Phi$  não foram permissivos a multiplicação do CPXV uma vez que o número de partículas infecciosas diminuiu em relação ao inóculo (0 hpi) e permaneceu constante durante todo o ciclo de multiplicação. Diferentemente, as células RAW foram permissivas à multiplicação do CPXV, atingindo o pico da produção da progênie após 24 horas da infecção (FIGURA 15B). Entretanto, essa multiplicação observada nas células RAW é relativamente pequena quando comparada a outras células, como, por exemplo, fibroblastos.

Em seguida, avaliamos se a infecção pelo CPXV também seria capaz de ativar as MAPKs JNK1/2, assim como é visto nos MEFs. Conforme pode ser observado na FIGURA 18A, apesar das células não infectadas (MOCK) apresentarem um nível basal de fosforilação de JNK1/2, a infecção pelo CPXV promove uma ativação sustentada dessas MAPKs, ainda que discreta, nos M $\Phi$ , de 3 a 48 horas pós-infecção, apresentando pico em 48 hpi (FIGURA 16A, canaleta 10).

Entretanto, nas células RAW, apesar de ainda não dispormos dos resultados completos sobre a cinética viral de fosforilação de JNK1/2, uma vez que só foi analisado o tempo de 12hpi, a infecção pelo CPXV não parece aumentar os níveis de fosforilação de JNK1/2, quando comparados com aqueles observados nas células não infectadas (MOCK), como pode ser visto na FIGURA 16B, canaletas 1 e 2.



**FIGURA 15 - Multiplicação do CPXV em macrófagos de camundongo.** Macrófagos intraperitoneais de camundongos induzidos por tioglicolato (A) ou células RAW 264.7 (B) foram infectadas com CPXV a MOI de 5. Após diferentes tempos de infecção, as monocamadas celulares foram congeladas com 1 mL de PBS cada. Posteriormente, após três ciclos de congelamento e descongelamento, os sobrenadantes clarificados foram titulados em células BSC-40. Estes resultados foram repetidos pelo menos duas vezes em A e uma vez em B.



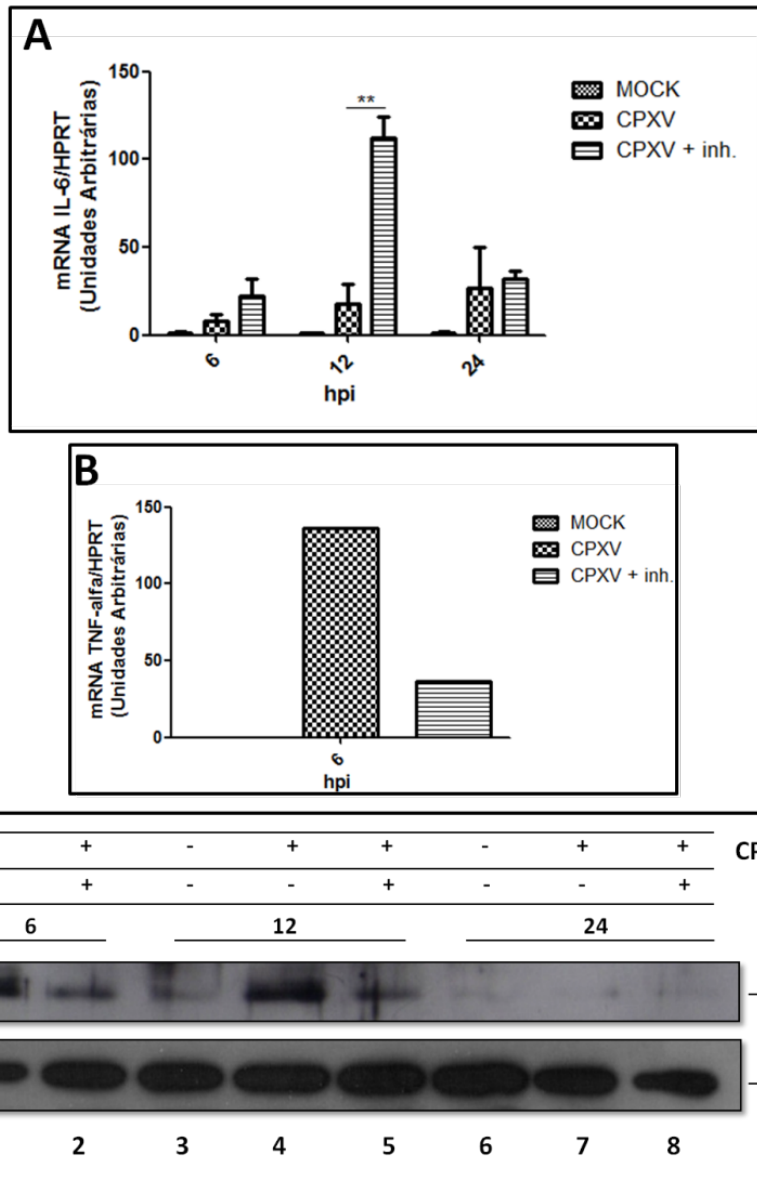
**FIGURA 16 - Cinética de fosforilação das MAPKs JNK1/2 durante infecção pelo vírus CPXV em macrófagos de camundongo.** Extratos protéicos totais (30µg) de macrófagos intraperitoneais de camundongos induzidos por tioglicolato (A) ou células RAW 264.7 (B) infectadas ou não pelo CPXV a MOI de 5, nos tempos indicados, foram submetidos a fracionamento eletroforético seguida de transferência para membrana de nitrocelulose. Após bloqueio de sítios inespecíficos, as membranas foram incubadas com anticorpo primário anti-p-JNK (diluição 1:1000), seguido de incubação com anticorpo secundário conjugado à peroxidase (diluição 1:3000) e revelação. O controle interno das quantidades de proteínas foi feito pelo uso do anticorpo primário anti-β-actina (diluição 1:3000). As massas moleculares das proteínas são indicadas na direita da FIGURA. Estes resultados foram repetidos pelo menos duas vezes em A e uma vez em B.

## 7. Expressão de IL-6 e TNF- $\alpha$ em macrófagos primários e transformados (células RAW 264.7) após infecção pelo CPXV

Após a análise da multiplicação do CPXV e da fosforilação de JNK1/2 nos macrófagos, prosseguiu-se análise da expressão de citocinas após a infecção por esse vírus nos macrófagos de camundongo. Para tal, utilizou-se o inibidor farmacológico JNK inhibitor VIII (inh.), o qual inibe a fosforilação de c-Jun, um substrato direto de JNK (SZCZEPANKIEWICZ *et al.*, 2006; TURPEINEN *et al.*, 2010). M $\Phi$  foram então tratados ou não com a concentração de 4 $\mu$ M desse inibidor, infectadas ou não pelo CPXV durante 6, 12 e 24 horas, seguido pela extração do RNA total, que foi tratado com DNase, submetido a RT-PCR e qPCR. Paralelamente, foi realizada a extração de proteínas totais para confirmar a eficiência do inibidor utilizado.

Como podemos observar na FIGURA 17A, ocorre um aumento da expressão de transcritos de IL-6 nas células infectadas em comparação com o MOCK, em todos os tempos analisados, e esse aumento é ainda maior na presença do inibidor de JNK, sendo significativo no tempo de 12hpi ( $p < 0.01$ ). A ação do inibidor nesse tempo é confirmado pela diminuição da fosforilação do substrato de JNK, o fator transcricional c-Jun (FIGURA 17C, canaleta 5). Em 6hpi, também foi observado um aumento do mRNA de IL-6 na presença do inibidor, porém a expressão de IL-6 induzida pelo CPXV é ainda baixa após esse tempo. A ação do inibidor também foi confirmada nesse tempo (FIGURA 17C, canaleta 2). Em 24hpi, os níveis de expressão de transcritos IL-6 de após a infecção pelo vírus foi praticamente a mesma independente da presença do inibidor, o que pode ser explicado pela ausência de fosforilação de c-Jun nas duas condições.

Já para TNF- $\alpha$ , só foi possível utilizar os dados da expressão desta citocina nesse experimento em 6 hpi, uma vez que nos outros tempos a reação de qPCR apresentou curvas de dissociação inespecíficas e por isso não foram consideradas. Mas como pode ser observado na FIGURA 17B, o tratamento com o inibidor de JNK1/2 levou a diminuição da expressão de transcritos de TNF- $\alpha$  após a infecção pelo CPXV, quando comparado aos M $\Phi$  não infectados. Esse resultado ainda precisa ser repetido, porém confirma o que foi observado nos MEFs para essa citocina.

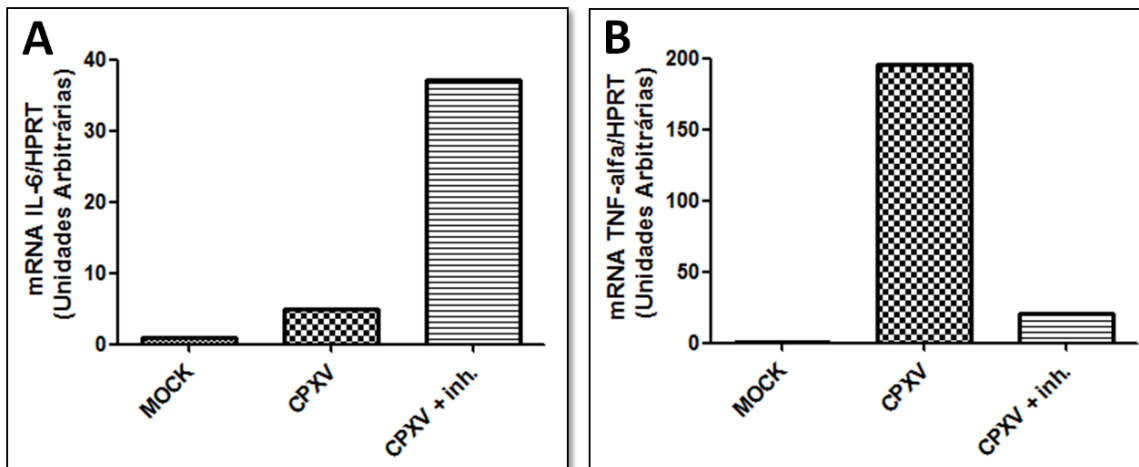


**FIGURA 17 – Expressão de transcritos de IL-6 e TNF- $\alpha$  durante infecção pelo vírus CPXV em macrófagos intraperitoneais de camundongo.** Macrófagos intraperitoneais de camundongos induzidos por tioglicolato foram infectados ou não pelo CPXV a MOI de 5, nos diferentes tempos indicados, tratados ou não com o JNK inh. VIII. Em (A) e (B) as reações de PCR em tempo real foram feitas em duplicatas, após extração de RNA, tratamento com DNase e transcrição reversa. As expressões de IL-6 e TNF- $\alpha$  foram normalizadas em relação ao gene constitutivo HPRT. As análises foram feitas pelo método da curva padrão relativa. A análise estatística foi feita utilizando-se teste Two-way ANOVA, e as barras representam o S.E.M. \*\* $p < 0.01$  indica as diferenças entre as barras apontadas. Em (C) extratos protéicos totais (30 $\mu$ g) foram submetidos a fracionamento eletroforético seguida de transferência para membrana de nitrocelulose. Após bloqueio de sítios inespecíficos, as membranas foram incubadas com anticorpo primário anti-p-c-Jun (diluição

1:1000), seguido de incubação com anticorpo secundário conjugado à peroxidase (diluição 1:3000) e revelação. O controle interno das quantidades de proteínas foi feito pelo uso do anticorpo primário anti- $\beta$ -actina (diluição 1:3000). As massas moleculares das proteínas são indicadas na direita da FIGURA. Estes resultados foram repetidos pelo menos duas vezes para a expressão de IL-6 e uma vez para a expressão de TNF- $\alpha$ .

Para os experimentos realizados com as células RAW 264.7, estas foram tratadas ou não com o inibidor VIII de JNK, infectadas pelo CPXV durante 12 horas, e o RNA total foi extraído, tratado com DNase, submetido a RT-PCR e qPCR. Como observado na FIGURA 18A, também houve um aumento na expressão de transcritos de IL-6 nas células infectadas pelo CPXV e tratadas com inh. VIII, em relação às células infectadas, porém sem o tratamento. Na FIGURA 18B, também observamos uma diminuição na expressão de transcritos de TNF- $\alpha$  nas células tratadas e infectadas quando comparadas às não tratadas.

Os experimentos conduzidos com as células RAW 264.7 foram realizados apenas uma vez, devido à limitação de tempo, e ainda precisam ser confirmados, incluindo o controle de extração de proteínas para confirmar a eficácia do inibidor utilizado. Entretanto, como esses resultados estão em linha com aqueles anteriores obtidos nas outras células, eles foram incluídos nesta dissertação.



**FIGURA 18 - Expressão de transcritos de IL-6 e TNF- $\alpha$  durante infecção pelo vírus CPXV em células RAW 264.7.** Células RAW foram infectados ou não pelo CPXV a MOI de 5, tratadas ou não com o inibidor VIII de JNK, por 12 horas. O RNA total extraído foi submetido ao tratamento com DNase, e, posteriormente, transcrição reversa seguida de PCR em tempo real em duplicata, para a detecção dos níveis de expressão de IL-6 em (A) e TNF- $\alpha$  em (B). A expressão desses genes foi normalizada em relação ao gene constitutivo HPRT. As análises foram feitas pelo método da curva padrão relativa. Esse experimento só foi realizado uma vez.

## VI. DISCUSSÃO

Estudos realizados pelo Grupo de Transdução do Sinal do Laboratório de Vírus demonstraram que os vírus VACV e CPXV são capazes 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; SOARES *et al.*, 2009, PEREIRA *et al.*, 2012). Foi demonstrado que esses vírus induzem a ativação precoce da via MKK4/7/JNK1/2, sendo essa ativação sustentada durante todo o ciclo de multiplicação viral em fibroblastos murinos. (SOARES, 2007; PEREIRA *et al.*, 2012). Durante a infecção pelo VACV, a fosforilação do fator de transcrição c-Jun é regulada temporalmente por ERK e JNK, enquanto que CPXV regula a expressão de c-Jun através de JNK1/2 apenas, exercendo papéis distintos na biologia destes *Orthopoxvirus*, ora afetando a multiplicação (ERK) ou a disseminação (JNK) da progênie viral (PEREIRA, 2007; LEITE *et al.*, 2012 - em preparação; PEREIRA, *et al.*, 2012).

Além desses resultados, estudos anteriores do nosso grupo também tentaram esclarecer se a via das MAPKs JNK1/2 estaria envolvida na resposta celular antiviral, porém os resultados não foram conclusivos. Dessa maneira, decidiu-se continuar a investigar a contribuição dessas quinases na expressão de citocinas inflamatórias durante a infecção pelo VACV e CPXV.

Sabe-se que IL-6 é uma citocina pleiotrófica com papéis na sobrevivência, diferenciação e proliferação celular, bem como na inflamação. É uma citocina importante no desencadeamento das respostas antivirais, levando tanto a produção de anticorpos como a diferenciação de linfócitos T citotóxicos, possuindo papel importante no controle de infecções virais crônicas (HIRANO *et al.*, 1991; HARKER *et al.*, 2011). Assim, decidiu-se primeiramente, fazer a análise da expressão do mRNA da citocina pró-inflamatória IL-6 após infecção pelo VACV e CPXV em MEFs, uma vez que já havia sido relatada a indução da transcrição e secreção dessa citocina induzidas pela infecção do VACV em fibroblastos (ROKITA *et al.*, 1998). Foi observado que há uma substancial maior expressão de mRNA e produção de IL-6 após a infecção pelo CPXV em MEFs, quando comparados à infecção pelo VACV (Figura 11A e B). Estes dados *in vitro* estão de acordo com resultados *in vivo* obtidos por KNORR *et al.* (2006), que mostraram que a infecção de camundongos

pelo CPXV também induz a produção de uma quantidade bem maior de citocinas que a infecção pelo VACV, incluindo a citocina pró-inflamatória IL-6.

Observamos também que na ausência de JNK1/2, ocorre a indução da expressão e secreção ainda maior dessa citocina, após infecção pelos dois vírus, principalmente o CPXV (FIGURA 11A e B).

Uma vez que o VACV não foi capaz de induzir uma expressão considerável de IL-6 em comparação com o CPXV, decidimos focar os esforços somente na infecção pelo CPXV. A fim de determinar quão significativo seria a diferença da expressão de transcrito de IL-6 em MEFs JNK1/2 WT e KO, foi realizada uma cinética de expressão dessa citocina nessas células. Foi observado um aumento significativo da expressão de mRNA dessa citocina nas células deficientes em JNK1/2 em relação às selvagens nos tempos de 12 e 24 hpi (FIGURA 12).

Com o objetivo de determinar a participação de c-Jun, substrato de JNK1/2, na regulação da expressão de IL-6, células A31 controle (transfectadas com o vetor vazio pELFIN2) ou expressando dominância negativa para esse fator transcricional foram infectadas pelo CPXV (DNc-Jun). Como observado na FIGURA 14A, as células DN tiveram uma expressão significativamente maior de transcritos de IL-6 em relação as células controle. Observa-se que mesmo a fosforilação de c-Jun não sendo abolida completamente nas células DN, a diminuição da ativação desse fator transcricional reflete numa maior expressão de IL-6 nessas células.

Uma vez que macrófagos são células inflamatórias tipicamente produtoras de citocinas, decidimos por avaliar se JNK1/2 também estaria regulando a expressão de IL-6 nessas células durante a infecção pelo CPXV. Para tal, primeiramente avaliamos a multiplicação desse vírus tanto em cultivo primário de macrófagos intraperitoniais ( $M\Phi$ ), quanto na linhagem RAW 264.7 de macrófagos transformados. Observamos que enquanto os  $M\Phi$  não são permissivos a multiplicação do CPXV, esse vírus consegue se multiplicar, ainda que modestamente, nas células RAW 264.7 (FIGURA 15 A e B). Nossos resultados nos  $M\Phi$  são semelhantes aos obtidos já em 1979, quando BUCHMEIER e colaboradores demonstraram que a infecção pelo VACV em macrófagos de coelhos era abortiva e sabe-se também que isso ocorre em macrófagos intraperitoniais de

camundongos (HUMLOVA *et al.*, 2002). A diferença da multiplicação do CPXV nas células RAW em relação aos MΦ pode ser atribuída ao fato dessas células serem transformadas, o que reacende a dúvida se essas células seriam modelos válidos no estudo da resposta do hospedeiro à infecção viral.

Sobre a ativação de JNK1/2 nessas células, foi observado que nos MΦ, há uma ativação sustentada dessa MAPK de 3 a 48 hpi (FIGURA 16A), embora mais modesta do que demonstrado para fibroblastos murinos após infecção pelo VACV e CPXV (SOARES, 2007; PEREIRA *et al.*, 2012). Resultados preliminares obtidos nas células RAW, onde só o tempo de 12 hpi foi analisado, não foi observada uma ativação dessas MAPKs em resposta a infecção viral, uma vez que nas células não infectadas já foram observados níveis elevados de fosforilação dessa MAPK (FIGURA 16B). Entretanto, ainda é necessário a confirmação desse resultado e a análise da ativação de JNK1/2 nessas células em outros tempos de infecção pelo CPXV.

Prosseguindo, foi feita a análise do papel da JNK1/2 na expressão de mRNA de IL-6 nos MΦ e nas células RAW, através do tratamento celular pelo inibidor farmacológico JNK inh. VIII. Assim como observados nos MEFs JNK1/2 KO, a deficiência em JNK leva a um aumento dos transcritos de IL-6 nos MΦ, sendo a diferença significativa após 12 horas de infecção pelo CPXV (\*\*  $p < 0.01$ ), nas células tratadas quando comparadas as não tratadas (FIGURA 17A). No tempo de 6 hpi, apesar de haver um aumento da expressão de IL-6 nas células tratadas, a diferença entre elas não foi significativa, provavelmente devido à baixa expressão dessa citocina nesse tempo. Em 24 hpi, não observamos diferença nas duas condições, associada a níveis indetectáveis de c-Jun fosforilado nesse tempo, independente ou não do tratamento com o inibidor, o que reforça o papel da via JNK/c-Jun na regulação da expressão de IL-6 (FIGURA 17C).

Nas células RAW, também foi observado a maior quantidade relativa de transcrito de IL-6 nas células tratadas com inibidor, em comparação com as não tratadas (FIGURA 20A). Entretanto, não foi possível fazer a análise estatística dessa diferença e esse experimento ainda deverá ser confirmado, utilizando ainda um controle para confirmar a atividade do JNK inhibitor VIII.

Em paralelo, foi realizada a análise da expressão da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$ , tanto em MEFs, quanto nos macrófagos. A expressão de TNF- $\alpha$  após infecção por *Orthopoxvirus* já havia sido demonstrada por ROKITA e colaboradores em 1998. Nossos resultados preliminares demonstraram que em todas as células, a inibição de JNK1/2 leva à diminuição na expressão de transcritos dessa citocina após a infecção pelo CPXV (FIGURAS 13, 17B e 18B). É importante ressaltar que TNF- $\alpha$  é uma citocina pró-inflamatória extremamente importante nas defesas iniciais contra infecções (SARAIVA & ALCAMI, 2001). Talvez seja essa uma explicação para a dificuldade na detecção dessa citocina em tempos mais tardios da infecção pelo CPXV. Entretanto, esses resultados ainda precisam ser repetidos e confirmados para análise estatística de quão significativa seria essa redução e qual a influência do tempo de infecção na expressão dessa citocina.

Vários estudos já relacionaram o papel de JNK1/2 e outras MAPKs na expressão de TNF- $\alpha$ , mostrando que a inibição de JNK resultava numa diminuição da expressão desta citocina TNF- $\alpha$  (RINCÓN & DAVIS, 2009; TANABE *et al.*, 2010; XU *et al.*, 2011). Entretanto, apesar do importante papel desempenhado por essa citocina na resposta antiviral, ela não deve possuir papel relevante contra infecções pelo CPXV, uma vez que esse vírus e outros *Orthopoxvirus* codificam diversos receptores solúveis de citocinas, entre eles receptores de TNF- $\alpha$ , impedindo, então, a atividade desta citocina nas resposta celular antiviral (SARAIVA & ALCAMI, 2001; READING *et al.*, 2002).

Também tentou-se determinar a participação de JNK1/2 na regulação da expressão da citocina anti-inflamatória IL-10 e da citocina pró-inflamatória IL-12, entretanto, apesar de já ter sido descrito a indução de IL-10 *in vitro* e *in vivo* pelo CPXV (SPESOCK *et al.*, 2011), não foi possível detectar a expressão dessas citocinas em fibroblastos murinos. Contudo, ainda serão feitos estudos em outras células, tais como macrófagos de camundongos, para avaliação do papel de JNK na expressão dessas citocinas.

Em conjunto, esse resultados sugerem a participação das MAPKs JNK1/2 na regulação negativa da expressão de mRNA da citocina pró-inflamatória IL-6, uma vez que na ausência dessas MAPKs observamos um aumento tanto nos transcritos, quanto na secreção da citocina, em todos os modelos celulares testados. Essa

regulação, aparentemente, é feita via o substrato de JNK1/2, c-Jun, uma vez que a expressão de um mutante dominante negativo desse fator transcricional também leva a um aumento da expressão do mRNA de IL-6. Já foi descrito que a ausência do fator transcricional JunB, outro substrato de JNK, em tecido epiteliais, leva a um aumento dos níveis de IL-6 (SCHONTHALER *et al.*, 2011).

Vários estudos já relacionaram a via das MAPKs, não só a de JNK1/2, na regulação da expressão de IL-6. Já foi observado, por exemplo, que a inibição de JNK pelo JNK inibidor VIII, não altera a expressão de IL-6 em células pulmonares epiteliais A549, e que, neste caso, a MAPK p38 estaria participando da regulação da expressão desta citocina (TURPEINEN *et al.*, 2010). Em outro trabalho, mostrou-se que a MAPK ERK1/2 estaria regulando a produção de IL-6 em células ativadas da micróglia (KIM *et al.*, 2010). Contudo, a maior parte dos trabalhos encontrados na literatura demonstra que a inibição de JNK1/2 leva a uma redução da expressão e secreção de IL-6, em diversos modelos estudados, inclusive após infecções virais (KRAUSE *et al.*, 1998; TUYT *et al.*, 1999; XIE *et al.*, 2005; MENDIS *et al.*, 2008; TZANG *et al.*, 2009; TANABE *et al.*, 2010; KANG *et al.*, 2011; KIM & JOO, 2011; KATO *et al.*, 2012).

Entretanto, WILLIAMS e colaboradores mostraram em 2007, que o inibidor farmacológico SP600125, que apesar de ser inespecífico leva a inibição da MAPK JNK1/2 (PEREIRA *et al.*, 2012), foi responsável pelo aumento da expressão de mRNA de IL-6, bem como pela diminuição da expressão de mRNA de TNF- $\alpha$ , em um modelo animal de inflamação pulmonar. Esses dados são semelhantes aos que observamos tanto para IL-6, quanto para TNF- $\alpha$ , após a infecção pelo CPXV em MEFs JNK1/2 KO. Dados não publicados do nosso grupo, também observaram uma maior expressão de IL-6 em macrófagos intraperitoniais tratados com SP600125 após infecção pelos vírus VACV e CPXV, em comparação com as células não tratadas (ALBARNAZ e BONJARDIM, 2010 e LEITE e BONJARDIM, 2010, comunicação pessoal, dados não publicados).

Alguns estudos já mostraram diversas proteínas codificadas por *Orthopoxvirus* capazes de manipular a resposta imune do hospedeiro, entre elas a proteína A46, capaz de se ligar em moléculas adaptadores celulares e interferir na ativação das MAPKs e dos fatores transcricionais NF- $\kappa$ B e IRF-3, impedindo a

expressão de IFNs e citocinas pró-inflamatórias (PERDIGUERO & ESTEBAN, 2009; STACK *et al.*, 2005). Porém, ainda não existem dados relacionando a participação das MAPKs na expressão e produção de IL-6 após a infecção por Poxvírus. O mecanismo pelo qual a via JNK/c-Jun estaria inibindo a expressão de IL-6 ainda precisaria ser elucidado, bem como o efeito dessa inibição para a infecção viral.

Já foi demonstrado que camundongos deficientes em IL-6 têm uma atividade de células T citotóxica reduzida e um aumento do título viral do VACV, comparados aos camundongos selvagens, demonstrando que esses camundongos possuem uma capacidade reduzida em combater essa infecção viral e atribuindo a IL-6 um importante papel na resposta antiviral (BLUETHMANN *et al.*, 1994). Além disso, sabe-se que a redução da produção de citocinas pró-inflamatórias leva a uma diminuição da resposta imune do hospedeiro favorecendo a progressão da infecção viral (ROKITA *et al.*, 1998).

Uma hipótese seria que o CPXV, por possuir diversas proteínas imunomoduladoras, poderia levar a ativação de JNK1/2, e conseqüentemente uma menor expressão de IL-6, o que geraria uma menor resposta inflamatória, evitando, assim, a exacerbação dessa resposta, o que poderia ser desfavorável, tanto ao hospedeiro, quanto ao sucesso da infecção. Recentemente foi descrito que a proteína O1 do VACV é capaz de sustentar a ativação das MAPKs ERK1/2 induzida pela infecção viral, reforçando a idéia de que esses vírus desenvolveram múltiplas estratégias de modulação das vias de sinalização celulares a fim de favorecer o ambiente intracelular para sua replicação (SCHWENEKER *et al.*, 2011).

Apesar da varíola ter sido considerada erradicada, infecções causada por outros *Orthopoxvirus* tem sido diagnosticadas em várias regiões do mundo nas últimas década, incluindo infecções causadas pelo CPXV, *Monkeypox virus* e VACV (WIENECKE, 2000; McFADDEN, 2005; DA FONSECA *et al.*, 2011). Apesar dos casos de doença pelo CPXV não serem comuns em humanos, essa infecção é considerada grave, podendo ser letal, especialmente em indivíduos imunossuprimidos (BAXBY *et al.*, 1994; BAXBY *et al.*, 1997, McFADDEN, 2005). Assim, é necessário que os estudos acerca da biologia desse vírus continuem, de maneira a entender melhor como se dá a interação vírus-hospedeiro para que no futuro possam ser traçadas estratégias mais eficazes de combater não só as

infecções causadas pelo CPXV, mas também por outros Poxvírus zoonóticos emergentes.

## VII. CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados nesse trabalho, pode-se concluir que as MAPKs JNK1/2 participam da regulação da expressão das citocinas IL-6 e TNF- $\alpha$ , após infecção pelo *Orthopoxvirus Cowpox*, e que essa regulação ocorre tanto em fibroblastos, como em macrófagos. Entretanto, a regulação dos transcritos dessas duas citocinas pró-inflamatórias ocorreu de maneira diferente, uma vez que a expressão do mRNA de TNF- $\alpha$  diminui na ausência de JNK1/2, ao passo que a expressão do mRNA e a secreção de IL-6 aumenta na ausência dessas MAPKs.

Demonstrou-se também que o fator transcricional c-Jun, um dos principais substratos de JNK, também possui papel na regulação da expressão de IL-6, uma vez que a inibição desse fator leva a efeitos similares aos observados durante a inibição de JNK1/2. Dessa maneira, sugere-se que a via JNK/c-Jun estaria regulando negativamente a expressão de mRNA de IL-6 e, conseqüentemente, a sua secreção durante a infecção pelo CPXV. Aparentemente, essa regulação também pode ocorrer para o *Orthopoxvirus Vaccinia*, porém numa escala bem menor, haja visto que infecção pelo VACV não foi capaz de induzir os mesmos níveis relativos de transcritos de IL-6. Essa diferença é mais um indício de que esses *Orthopoxvirus* tão relacionados manipulam de maneira diferenciada as vias sinalizadoras celulares.

## **PERSPECTIVAS**

As perspectivas deste trabalho são:

- Confirmar os resultados de ativação de JNK1/2, bem como os resultados da expressão de citocinas, nas células RAW 264.7, através de transferência de Western e PCR em tempo real;
- Avaliar a participação das MAPKs JNK1/2 na produção de IL-6 e TNF- $\alpha$  após infecção pelo CPXV em MEFs e macrófagos de camundongos, através de ELISA;
- Avaliar a participação das MAPKs JNK1/2 na expressão de outras citocinas e quimiocinas, tais como IL-10, IL-12, RANTES, MCP-1, MIP1 $\alpha/\beta$  e IFN $\alpha/\beta$  após infecção de macrófagos de camundongo pelo CPXV, através de PCR em tempo real.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas, A. K., Lichtman, A. H., Pillai, S. Cellular and Molecular Immunology, 6th Edition. Saunders Elsevier. 2007.

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, v.4, n.10, p.e7428. 2009.

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. v.16(6), p. 976-9 .2010.

Akira, S., Hirano, T., Taga, T., Kishimoto, T. Biology of multifunctional cytokines: IL 6 and related molecules (IL 1 and TNF). FASEB J. v.4(11), p.2860-7. 1990.

Akira, S. Innate immunity and adjuvants. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. v.366, p.2748-55. 2011

Alam, J., D. Stewart, et al. Nrf2, a Cap'n'Collar transcription factor, regulates induction of the heme oxygenase-1 gene. J Biol Chem, v.274, n.37, p.26071-8. 1999.

Albarnaz, J. D. Análise da ativação e do envolvimento de vias sinalizadoras celulares durante a infecção pelo *Vaccinia virus*. (Dissertação de Mestrado). Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

An, J., Sun, Y., Sun, R., Rettig, M. B. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encoded vFLIP induces cellular IL-6 expression: the role of the NF-kappaB and JNK/AP1 pathways. Oncogene. v. 22, p.3371-85. 2003.

Andrade, A. A., P. N. Silva, et al. The vaccinia virus-stimulated mitogenactivated protein kinase (MAPK) pathway is required for virus multiplication. Biochem J, v.381, n.Pt 2, Jul 15, p.437-46. 2004.

Apte, R. N. Mechanisms of cytokine production by fibroblasts-implications for normal connective tissue homeostasis and pathological conditions. *Folia Microbiol (Praha)*. v.40(4), p.392-404. 1995.

Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A. & Struhl, K. *Current Protocols in Molecular Biology*. v.1. 1994

Bahar, M. W., Graham, S. C., Chen, R. A., Cooray, S., Smith, G. L., Stuart, D. I., Grimes, J. M. How vaccinia virus has evolved to subvert the host immune response. *J Struct Biol*. v. 175(2), p. 127-34. 2011.

Bak, R. O. and Mikkelsen, J. G. Regulation of cytokines by small RNAs during skin inflammation. *J Biomed Sci*.v.17 (1). 2010.

Barchet, W., Cella, M., Colonna, M. Plasmacytoid dendritic cells--virus experts of innate immunity. *Semin Immunol*. v.17(4), p.253-61. 2005.

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*, v.33, n.11, Nov, p.1047-63. 2001.

Baxby, D., Bennett, M., Getty, B. Human cowpox 1969-93: a review based on 54 cases. *Br J Dermatol*. V. 131(5), p.598-607. 1994.

Baxby, D. and Bennett, M. Cowpox: a re-evaluation of the risks of human cowpox based on new epidemiological information. *Arch Virol Suppl*. v. 13, p.1-12. 1997.

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

Bluethmann, H., Rothe, J., Schultze, N., Tkachuk, M., Koebel, P. J. Establishment of the role of IL-6 and TNF receptor 1 using gene knockout mice. *Leukoc Biol*. v. 56(5), p.565-70 . 1994.

Botero, J. E., Contreras, A., Parra, B. Profiling of inflammatory cytokines produced by gingival fibroblasts after human cytomegalovirus infection. *Oral Microbiol Immunol*. v.23(4), p. 291-8. 2008.

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.* v. 97(18), p.10162-7. 2000

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.

Buchmeier, N. A., Gee, S. R., Murphy, F. A., Rawls, W. E. Abortive replication of vaccinia virus in activated rabbit macrophages. *Infection and Immunity.* v.26 (1), p. 328-338. 1979.

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

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

Campos, M. A. S., Kroon, E. G. Critical period for irreversible block of Vaccinia virus replication. *Revista de Microbiologia,* v.24, p.104-110. 1993.

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

Carroll, D. S., Emerson, G. L., Li, Y., Sammons, S., Olson, V., Frace, M., Nakazawa, Y., Czerny, C. P., Tryland, M., Kolodziejek, J., Nowotny, N., Olsen-Rasmussen, M., Khristova, M., Govil, D., Karem, K., Damon, I. K., Meyer, H. Chasing Jenner's vaccine: revisiting cowpox virus classification. *PLoS One.* v.6(8), p. 1-6. 2011.

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

Condit, R. C. & E. G. Niles. Regulation of viral transcription elongation and termination during vaccinia virus infection. *Biochim Biophys Acta,* v.1577, n.2, Sep 13, p.325-36. 2002.

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

Cowan, K. J. & Storey, K. B. Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. *J Exp Biol*, v.206, n.Pt 7, Apr, p.1107-15. 2003.

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*, v.277, n.2, Nov 25, p.439-49. 2000.

Damon, I. K. Poxviruses. In: B. N. Fields, Knipe, D. M., Howley, P.M. (Ed.). *Virology*. Philadelphia: Lippincott-Raven, v.2. Poxviruses, p.2947-2975. 2007.

Davis, R. J. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell*, v.103, n.2, Oct 13, p.239-52. 2000.

Da Fonseca, F. G.; Kroon, E. G.; Nogueira, M. L.; Trindade, G. S. Zoonotic vaccinia virus outbreaks in Brazil. *Future Virology*. v.6, p. 697-707. 2011

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*, v.276, n.42, Oct 19, p.38353-60. 2001.

De Silva, F. S., W. Lewis, et al. Poxvirus DNA primase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.104, n.47, Nov 20, p.18724-9. 2007.

De Silva, F. S., N. Paran, et al. Products and substrate/template usage of vaccinia virus DNA primase. *Virology*, v.383, n.1, Jan 5, p.136-41. 2009.

Desloges, N., Schubert, C., Wolff, M. H., Rahaus, M. Varicella-zoster virus infection induces the secretion of interleukin-8. *Med Microbiol Immunol*. v.197(3), p.277-84. 2008.

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

Dinarello, C. C. Proinflammatory Cytokines. *Chest*. v.118, p. 503-508. 2000.

Everett, H. & McFadden, G. Poxviruses and apoptosis: a time to die. *Curr Opin Microbiol* v.5, p.395-402. 2002.

Fang, M. & Sigal, L. J. Antibodies and CD8+ T cells are complementary and essential for natural resistance to a highly lethal cytopathic virus. *J. Immunol*, v.175, p.6829–6836. 2005.

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*, v.24, n.2, Apr, p.123-33. 2000.

Flint, Jane S., Enquist, Lynn W., Racaniello, Vincent R., Shalka, Anna M. Principles of virology: molecular biology, pathogenesis and control. (Cap. 14 – Virus Offenses Meets Host Defense), American Society Microbiology, 1 edition. 1999.

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

Gomes, J. A., de Araújo, F. F., Trindade, G. de S., Quinan, B. R., Drumond, B. P., Ferreira, J. M., Mota, B. E., Nogueira, M. L., Kroon, E. G., Abrahão, J. S., Côrrea-Oliveira, R., da Fonseca, F. G. Immune Modulation in Primary Vaccinia virus Zoonotic Human Infections. *Clin Dev Immunol*. 2012.

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

Haga, I. R. & Bowie, A. G. Evasion of innate immunity by *Vaccinia virus*. *Parasitology* v.130, p.11 – 25. 2005.

Han Y, Niu M, An L, Li W. Upregulation of proinflammatory cytokines and NO production in BV-activated avian macrophage-like cell line (HD11) requires MAPK and NF-kappaB pathways. *Int Immunopharmacol*. v.9(7-8):8 p.17-23.2009.

Harker, J. A., Lewis, G. M., Mack, L., Zuniga, E. I. Late interleukin-6 escalates T follicular helper cell responses and controls a chronic viral infection. *Science*. v.334(6057), p.825-9. 2011

Hause L, Al-Salleeh FM, Petro TM. Expression of IL-27 p28 by Theiler's virus-infected macrophages depends on TLR3 and TLR7 activation of JNK-MAP-kinases. *Antiviral Res.* v.76(2), p.159-67. 2007.

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

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.* v.176, p. 2219–2228. 2006.

Hirano, T. Interleukin 6 (IL-6) and its receptor: their role in plasma cell neoplasias. *Int J Cell Cloning.* v. 9(3), p.166-84. 1991.

Huang, C., K. Jacobson, *et al.* MAP kinases and cell migration. *J Cell Sci*, v.117, n.Pt 20, Sep 15, p.4619-28. 2004.

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*, v. 82, n.16, p. 7988-99. 2008.

Huang, Y., Huang, X., Cai, J., Ye, F., Qin, Q. Involvement of the mitogen-activated protein kinase pathway in soft-shelled turtle iridovirus-induced apoptosis. *Apoptosis.* v. 16(6), p.581-93. 2011.

Humlova, Z., M. Vokurka, M. Esteban, and Z. Melkova. Vaccinia virus induces apoptosis of infected macrophages. *J. Gen. Virol.* V.83, p. 2821–2832. 2002.

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) – site acessado em janeiro de 2012. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/Ictv/index.htm>).

Jahrling, P. B., L. E. Hensley, *et al.* Exploring the potential of variola virus infection of cynomolgus macaques as a model for human smallpox. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v.101, n.42, Oct 19, p.15196-200. 2004.

Joklik, W. K. The purification of four strains of poxvirus. *Virology*, v.18, Sep, p.9-18. 1962.

Kang, H., Jeong, H. D., Choi, H. Y. The chloroform fraction of *Solanum nigrum* suppresses nitric oxide and tumor necrosis factor- $\alpha$  in LPS-stimulated mouse peritoneal macrophages through inhibition of p38, JNK and ERK1/2. *Am J Chin Med.* v.39(6), p.1261-73. 2011.

Kato, K., Otsuka, T., Kondo, A., Matsushima-Nishiwaki, R., Natsume, H., Kozawa, O., Tokuda, H. AMP-activated protein kinase regulates PDGF-BB-stimulated interleukin-6 synthesis in osteoblasts: Involvement of mitogen-activated protein kinases. *Life Sci.* v. 90(1-2), p.71-6. 2012.

Kim, S. and Joo, Young-Eun. Theaflavin Inhibits LPS-Induced IL-6, MCP-1, and ICAM-1 Expression in Bone Marrow-Derived Macrophages Through the Blockade of NF- $\kappa$ B and MAPK Signaling Pathways. *Chonnam Medical Journal.* v. 47(2), p. 104–110. 2011.

Kim, Y. H., Koh, H. K., Kim, D.S. Down-regulation of IL-6 production by astaxanthin via ERK-, MSK-, and NF- $\kappa$ B-mediated signals in activated microglia. *Int Immunopharmacol.* V. 10(12), p.1560-72. 2010.

Kishimoto, T., Hibi, M., Murakami, M., Narazaki, M., Saito, M., Taga, T. The molecular biology of interleukin 6 and its receptor. *Ciba Found Symp.* v.167, p.5-23. 1992.

Knorr, C. W., Allen, S. D., Torres, A. R., Smee, D. F. Effects of cidofovir treatment on cytokine induction in murine models of cowpox and vaccinia virus infection. *Antiviral Res.* v.72(2), p.125-33. 2006

Krause, A., Holtmann, H., Eickemeier, S., Winzen, R., Szamel, M., Resch, K., Saklatvala, J., Kracht, M. Stress-activated protein kinase/Jun N-terminal kinase is required for interleukin (IL)-1-induced IL-6 and IL-8 gene expression in the human epidermal carcinoma cell line KB. *J Biol Chem.* v. 273(37), p.23681-9. 1998.

Kurane, I., Janus, J., Ennis, F. A. Dengue virus infection of human skin fibroblasts in vitro production of IFN-beta, IL-6 and GM-CSF. *Arch Virol.* v.124(1-2), p.21-30. 1992.

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

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

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

Leite, F. G. G. A contribuição do fator transcricional c-Jun à multiplicação do Vaccinia virus. (Dissertação de Mestrado). Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2006.

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.

Lewis-Jone, S. Zoonotic poxvirus infections in humans. *Curr Opin Infect Dis* v.17(2), p.81-89. 2004.

Lima, G. K. TLR2 E TLR9: Receptores essenciais para o controle da infecção por vírus *Herpes Simplex* do tipo 1. (Tese de Doutorado). Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2010.

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.*, v.57, p.423-429. 2005.

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

Ma, W., Mishra, S., Gajanayaka, N., Angel, J. B., Kumar, A. HIV-1 Nef Inhibits Lipopolysaccharide-induced IL-12p40 Expression by Inhibiting JNK-activated NF $\kappa$ B in Human Monocytic Cells. *J Biol Chem.* v.284(12), p. 7578–7587. 2009.

Madigan, M.T., Martinko, J. M., Parker, J. Brock Biology of Microorganisms. 10th Edition. Pearson Prentice Hall. 2004.

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

McFadden, G. Smallpox: An ancient disease enters the modern era of virogenomics. *PNAS*, v. 101, n. 42, p.14994-14995. 2004.

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

McFadden, Grant. Killing a Killer: What Next for Smallpox? *Plos Pathogens*, v. 6, Jan, p.1-4. 2010.

McNulty, S., Powell, K., Erneux, C., Kalman, D. The host phosphoinositide 5-phosphatase SHIP2 regulates dissemination of vaccinia virus. *J. Virol.* v. 85(14), p.7402-10. 2011.

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* 14(2), p.129-134. 2010.

Mendis, E., Kim, M. M., Rajapakse, N., Kim, S. K. Suppression of cytokine production in lipopolysaccharide-stimulated mouse macrophages by novel cationic glucosamine derivative involves down-regulation of NF-kappaB and MAPK expressions. *Bioorg Med Chem.* v. 15;16(18), p.8390-6. 2008.

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

Molet, S., Hamid, Q., Davoine, F., Nutku, E., Taha, R., Pagé, N., Olivenstein, R., Elias, J., Chakir, J. IL-17 is increased in asthmatic airways and induces human

bronchial fibroblasts to produce cytokines. *J Allergy Clin Immunol.* v.108(3), p. 430-8. 2001.

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

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

Moss, B. Poxviridae: The Viruses and Their Replication. In: B. N. Fields, Knipe, D. M., Howley, P.M. (Ed.). *Virology*. Philadelphia: Lippincott-Raven, v.2, p.2906-2946. 2007.

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*, v.46, n.6, Nov-Dec, p.315-22. 2004.

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

Nishitai G, Shimizu N, Negishi T, Kishimoto H, Nakagawa K, Kitagawa D, Watanabe T, Momose H, Ohata S, Tanemura S, Asaka S, Kubota J, Saito R, Yoshida H, Mak TW, Wada T, Penninger JM, Azuma N, Nishina H, Katada T. Stress induces mitochondria-mediated apoptosis independent of SAPK/JNK activation in embryonic stem cells. *J Biol Chem.* V.16;279(3), p.1621-1626.2004.

Park, H. G., Bak, E. J., Kim, J. H., Lee, Y.S., Choi, S.H., Cha, J.H., Yoo, Y.J. Effect of globular adiponectin on interleukin-6 and interleukin-8 expression in periodontal ligament and gingival fibroblasts. *J Periodontal Implant Sci.* v.41(3), p.149-56. 2011.

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

Perdiguero, B. & M. Esteban. The interferon system and vaccinia virus evasion mechanisms. *J Interferon Cytokine Res*, v.29, n.9, Sep, p.581-98. 2009.

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.* v. 86(1), p.172-84. 2012.

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.* v. 103(7), p.319-31. 2011.

Pradervand, S., Maurya, M. R., Subramaniam, S. Identification of signaling components required for the prediction of cytokine release in RAW 264.7 macrophages. *Genome Biol,* v.7 (2). 2006.

Precopio, M. L., Betts, M. R., Parrino, J., Price, D. A., Gostik, E., Ambrozak, D. R., Asher, T. E., Douek, D. C., Hararil, A., Pantaleo, G., Bailer, R., Graham, B. S., Roederer, M., Koup, R. A. Immunization with vaccinia virus induces polyfunctional and phenotypically distinctive CD8(+) T cell responses. *J Exp Med,* v.204, p.1405-1416. 2007.

Putz, M. M., Midgley, C. M., Law, M., Smith, G. L. Quantification of antibody responses against multiple antigens of the two infectious forms of Vaccinia virus provides a benchmark for smallpox vaccination. *Nat Med,* v.12, p.1310-1315. 2006.

Qidwai, T. and Khan, F. Tumour necrosis factor gene polymorphism and disease prevalence. *Scand J Immunol.* v.74(6), p.522-47. 2011.

Rahaus, M., N. Desloges, et al. Replication of varicella-zoster virus is influenced by the levels of JNK/SAPK and p38/MAPK activation. *J Gen Virol,* v.85, n.Pt 12, Dec, p.3529-40. 2004.

Ramshaw, I. A., Ramsay, A. J., Karupiah, G., Rolph, M. S., Mahalingam, S., Janet, C. R. Cytokines and immunity to viral Infections. *Immunological Reviews*. v. 159:, p.119-135. 1997.

Reading, P. C., Khanna, A., Smith, G. L. Vaccinia virus CrmE encodes a soluble and cell surface tumor necrosis factor receptor that contributes to virus virulence. *Virology*. v. 20;292(2), p.285-98. 2002.

Rincón M and Davis RJ. Regulation of the immune response by stressactivated protein kinases. *Immunol Rev*. v.228, p. 212–224. 2009.

Rokita, H., Kupiec C. A. T., Guzik, K. and Koj, A. Vaccinia virus-regulated acute phase cytokine production in human fibroblasts, U937 cells and endothelium. *Mediators of Inflammation*, v.7, p.73–78.1998.

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

Saraiva, M. and Alcami, A. CrmE, a novel soluble tumor necrosis factor receptor encoded by poxviruses. *J Virol*. v. 75(1), p.226-33. 2001.

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.

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

Schonthaler, H. B., Guinea-Viniegra, J., Wagner, E. F.. Targeting inflammation by modulating the Jun/AP-1 pathway. *Ann Rheum Dis*. v.70, p.109-12. 2011.

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*. 2011.

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*, v, 21, p.377-423. 2003.

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*, v.398, n.1, Aug 15, p.83-95. 2006.

Sliva, Katja and Schnierle, Barbara. From actually toxic to highly specific – novel drugs against poxviruses. *Virology Journal*, (4:8).2007.

Sloan, D. D. & Jerome, K. R. Herpes simplex virus remodels T-cell receptor signaling, resulting in p38-dependent selective synthesis of interleukin-10. *J Virol*, v.81, n.22, Nov, p.12504-14. 2007.

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

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

Smith, L. G. & Law, M. The exit of Vaccinia virus from infected cells. *Virus Research*, v.106, p. 189-197. 2004.

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

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*, v.83, n.13, Jul, p.6883-99. 2009.

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

Spesock, A. H., Barefoot, B. E., Ray, C. A., Kenan, D. J., Gunn, M. D., Ramsburg, E. A., Pickup, D. J. Cowpox virus induces interleukin-10 both in vitro and in vivo. *Virology*. v. 417(1):87-97. 2011.

Stack, J., Haga, I. R., Schröder, 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*. V. 201(6), p.1007-18. 2005.

Szczepankiewicz, B. G., Kosogof, C., Nelson, L. T., Liu, G., Liu, B., Zhao, H., Serby, M. D., Xin, Z., Liu, M., Gum, R.J., et al. Aminopyridine-based c-Jun N-terminal kinase inhibitors with cellular activity and minimal cross-kinase activity. *J Med Chem*. v.49, p.3563–3580. 2006.

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

Tanabe, K., Matsushima-Nishiwaki, R., Yamaguchi, S., Iida, H., Dohi, S., Kozawa, O. Mechanisms of tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-6 synthesis in glioma cells. *J Neuroinflammation*. v. 7, p. 1 -8. 2010.

Tantilipikorn, P., Auewarakul, P. Airway allergy and viral infection. *Asian Pac J Allergy Immunol*. v.29(2), p.113-9. 2011.

Terasaka, Y., D. Miyazaki, *et al*. Induction of IL-6 in transcriptional networks in corneal epithelial cells after Herpes simplex virus type 1 infection. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, Dec 17. 2009.

Tournier, C., P. Hess, et al. Requirement of JNK for stress-induced activation of the cytochrome c-mediated death pathway. *Science*, v.288, n.5467, May 5, p.870-4. 2000.

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*, v.9, n.2, Feb, p.155-60. 2003.

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*, v.75, n.3, Sep, p.486-90. 2006.

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

Turner, N. A., Das, A., Warburton, P., O'Regan, D. J., Ball, S. G., Porter, K. E. Interleukin-1alpha stimulates proinflammatory cytokine expression in human cardiac myofibroblasts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. V. 297(3), p.1117-27. 2009.

Turpeinen, T., Nieminen, R., Moilanen, E., Korhonen, R. Mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 negatively regulates the expression of interleukin-6, interleukin-8, and cyclooxygenase-2 in A549 human lung epithelial cells. *J Pharmacol Exp Ther*. v. 333(1), p.310-8. 2010.

Tuyt, L. M., Dokter, W. H., Birkenkamp, K., Koopmans, S. B., Lummen, C., Kruijer, W., Vellenga, E. Extracellular-regulated kinase 1/2, Jun N-terminal kinase, and c-Jun are involved in NF-kappa B-dependent IL-6 expression in human monocytes. *J Immunol*. V. 15;162(8), p.4893-902. 1999.

Tzang, B. S., Chiu, C. C., Tsai, C. C., Lee, Y. J., Lu, I. J., Shi, J. Y., Hsu, T. C. Effects of human parvovirus B19 VP1 unique region protein on macrophage responses. *J Biomed Sci*. v.16:13. 2009.

Van Damme, J., Schaafsma, M. R., Fibbe, W. E., Falkenburg, J. H., Opdenakker, G., Billiau, A. Simultaneous production of interleukin 6, interferon-beta and colony-stimulating activity by fibroblasts after viral and bacterial infection. *Eur J Immunol*. V. 19(1), p.163-8. 1989.

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*. v.23, p.2838–2849. 2004.

Walsh, D. and Mohr, I. Viral subversion of the host protein synthesis machinery. *Nature Reviews Microbiology* v.9, p. 860-875. 2011.

Whitebeck, J.C., Foo, C.H., De Leon, M.P., Eisenberg, R.J., e Cohen, G.H. Vaccinia virus exhibits cell-type-dependent entry characteristics. *Virology*. V.385(2),p. 383-391. 2009.

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

Williams, A.S., Issa R., Leung, S.Y., Nath, P., Ferguson, G.D., Bennett, B.L., Adcock, I.M., Chung, K.F.. Attenuation of ozone-induced airway inflammation and hyper-responsiveness by c-Jun NH2 terminal kinase inhibitor SP600125. *J Pharmacol Exp Ther*. v.322(1), p.351-9. 2007.

Yeh CJ, Lin PY, Liao MH, Liu HJ, Lee JW, Chiu SJ, Hsu HY, Shih WL. TNF-alpha mediates pseudorabies virus-induced apoptosis via the activation of p38 MAPK and JNK/SAPK signaling. *Virology*, v.10;381(1), p.55-66. 2008.

Xie, J., Pan, H., Yoo, S., Gao, S. J. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus induction of AP-1 and interleukin 6 during primary infection mediated by multiple mitogen-activated protein kinase pathways. *J. Virol*. v.79(24), p.15027-37. 2005.

Xu, L., Johnson, A. J., Liggitt, D., Bevan, M. J. Cellular and humoral immunity against vaccinia virus infection of mice. *J Immun* v.172, p.6265-6271. 2004.

Xu, X., Yasuda, M., Tsuruta, S., Mizuno, M., Ashida, H. Beta-Glucan from *Lentinus edodes* inhibits NO and TNF- $\alpha$  production and phosphorylation of mitogen-activated protein kinases in LPS-stimulated murine RAW 264.7 macrophages. *J Biol Chem*. 2011.

Zapata, H. J., Nakatsugawa, M. and Moffat, J. F. Varicella-Zoster Virus Infection of Human Fibroblast Cells Activates the c-Jun N-Terminal Kinase Pathway. *Journal of Virology*. v.81, n.2, p.977-990. 2007