



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA
LABORATÓRIO DE VIROLOGIA BÁSICA E APLICADA – LVBA

KARINE LIMA LOURENÇO

**INTERAÇÃO VÍRUS-HOSPEDEIRO: A ATIVAÇÃO DE COMPONENTES DA VIA DE
RESPOSTA A PROTEÍNAS MAL DOBRADAS (UPR) PELOS *VACCINIA VIRUS*
GUARANI P1 (GP1V) E PASSATEMPO (PSTV)**

BELO HORIZONTE

2021

KARINE LIMA LOURENÇO

**INTERAÇÃO VÍRUS-HOSPEDEIRO: A ATIVAÇÃO DE COMPONENTES DA VIA DE
RESPOSTA A PROTEÍNAS MAL DOBRADAS (UPR) PELOS *VACCINIA VIRUS*
GUARANI P1 (GP1V) E PASSATEMPO (PSTV)**

Versão final

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós Graduação do Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Microbiologia.

Orientador: Prof. Doutor Flávio Guimarães da
Fonseca

Coorientador: Dr. Thiago Lima Leão

BELO HORIZONTE

2021

043 Lourenço, Karine Lima.

Interação vírus-hospedeiro: a ativação de componentes da via de resposta a proteínas mal dobradas (UPR) pelos Vaccinia virus Guarani P1 (GP1V) e Passatempo (PSTV) [manuscrito] / Karine Lima Lourenço. - 2021.

96 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Doutor Flávio Guimarães da Fonseca. Co-orientador: Dr. Thiago Lima Leão.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Infecções por Poxviridae. 3. Vírus Vaccinia. 4. Resposta a Proteínas não Dobradas. I. Fonseca, Flávio Guimarães da. II. Leão, Thiago Lima. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DA DEFESA DE TESE DE Karine Lima Lourenço
Nº REGISTRO: 2018707668

Às 14 horas do dia 22 de 01 de 2021, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Jônatas Santos Abrahão (UFMG), Alexandre de Magalhaes Vieira Machado (FIOCRUZ), Breno de Mello Silva (UFOP), Leonardo Camilo de Oliveira (UFMG) e o(a) Prof. Flávio Guimarães da Fonseca – Orientador(a), para julgar o trabalho final INTERAÇÃO VÍRUS-HOSPEDEIRO: A ATIVAÇÃO DE COMPONENTES DA VIA DE RESPOSTA A PROTEÍNAS MAL DOBRADAS (UPR) PELOS VACCINIA VIRUS GUARANI P1 (GP1V) E PASSATEMPO (PSTV), da aluna Karine Lima Lourenço, requisito final para a obtenção do Grau de **DOUTOR EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof. Flávio Guimarães da Fonseca - Coordenador do Programa, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao(à) candidato(a), para a apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa do(a) candidato(a). Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do(a) candidato(a) e do público, para julgamento e expedição de resultado final. O(A) candidato(a) foi considerado(a) **APROVADO(A.)** O resultado final foi comunicado publicamente ao(à) candidato(a) pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ata, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 22 de 01 de 2021.

Prof(a). Dr Jônatas Santos Abrahão _____

Prof(a). Dr Alexandre de Magalhaes Vieira Machado _____

Prof(a). Dr Breno de Mello Silva *Breno de Mello Silva* _____

Prof(a). Dr Leonardo Camilo de Oliveira _____

Prof(a). Dr Flávio Guimarães da Fonseca (Orientador) _____

Betânia Paiva Drumond

Prof. Betânia Paiva Drumond

“Em algum lugar, algo incrível está esperando para ser descoberto.”

Carl Sagan

À minha filha Leticia por todo amor e carinho

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço aos meus pais, Pedro e Marisa, e ao meu irmão, Rafael, que cuidaram de mim e da minha filha durante essa etapa tão importante da minha vida. Obrigada pelos conselhos, apoio, carinho e paciência. Obrigada por terem incentivado a correr atrás do meu sonho e por me dizerem incansavelmente que eu conseguiria. Sem vocês não seria possível.

Agradeço imensamente aos meus amigos do LVBA: Lethícia, Raíssa, Gaby, Ângela, João, Luís, Dany, Adriana, Eduarda, Sabrina, Alice, Silvia, Anderson, Carol, Laura, Thais e Iracema. Obrigada pelo apoio, conselhos, amizade, cervejinhas nos botecos e ajuda nos experimentos madrugada afora.

Agradeço às minhas amigas Izabela e Lívia pela linda amizade que construímos nesses anos e congressos de vírus kkkk, pelos longos papos, risadas, conselhos e companheirismo. Vocês foram parte essencial nesse processo.

Agradeço ao Thiago, meu co-orientador e amigo pela ajuda em todos os experimentos, pelas ótimas e brilhantes ideias e principalmente pela paciência comigo.

Agradeço ao meu amigo e aluno de iniciação científica, Cid, mais conhecido como Cidnelson. Obrigada por toda ajuda, por ser meu ombro amigo, conselheiro master e por ter abertos meus olhos para tantas possibilidades “na vida”.

Agradeço imensamente à maravilhosa Tânia Mara, por todos os ensinamentos, conselhos e por puxar minha orelha quando eu precisava.

Agradeço à todos os professores do departamento de Microbiologia pelos ensinamentos.

Agradeço à professora Edel Stancioli, por me acompanhar desde a especialização, pela confiança e pelas contribuições para esse trabalho.

Agradeço à professora Jordana Coelho dos Reis, pelos ensinamentos, carinho e amizade. Você é uma grande inspiração.

De todo coração, agradeço ao meu querido amigo e orientador, Flávio, por ter me aceitado como aluna, há sete anos, sem ao menos me conhecer. Obrigada pelos ensinamentos, paciência, carinho, amizade e, principalmente, por aguentar todo meu chororô durante todo esse tempo. Tenho muito orgulho de ser sua aluna e digo de boca cheia que tenho o melhor orientador/chefe do mundo.

Agradeço à minha filha, Letícia, meu coraçãozinho fora do peito. Obrigada por entender minha ausência durante todos esses anos de mestrado e doutorado e por sempre me receber com um abraço enorme e cheio de beijinhos. Obrigada por ter dado sentido à minha vida, você é minha força, meu alicerce, meu coração... Eu amo você mais do que tudo nesse mundo.

Finalmente, agradeço à minha companheira de vida, meu amor Stefânia, por ter me dado tanta força nesse período. Pelo amor, carinho, incentivo e PACIÊNCIA. Não sei como teria sido sem você, se teria conseguido. Amo você demais meu amor!

RESUMO

A família *Poxviridae* possui representantes mundialmente conhecidos que infectam uma gama de hospedeiros vertebrados e invertebrados, incluindo os seres humanos. Os poxvírus são divididos em duas subfamílias, a *Entomopoxvirinae*, a qual inclui os poxvírus que infectam insetos, e a *Chordopoxvirinae*, que compreende os poxvírus que infectam vertebrados. A subfamília *Chordopoxvirinae* possui atualmente dezoito gêneros, e o gênero *Orthopoxvirus* está entre os mais estudados. Desde 1999 o *Vaccinia virus* (VACV) tem sido relacionado a surtos envolvendo seres humanos, bovinos, equinos e outros animais. A partir de diversos estudos realizados por pesquisadores brasileiros, os isolados de VACV brasileiros (VACVbr) foram divididos em dois grupos: grupo 1 (menos virulento em modelos de infecção murina), grupo 2 (mais virulento em modelos de infecção murina). A multiplicação dos poxvírus está intimamente relacionada ao retículo endoplasmático (RE), e as fabricas virais produzidas durante a replicação são envoltas por suas membranas. Além disso, a obtenção da conformação tridimensional correta de proteínas ocorre em sua maioria no lúmen do RE. Por consequência, esta organela é capaz de responder a perturbações ocasionadas pelo acúmulo de proteínas mal dobradas, levando ao processamento adequado dessas proteínas ou até a morte celular programada, através da via de resposta a proteínas mal-dobradas (*Unfolded Protein Response* – UPR). Esta via possui três sensores principais, que incluem as proteínas ATF6, IRE1 e PERK. A via UPR tem papel crucial na resposta imune, relacionando-se com a maturação e diferenciação de células imunitárias, além da produção de citocinas. Sendo assim, a modulação da via UPR teria papel importante na resposta imune do hospedeiro pela infecção por poxvírus. Neste trabalho, investigamos os efeitos da infecção pelos isolados de VACV brasileiros Guarani P1 virus (GP1V) e Passatempo virus (PSTV), sobre a ativação dos sensores da via UPR em comparação ao VACV Western Reserve protótipo do gênero. Os ensaios de gene repórter nos mostraram a ativação de ATF6 após a infecção pelos VACVbr. Nas curvas de ciclo único e múltiplos ciclos não foi possível observar diferença na produtividade desses vírus na ausência ou presença de ATF6; entretanto por fenótipo de placa é possível observar que nas células ATF6-WT as placas de lise são menores quando comparadas com as placas formadas nas células ATF6-KO. Através do ensaio de RFLP verificamos que a infecção pelos três vírus analisados modula negativamente o processamento do mRNA de XBP1, alvo de IRE1. A avaliação do fenótipo de placa na presença dos inibidores do domínio cinase e Rnase de IRE1, nos mostrou diminuição da placa de lise dos VACV-Br na presença do inibidor do domínio cinase. Curvas de ciclo único em células MEF-WT e PERK-KO não nos mostraram diferença na produtividade dos vírus GP1V, PSTV e WR, contudo os ensaios de fenótipo de placa nos mostraram placas de lise maiores nas células PERK-KO quando comparadas as formadas nas células MEF-WT. As curvas de ciclo único realizadas na presença do inibidor de BiP não nos mostraram diferença na produtividade dos VACV-Br, entretanto no ensaio de fenótipo de placa é possível observar placas de lise de tamanho menor nos poços tratados com o inibidor. Ensaios de qPCR mostraram que a infecção pelos vírus GP1V, PSTV e WR regula a expressão de genes responsivos a via UPR. Concluindo, ATF6 parece ter papel importante durante a infecção dos VACV-Br; os três vírus multiplicaram eficientemente nas células deficientes para o sensor PERK e o domínio cinase de IRE1 tem papel importante na replicação dos vírus GP1V, PSTV e WR.

ABSTRACT

The Poxviridae family has globally recognized members that infect a range of vertebrate and invertebrate hosts that includes humans. Poxviruses are classified into two subfamilies: the Entomopoxvirinae comprises poxviruses that infect insects, while the Choropoxvirinae includes the ones that infect vertebrates. The subfamily Chordopoxvirinae currently contains eighteen genera and the genus Orthopoxvirus is one of the most investigated. Since 1999, the Vaccinia virus (VACV) has been reported in outbreaks involving humans, cattle and horses, among other animals. Brazilian VACV isolates (VACV-Br) are divided into two groups based on their virulence in mice infections: group 1 (less virulent) and group 2 (more virulent). Poxviruses multiplication is connected to the endoplasmic reticulum (ER) at the level that viral factories produced during replication are enveloped by their membranes. Moreover, the protein folding to achieve their correct three-dimensional conformation occurs mostly in the ER lumen. As a consequence, ER can respond to disturbances caused by the accumulation of unfolded proteins, leading to adequate processing of these proteins or even programmed cell death, through the unfolded protein response (UPR) pathway. This pathway has three main sensors, which include the ATF6, IRE1 and PERK proteins. This pathway is essential in the immune response, leading to the maturation and differentiation of immune cells and the production of cytokines. Therefore, the modulation of the UPR pathway could play an important role in the immune response triggered by poxviruses infection. In this project, we investigated the effects of the infection of VACV isolates Guarani P1 virus (GP1V) and Passatempo virus (PSTV), on the activation of UPR pathways in mouse embryo fibroblasts cells (MEFs). Reporter gene assays showed us the activation of ATF6 following VACVbr infection. In one-step / multi-step growth it was not possible to observe differences in the productivity of these viruses in the absence or presence of ATF6, however, in the plaque phenotype, it is possible to observe that in ATF6-WT cells the lysis plates are smaller when compared to the plates formed in the ATF6-KO cells. Through the RFLP assay, we verified that infection by the three analyzed viruses negatively modulates to the processing of the XBP1mRNA. The evaluation of the plaque phenotype in the presence of the IRE1 kinase and Rnase domain inhibitors showed us a decrease in the VACV-Br lysis plaque in the presence of the kinase domain inhibitor. One step curves in MEF-WT and PERK-KO cells showed no difference in GP1V, PSTV, and WR virus yield, however, plaque phenotype assays showed larger lysis plates in PERK-KO cells when compared to those formed in MEF-WT cells. The one-step curves performed in the presence of the BiP inhibitor showed no difference in VACV-Br productivity, however, in the plaque phenotype, it is possible to observe smaller size lysis plates in the wells treated with the inhibitor. qPCR assays have shown that infection with GP1V, PSTV and WR viruses regulates the expression of genes responsive to the UPR pathway. In conclusion, ATF6 seems to have an important role during VACV-Br infection. The three viruses efficiently multiplied in cells deficient for the PERK sensor. The IRE1 kinase domain plays an important role in the replication of GP1V, PSTV and WR viruses.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Morfologia do vírion dos <i>Poxvírus</i>	3
Figura 2: Genoma dos <i>Chordopoxvírus</i>	5
Figura 3: Penetração de IMV e EEV na célula.....	7
Figura 4: Representação esquemática do ciclo de multiplicação dos <i>Poxvírus</i>	9
Figura 5: Lesões em humanos por MURV.....	10
Figura 6: Lesões provocadas por PSTV	11
Figura 7: Arvore filogenética do BR-VACV com base nas sequências de nucleotídeos do gene A56R (hemaglutinina).....	13
Figura 8: Estresse do RE e funções da UPR.....	14
Figura 9: Mecanismo de ação dos três principais eixos da via UPR	16
Figura 10: A proteína Cinase dependente de Inositol (IRE1)	17
Figura 11: Sinalização por PERK.....	18
Figura 12: Sinalização por ATF6	19
Figura 13: Representação esquemática das proteínas imunomoduladoras de poxvírus.....	23
Figura 14: Ensaios de fenótipo de placa e curvas de multiplicação dos vírus GP1V, PSTV e WR em células MEFs ATF6-WT e ATF6-KO.....	41
Figura 15: Curvas de multiplicação dos vírus GP1V, PSTV e WR em células MEFs ATF6-WT e ATF6-KO.....	42
Figura 16: Ativação de ATF6-GFP em células A31 infectadas com os vírus GP1V, PSTV e WR.....	43
Figura 17: Atividade transcricional e quantificação da translocação nuclear de ATF6-GFP em células A31 infectadas com os vírus GP1V, PSTV e WR.....	44
Figura 18: Análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição do DNA (PCR-RFLP) de células infectadas com os VACV.....	46
Figura 19: Fenótipo de placa na presença de inibidores do domínio cinase e Rnase.....	47
Figura 20: Ensaios de infectividade e fenótipo de placa em células MEF-WT e PERKO-KO.....	49
Figura 21: Curva de ciclo único e ensaios de placa na presença do inibidor de BiP (HA15)	51

Figura 22: Representação gráfica da expressão de genes da UPR em MEFS A31 infectadas com os vírus GP1V, PSTV e WR avaliado por ensaios de PCR quantitativa (qPCR).....	53
Figura 23: Modelo de efeitos da infecção por VACV sobre a via UPR.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Relação dos isolados de VACV obtidos no Brasil de acordo com o grupo filogenético.....	12
Tabela 2: Proteínas imunomoduladoras expressas por poxvírus.....	24
Tabela 3: Descrição e origem das linhagens celulares.....	30
Tabela 4: Descrição e origem dos plasmídeos.....	31
Tabela 5: Lista de iniciadores.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS

ARAV	<i>Araçatuba vírus</i>
ATF6	<i>Activating Transcription Factor 6</i>
BAV	<i>Bean 58058</i>
BiP	<i>Binding immunoglobulin protein</i>
BSC-40	Células epiteliais de rins de macaco verde africano
CTGV	<i>Cantagalo virus</i>
CEF	Fibroblasto de embrião de galinha
CEVs	Vírus envelopados célula-associados
CMLV	<i>Camelpox virus</i>
COTV	<i>Cotia virus</i>
CPXV	<i>Cowpox virus</i>
DEMEM	Meio Eagle Modificado por Dulbecco
ECP	Efeito Citopático
ECTV	<i>Ectromelia virus</i>
EEV	Vírion envelopado extracelular
GIF	Fator de inibição do fator estimulante de colônias de macrófagos e granulócitos
GM-CSF	Fator estimulante de colônias de macrófagos e granulócitos
GP1V	<i>Guarani P1 virus</i>
GP2V	<i>Guarani P2 virus</i>
ha	Gene da Hemaglutinina
ICE	Enzima conversora de IL-1
IEV	Vírus envelopado intracelular

IFN	Interferon(s)
IL	Interleucina
IMV	Vírião maduro intracelular
i.n.	Inoculação Intranasal
IRE-1α	Proteína Cinase Dependente de Inositol
ITRs	Regiões terminais invertidas
IV	Vírus imaturo
MARV	<i>Mariana virus</i>
MEM	Meio mínimo de Eagle
MCV	<i>Molluscum contagiosum virus</i>
MOI	Multiplicidade de infecção
MPXV	<i>Monkeypox virus</i>
mRNA	RNA mensageiro
MRV	<i>Maranhão virus</i>
MURV	<i>Muriae virus</i>
MV	<i>Myxoma virus</i>
NK	Natural killer
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	Fases abertas de leitura
PARV	<i>Pará virus</i>
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PFU	Unidades formadoras de placa
PKR	<i>Protein kinase R</i>
PSTV	<i>Passatempo vírus</i>
P1V	<i>Pelotas 1 virus</i>
P2V	<i>Pelotas 2 virus</i>
RCNV	<i>Raccoonpox virus</i>
RE	Reticulo endoplasmático
RFLP	Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de restrição

RPMI	Meio Instituto Roswell Park Memorial
SAV	<i>SPAn232 virus</i>
s.c	Subcutânea
SFB	Soro Fetal Bovino
SKPV	<i>Skunkpox virus</i>
SFV	<i>Shope fibroma virus</i>
TATV	<i>Taterapox virus</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
UPR	<i>Unfolded Protein Response</i>
VCP	Proteína de controle do complemento de <i>Vaccinia virus</i>
VACV	<i>Vaccinia virus</i>
VACV-IOC	<i>Vaccinia virus Instituto Oswaldo Cruz</i>
VPXV	<i>Volepox virus</i>
VARV	<i>Variola virus</i>
VACV-WR	<i>Vaccinia virus Western Reserve</i>
vIFNγR	Proteínas homólogas do receptor de IFN γ
vIL-10	Proteína viral homóloga ao IL-10
vIL-18BP	Proteína viral de ligação a IL-18
vTNFR	Receptor viral do fator de necrose tumoral
VIL-1R	Receptor viral de interleucina 1
VACV-WR	<i>Vaccinia virus amostra Western Reserv</i>
XBP-1	<i>X-box bin</i>

UNIDADES DE MEDIDAS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
Da, kDa	Dalton, Quilodalton
g	Aceleração da gravidade
h, min, s	Horas, minutos, segundos
pb, kb	Pares de base, quilobases
L, mL, µL	Litro, mililitro, microlitro
m, cm, mm, nm, µm	Metro, centímetro, milímetro, nanômetro, micrômetro
M, mM	Molar, milimolar
psi	Pressão (do inglês <i>pound force per square inch</i>)
V	Volts

Sumário

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 FAMÍLIA POXVIRIDAE	1
1.2 BIOLOGIA DOS POXVÍRUS	3
1.2.1 Morfologia	3
1.2.2 Genoma	4
1.2.3 Multiplicação	5
1.3. ISOLADOS BRASILEIROS GUARANI P1 VIRUS E PASSATEMPO VIRUS	10
1.4 VIAS DE RESPOSTA AO ESTRESSE DO RETICULO ENDOPLASMÁTICO	13
1.5 RESPOSTA IMUNE DO HOSPEDEIRO ÀS INFECÇÕES PELOS POXVÍRUS ...	21
1.5.1 Imunomodulação por poxvírus	22
Tabela 2 - Proteínas imunomoduladoras expressa por poxvírus	24
2 JUSTIFICATIVA	26
3 OBJETIVOS	28
3.1 OBJETIVO GERAL	28
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4 METODOLOGIA	29
4.2 ESTRATÉGIA DE TRABALHO	29
4.2 CÉLULAS	30
4.3 PLASMÍDEOS	31
4.4 PRODUÇÃO DOS ESTOQUES DE TRABALHO DAS AMOSTRAS VIRAIS	31
4.4.1 Origem das amostras	31
4.4.2 Multiplicação viral	32
4.4.3 Purificação viral	32
4.4.4 Titulação Viral	33
4.4.5 Fenótipo de placa	33
4.5 EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL E SÍNTESE DE cDNA	34
4.5.1 Análise do processamento de XBP1	35
4.6 PCR QUANTITATIVA (qPCR)	35
4.7 TRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIAS COMPETENTES	36
4.8 OBTENÇÃO DE PLASMÍDEO EM PEQUENA ESCALA	37
4.9 ENSAIO DE ATIVIDADE DO GENE REPÓRTER LUCIFERASE	37
4.10 QUANTIFICAÇÃO DA TRANSLOCAÇÃO DO ATF6 - ISOLAMENTO DE NÚCLEO E ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO	38
4.11 CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE VÍRUS INTRACELULAR MADURO	38
4.11.1 Titulação dos IMVs	38

4.11.2 <i>Curvas de multiplicação e fenótipo de placa na presença dos inibidores de componentes das vias UPR</i>	39
5 RESULTADOS	40
5.1 ANÁLISE DO EIXO ATF6 DURANTE A INFECÇÃO PELOS GP1V, PSTV E WR	40
5.1.1 - <i>Cinética de produção de vírus em células ATF6-KO e ATF6-WT</i>	40
5.1.2 - <i>Ativação de ATF6-GFP em fibroblasto embrião de camundongo balb/3t3 clone A31 infectadas com os vírus GP1V, PSTV e WR</i>	42
5.1.3- <i>Atividade transcricional e quantificação da translocação nuclear de ATF6- GFP em células A31 infectadas com os vírus GP1V, PSTV e WR</i>	44
5.2 ANÁLISE DO EIXO IRE1 DURANTE A INFECÇÃO PELOS GP1V, PSTV	45
E WR	45
5.2.1 <i>Análise semi-quantitativa do processamento do mRNA de XBP1 mediado por IRE1</i>	45
5.2.2 <i>Fenótipo de placa na presença de inibidores do domínio cinase e Rnase de IRE1</i>	46
5.3 ANÁLISE DO EIXO PERK DURANTE A INFECÇÃO PELOS GP1V, PSTV	48
E WR	48
5.3.1 - <i>Ensaio de infectividade e aspectos de produtividade em células MEF-WT e PERK-KO</i>	48
5.4 ASPECTOS DE CRESCIMENTO E ENSAIOS DE PLACA NA PRESENÇA DO INIBIDOR DE BIP (HA15)	50
5.5 EXPRESSÃO DE GENES RESPONSIVOS AO ESTRESE DO RETICULO PELOS VÍRUS GP1V, PSTV E WR	52
6 DISCUSSÃO	54
7 CONCLUSÕES	60
8 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NO PERÍODO	62
9 REFERÊNCIAS	65
10 ANEXO	79
10. 1 Manuscrito em preparação para submissão à revista científica <i>Journal of Virology</i>	79

1 INTRODUÇÃO

1.1 FAMÍLIA *POXVIRIDAE*

A família *Poxviridae* possui representantes mundialmente conhecidos que infectam uma gama de animais vertebrados e invertebrados, incluindo os seres humanos. O *Variola virus* (VARV), membro da família *Poxviridae*, que tem o homem como seu único hospedeiro natural, tornou-se notável por ter sido um dos agentes patogênicos mais impactantes para a humanidade até ser declarado erradicado, em dezembro de 1979, pela Organização Mundial da Saúde (OMS), fato esse tido como um dos mais importantes feitos da medicina humana (WHO, 1979). Outros integrantes da família *Poxviridae* também causam doença em humanos, como o *Vaccinia virus* (VACV) e o *Cowpox virus* (CPXV) que acometia frequentemente o gado, provocando pústulas e vesículas nos tetos das vacas e nas mãos dos ordenhadores. Esses sinais desapareciam espontaneamente, contudo o mais interessante era a proteção adquirida pelos indivíduos contra a varíola humana após a infecção pelo CPXV (FILHO, 1991).

A varíola causou diversas vezes epidemias pelo mundo até ser erradicada por uma campanha mundial de vacinação liderada pela OMS. A vacina contra varíola estimulava proteção imunológica adequada, contudo foram descritos muitos casos de manifestações adversas em função da vacinação, acarretando na suspensão da campanha de vacinação, após erradicação da varíola (PARRINO & GRAHAM, 2006).

A OMS por várias vezes debateu a destruição dos dois estoques oficiais do VARV, presentes nos Estados Unidos e na Rússia, para impedir uma possível propagação desse vírus. Em 16 de setembro de 2019 O Centro Estadual de Pesquisa de Virologia e Biotecnologia, localizado em Koltsovo, na Sibéria, um dos locais que mantém em seus repositórios diversos patógenos dentre eles o VARV, sofreu uma explosão. Embora não tenha relatos que essas amostras tenham sido atingidas, esse acontecimento alertou os pesquisadores sobre o que poderia ter acontecido caso esses estoques fossem atingidos. A possibilidade de estoques ocultos do vírus em outros lugares também é plausível, principalmente pelo fato do vírus ser considerado uma possível arma de bioterrorismo (REARDON, 2014; MACINTYRE et al., 2019).

Em relação à sua estrutura, os poxvírus dispõem de uma partícula viral comparativamente grande de 220-450 nm de comprimento e 140-260 nm de largura. A partícula abriga material genético de DNA linear, dupla-fita, que contém de 130-375kb e possui

regiões terminais invertidas (ITRs) de tamanho variável que flanqueiam as extremidades do genoma com sequências idênticas em ambas as extremidades (HALLER *et al.*, 2014;). O genoma dos poxvírus codifica mais de 150 genes, 90 destes são comuns em todos os *Chordopoxvirus* (subfamília da família *Poxviridae*) e estão relacionados a funções essenciais como replicação, transcrição e montagem dos vírions. Muitos genes codificados pelos poxvírus produzem proteínas capazes de regular a resposta antiviral do hospedeiro como os processos de reconhecimento e apresentação de antígeno, apoptose, produção de interferon (INF) e processos de sinalização (LEFKOWITZ *et al.*, 2006).

A família *Poxviridae* é dividida em duas subfamílias; a *Entomopoxvirinae* possui representantes que infectam insetos e a *Chordopoxvirinae* compreende as espécies que infectam vertebrados (MOSS, 2013). A subfamília *Entomopoxvirinae* é composta por quatro gêneros: *Alphaentomopoxvirus* (7 espécies), *Betaentomopoxvirus* (16 espécies) e *Gammaentomopoxvirus* (6 espécies) e *Deltaentomopoxvirus* (1 espécie) e a espécie *Diachasmimorpha entomopoxvirus* que ainda não foi agrupada dentro de um gênero. Atualmente a subfamília *Chordopoxvirinae* possui dezoito gêneros: *Avipoxvirus* (12 espécies), *Capripoxvirus* (3 espécies), *Centapoxvirus* (2 espécie), *Cervidpoxvirus* (1 espécie), *Crocodylipoxvirus* (1 espécie), *Leporipoxvirus* (4 espécies), *Macropopoxvirus* (2 espécies), *Molluscipoxvirus* (1 espécie), *Mustelpoxvirus* (1 espécie), *Orthopoxvirus* (12 espécies), *Oryzopoxvirus* (1 espécie), *Parapoxvirus* (5 espécies), *Pteropopoxvirus* (1 espécie), *Salmonpoxvirus* (1 espécie), *Sciuripoxvirus* (1 espécie), *Suipoxvirus* (1 espécie) *Vespertilionpoxvirus* (1 espécie) e *Yatapoxvirus* (2 espécies). Os representantes da subfamília *Chordopoxvirinae* têm uma extraordinária capacidade de infectar uma variedade de hospedeiros, e um determinado vírus pode ter amplo espectro de hospedeiros, a exemplo do *Cowpox virus* do gênero *Orthopoxvirus* que é capaz de infectar gatos, gado, esquilos e o ser humano (MARSCHANG, 2011; MOSS, 2013; HALLER *et al.*, 2014; (ICTV, 2020).

Os integrantes do gênero *Orthopoxvirus* estão entre os vírus mais estudados. Sua proximidade filogenética e antigênica é intensa, a ponto de sua infecção resultar em reatividade imunológica cruzada e proteção contra infecções recorrentes nos hospedeiros por vírus do mesmo gênero. Muitos *Orthopoxvirus* possuem genoma totalmente sequenciado o que facilita a compreensão em relação à evolução dos vírus do gênero, são eles o VARV, CPXV, *Vaccinia virus* (VACV), *Ectromelia virus* (ECTV), *Monkeypox virus* (MPXV), *Camelpox virus* (CMLV) e *Taterapox virus* (TATV), *Raccoonpox virus* (RCNV), *Volepox virus* (VPXV) e *Skunkpox virus* (SKPV) (HALLER *et al.*, 2014).

1.2 BIOLOGIA DOS *POXVÍRUS*

1.2.1 Morfologia

As partículas virais dos poxvirus são relativamente grandes quando comparadas a partículas virais de outros vírus que infectam animais e apresentam morfologia em forma de tijolo quando observadas por microscopia eletrônica (ICTV, 2006). Os vírions dispõem de uma membrana lipídica contendo proteínas tubulares e arranjo irregular ou de forma helicoidal que permitem a fixação e fusão com a membrana plasmática ou vesículas endocíticas. Possuem também corpúsculos laterais, que variam em número de um a dois, e são responsáveis por transportar proteínas importantes que atuam antes da expressão de genes virais (SCHMIDT, BLECK, *et al.*, 2013). Envolto por uma fina membrana, o cerne viral possui formato bicôncavo e envolve o material genético, proteínas estruturais do vírus, RNA- polimerase - dependente de DNA e vários outros fatores de transcrição de genes precoces (**figura 1**) (MOSS, 2005; ICTV, 2006; MOSS, 2013).

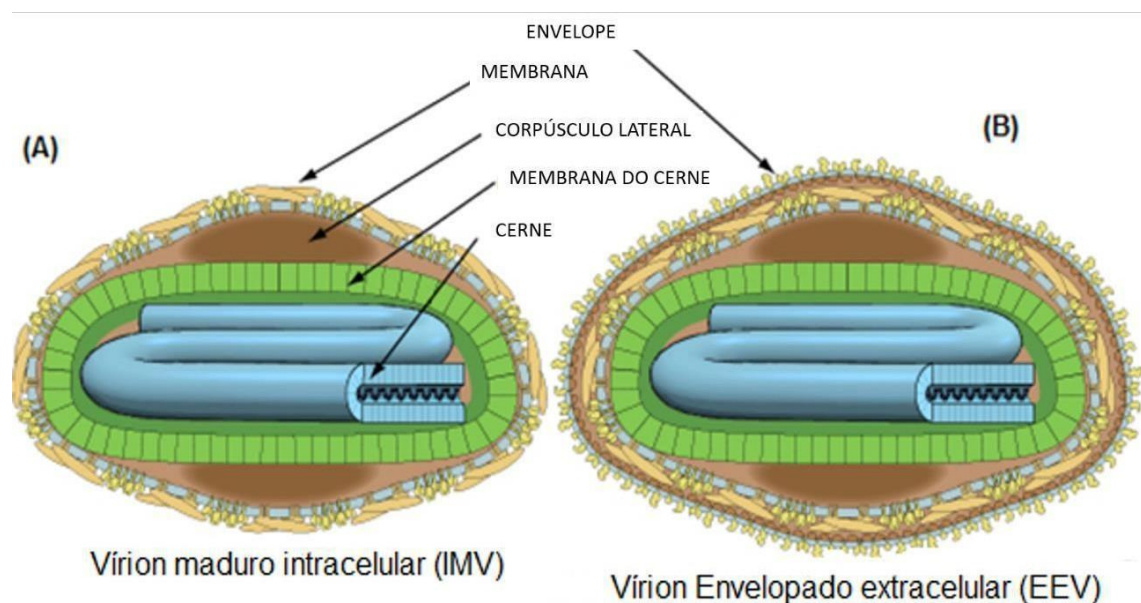


Figura 1: Morfologia do vírion dos *Poxvírus*. Representação esquemática do vírion maduro intracelular (IMV) (A) vírion envelopado extracelular (EEV) (B). Fonte: adaptado de ViralZone, 2014.

1.2.2 Genoma

O genoma dos poxvírus é composto por uma dupla fita de DNA que varia de 140 kpb em *Parapoxvirus* a aproximadamente 300 kpb em *Avipoxvirus*. As extremidades da fita são ligadas covalentemente gerando terminações em forma de grampo, importantes para a replicação do DNA, que se inicia após um corte em uma das fitas. As repetições terminais invertidas (ITRs) são ricas em Adenina (A)+ Timina (T) com sequências idênticas que margeiam as extremidades opostas do genoma apresentando tamanho variado de 0,1 a 12,4 kb devido a deleções, repetições e transposições (**figura 2**) (LEFKOWITZ *et al.*, 2006; MOSS, 2013 HALLER *et al.*, 2014).

A comparação de 26 genomas de espécies de poxvírus cujos genomas já foram sequenciados, revela que 90 genes são conservados em todos os *Chordopoxvirus* e 49 genes conservados em todos os poxvírus. Os genes conservados em *Chordopoxvirus* encontram-se na região central do genoma e não são genes sobrepostos, ou seja, o fragmento de DNA possui informação para um único gene (GUBSER *et al.*, 2004; MOSS, 2013). Esses genes são importantes para os processos de transcrição, processamento de RNA, replicação e montagem do vírion. Geralmente, no genoma dos poxvírus, os genes tendem a estar organizados em grupos que são transcritos no mesmo sentido, possivelmente para diminuir as interferências entre complexos de transcrição (LEFKOWITZ *et al.*, 2006).

Os genes que estão envolvidos na interação com o hospedeiro geralmente estão dispostos nas regiões terminais do genoma. Muitos deles são dispensáveis para a replicação do vírus em cultura celular, e quando os vírus são modificados para que não expressem esses genes apresentam-se atenuados em modelos de infecção. É possível inferir, portanto que tais genes estão associados à virulência (LEFKOWITZ *et al.*, 2006; HALLER *et al.*, 2014). Boa parte desses genes codificam proteínas que reduzem o estado antiviral do hospedeiro, afetando, por exemplo, processos de apoptose, apresentação de antígeno e mecanismos de sinalização imune (LEFKOWITZ *et al.*, 2006).

O genoma de VACV tem aproximadamente 200kbp, 200 fases abertas de leitura (ORFs) e codifica cerca de 200 proteínas. As ORFs são espaçadas e reguladas temporalmente em forma de cascata, sendo os mRNAs de fase precoce, intermediária e tardia detectados 20, 100 e 140

minutos respectivamente após a infecção em células HeLa (BALDICK & MOSS, 1993).

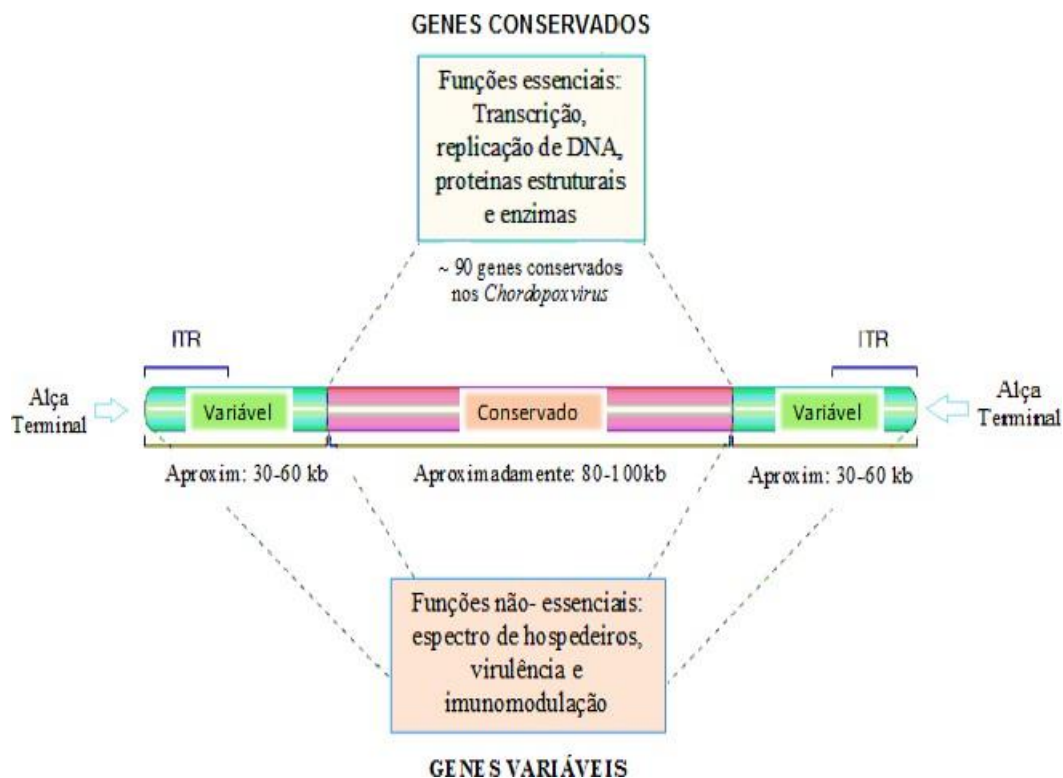


Figura 2 - Genoma dos *Chordopoxvirus*: Representação esquemática da organização genômica dos *Chordopoxvirus*, a região central apresenta genes altamente conservados que codificam proteínas com funções essenciais. As regiões ITR codificam proteínas não-essenciais. Fonte: adaptado de SMITH & MCFADDEN, 2002.

1.2.3 Multiplicação

A multiplicação dos poxvírus ocorre no citoplasma de células hospedeiras de vertebrados e invertebrados. Há formação no citoplasma de estruturas denominadas fábricas virais, cercadas por membranas derivadas do retículo endoplasmático rugoso, onde ocorre a replicação do DNA, normalmente 2 horas após a infecção (SCHRAMM & LOCKER, 2005; MOSS, 2013).

A multiplicação viral dos *Orthopoxvirus* é bem compreendida a partir de estudos sobre o VACV, o membro melhor caracterizado e modelo da explanação desse tópico. Dois tipos de partículas infecciosas são produzidos por VACV, vírions envelopados extracelulares (EEVs) e vírions maduros intracelulares (IMVs) (**figura 3**), que quando íntegras não compartilham epítomos de superfície iguais. Os IMVs possuem uma bicamada lipídica contendo ao menos 25 proteínas virais e são produzidos em maior quantidade quando em comparação com EEVs,

intervindo na transmissão hospedeiro-hospedeiro. Os EEVs são semelhantes aos IMVs, porém envolvidos por uma segunda membrana viral (envelope) contendo pelo menos seis proteínas virais exclusivas, mediando a propagação do vírus célula a célula. Além disso EEV apresenta maior resistência ao sistema do complemento do que IMV na ausência de anticorpos específicos (VANDERPLASSCHEN *et al.*, 1998; SMITH & MCFADDEN, 2002; MCFADDEN, 2005; MOSS, 2013).

IMVs podem entrar na célula através de fusão direta com a membrana plasmática ou endocitose, permitindo assim que o vírus entre no citoplasma e inicie o processo de replicação. São necessárias três etapas para a entrada do vírus: adsorção do vírus, ativação das proteínas de fusão e fusão da membrana. Proteínas de membrana de IMV se ligam a glicosaminoglicanos de superfície celular e laminina para facilitar a entrada do vírion. A proteína D8 liga ao sulfato de condroitina, A27 e H3, ao sulfato de heparana e A26, à laminina. As proteínas A21, A28, H2 e L5 também são necessárias na entrada de IMVs e são conservadas em todos os poxvírus sequenciados; a falta de qualquer uma dessas proteínas resulta em partículas não-infecciosas. Ademais, imagina-se que esse mesmo grupo de proteínas de entrada seja necessário para a fusão célula a célula induzida pelo vírus (MOSS 2005; MOSS, 2013). Embora receptores celulares específicos para IMVs ainda não tenham sido identificados, um estudo realizado por CHUNG, HUANG e CHANG, em 2005, mostrou que a depleção do colesterol presente na membrana plasmática inibe a entrada de IMVs sugerindo então um papel importante desse componente.

EEV penetra na célula por fusão direta, o que é precedido pela perda do envelope quando em contato com a célula. A eficiência dos EEVs em promover a disseminação célula a célula está relacionada com a aderência na superfície da célula mediada por projeções formadas por actina nas quais EEVs se envolvem, o que é demonstrado quando a supressão de genes relacionados com a formação de actina leva à redução da eficiência na propagação do vírus (MOSS 2005; MOSS, 2013).

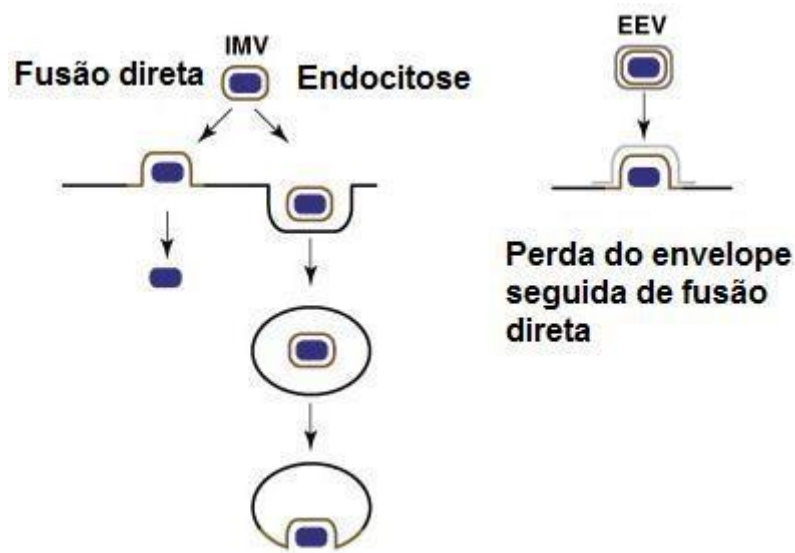


Figura 3 – Penetração de IMV e EEV na célula. Representação esquemática da entrada de IMV e EEV, evidenciando os modelos propostos para as duas partículas infecciosas. Fonte: adaptada de ROBERTS & SMITH, 2008.

Assim que o vírion tem seu nucleocapsídeo liberado no citoplasma da célula hospedeira o nucleocapsídeo é transportado através dos microtúbulos para os sítios de replicação viral (**figura 4**). A transcrição dos VACV ocorre de forma temporal e é dividida em três classes: inicial, intermediária e tardia, e a expressão dos genes de cada uma dessas classes, depende da expressão de proteínas da fase anterior. A RNA polimerase presente dentro do nucleocapsídeo e fatores de transcrição virais que são empacotados durante a montagem do vírion, iniciam a primeira cascata de expressão dos genes que codificam proteínas precoces, então os primeiros promotores virais transcrevem cerca de 100 mRNA. A síntese dessas proteínas precoces tem papel na perda do revestimento do nucleocapsídeo, liberação e replicação do DNA, codificando enzimas e fatores necessários para a síntese do DNA viral e para a transcrição dos genes intermediários. Algumas dessas proteínas parecem ser secretadas da célula apresentando importância na modulação da resposta imune e proliferação da célula hospedeira. Essa importância das proteínas precoces na liberação do DNA é demonstrada quando as células hospedeiras são tratadas com inibidores de síntese de proteína no início da infecção, demonstrando a presença mesmo depois de muitas horas do nucleocapsídeo no citoplasma (MCFADDEN, 2005; SCHRAMM & LOCKER, 2005; SMITH., 2007; MOSS, 2013).

A segunda fase se inicia com o desnudamento do nucleocapsídeo e consequentemente a liberação do DNA para ser replicado. Ocorre também a transcrição de genes intermediários, sendo que seus transcritos codificam enzimas e fatores para a expressão dos genes tardios. A

transcrição dos genes intermediários e tardios depende de fatores de transcrição do hospedeiro, ao contrário da transcrição dos genes precoces que parece estar sob controle exclusivo de fatores de transcrição virais carregados no nucleocapsídeo. A proteína viral VITF-2 do tem papel no direcionamento da RNA polimerase viral aos promotores dos genes intermediários (MCFADDEN, 2005; MOSS, 2013).

Os fatores de transcrição dos genes tardios são produzidos pela tradução dos mRNA intermediários. Os genes tardios codificam proteínas estruturais para montagem de novas partículas virais e fatores de transcrição de genes precoces que serão adicionados ao nucleocapsídeo com a RNA polimerase e outras enzimas. As proteínas de membrana do vírus são glicosiladas no complexo de golgi, iniciando a formação de partículas esféricas imaturas que após maturação formam o vírus imaturo (IV). Este ainda não possui genoma, é constituído de uma membrana com espículas e material granular. Uma massa densa contendo o genoma viral entra através do envelope imaturo e, após etapas de conversão e reorganização internas, os IVs dão origem aos IMVs, que podem então ser liberados da célula por lise. Um conjunto de IMVs se concentra próximo ao centro organizador de microtúbulos e são transportados através dos microtúbulos para o complexo de golgi ou de vesículas endossomais, onde adquirem uma dupla membrana e formam os vírus envelopados intracelulares (IEVs). Estes também utilizam microtúbulos e cinesina para mover-se até a superfície celular onde, por meio de fusão da sua membrana externa com a membrana plasmática, formam os EEVs. Algumas partículas podem permanecer associadas a membrana plasmática formando os vírus envelopados célula-associados (CEVs), fundamentais na dispersão viral célula-célula (MCFADDEN, 2005; SCHRAMM & LOCKER, 2005; SCHMIDT *et al.*, 2012; MOSS, 2013).

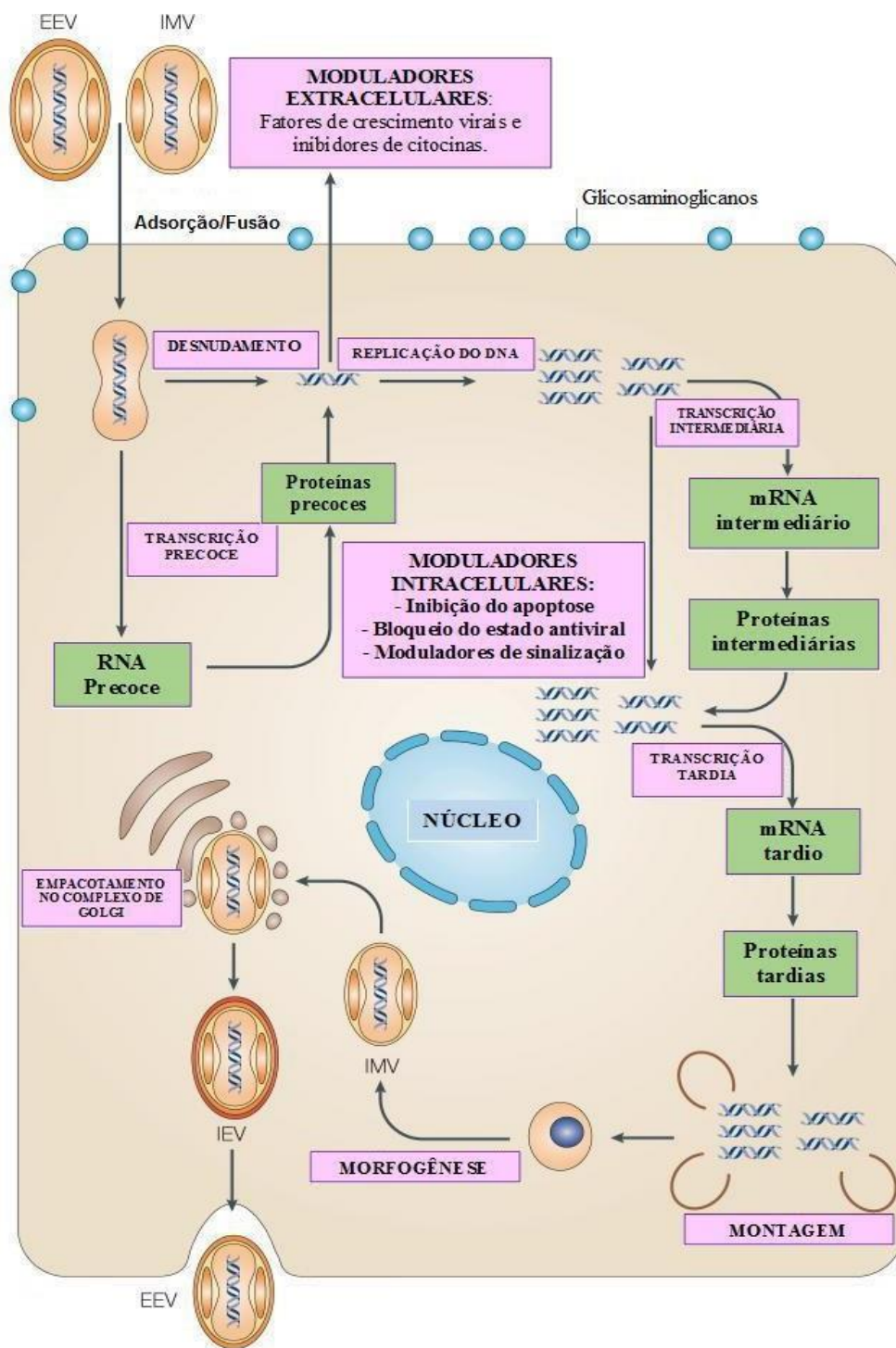


Figura 4 – Representação esquemática do ciclo de multiplicação dos poxvírus. O ciclo se inicia com a adsorção viral. Em seguida ocorre a fusão entre as membranas viral e celular liberando o cerne dentro do citoplasma da célula. Após esse desnudamento primário ocorre a transcrição dos genes precoces que codificam enzimas relacionadas com a síntese do DNA viral e fatores necessários para a transcrição dos genes intermediários. Decorre então o desnudamento secundário e a consequente liberação do DNA no citoplasma. Enzimas sintetizadas na etapa inicial da infecção atuam, então, na replicação do DNA viral. Durante e após a síntese do DNA acontece a transcrição dos genes intermediários e tardios. Por fim, as partículas virais são montadas e permanecem dentro da célula, são liberadas para o meio extracelular ou permanecem associadas à membrana plasmática. Fonte: adaptada de MCFADDEN, 2005.

1.3. ISOLADOS BRASILEIROS GUARANI P1 VIRUS E PASSATEMPO VIRUS

Estima-se que VACV circule em ambientes rurais e silvestres brasileiros há várias décadas (DA FONSECA *et al.*, 2011).

A partir de 1999, o VACV tem sido relacionado a surtos em bovinos, infecções em humanos, equinos e outros animais em diferentes regiões do Brasil. Além disso, anticorpos neutralizantes contra orthopoxvírus e DNA de VACV foram detectados em diversos animais, como macacos, gatos e capivaras (**figura 5**).



Figura 5 – Vírus Vaccinia isolados no Brasil: Isolados de VACV distribuídos em diferentes estados brasileiros. As setas indicam o estado e o VACV isolado, as linhas tracejadas em azul indicam detecção de anticorpos anti orthopoxvírus ou presença de DNA de VACV em diferentes animais em regiões distintas do Brasil. Fonte: Figura produzida pela autora.

Em outubro de 2001, no decorrer de um único surto, duas amostras de VACV geneticamente diferentes foram isoladas e designadas Guarani P1 virus (GP1V) e Guarani P2 virus (GP2V) na cidade de Guarani, Minas Gerais. Durante o estudo, em 72 propriedades que foram investigadas, lesões nos tetos de 1.020 vacas foram caracterizadas pela presença de

pápulas que evoluíram para úlceras, que progrediram para cura. Foi verificada também a presença de lesões nas mãos de aproximadamente 110 ordenhadores que em sua maioria foram infectados após contato com as lesões nos tetos das vacas. As lesões nas mãos dos ordenhadores eram principalmente pápulas e úlceras dolorosas. Eram observados sintomas de linfadenite, além de febre e infecções bacterianas secundárias. O curso da doença era de 15 a 30 dias e a transmissão pessoa a pessoas também foi relatada. O diagnóstico molecular foi realizado através de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) do gene A26L e por meio da sequência nucleotídica de um grupo de cinco genes de VACV incluindo C11R, J2R, A56R, B18R e E3L. Esses dados confirmaram a presença de dois VACV que apresentam diferenças genéticas importantes (TRINDADE *et al.*, 2006).

No município de Passa-Tempo no estado de Minas Gerais foi relatada uma epidemia de VACV, em março de 2003, em pequenas propriedades rurais acometendo vacas e ordenhadores. As vacas apresentavam lesões no úbere e tetos (**figura 6**), com aspecto semelhante ao de lesões relatadas em outros surtos de VACV no Brasil. Os ordenhadores relataram lesões nas mãos após contato desprotegido com as vacas doentes. Sinais clínicos como febre alta, dor de cabeça intensa, dor nas costas e linfadenopatia também eram relatados pelos ordenhadores. Após ensaio de RFLP o vírus foi purificado e titulado e batizado de Passatempo virus (PSTV). O PSTV apresenta a mesma assinatura genética composta pela ausência de 18 nucleotídeos no gene HA, identificado em CTGV, ARAV e VACV-IOC (LEITE *et al.*, 2005).



Figura 6 - Lesões provocadas por PSTV. Lesões ulcerativas em 1 e 2, mastite causada por infecção bacteriana secundária em 3, lesões no focinho e mucosa bucal em 4 e 5, lesões em ordenhador em 6. Fonte: adaptado de LEITE *et al.*, 2005.

A partir dos diversos estudos realizados por pesquisadores brasileiros, os isolados de VACV foram divididos em dois grupos: grupo 1 (menos virulento em modelos de infecção murina), grupo 2 (mais virulento em modelos de infecção murina). Essa divisão reflete propriedades biológicas dos isolados, como virulência em camundongos BALB/c, fenótipo de placas em células BSC-40 e presença ou ausência de uma deleção de 18 nucleotídeos no gene codificador da proteína hemaglutinina viral (HA ou A26R). A Tabela 1 apresenta os isolados descritos até o momento, de acordo com sua inclusão nos grupos 1 ou 2.

Tabela 1 – Relação dos isolados de VAVCs obtidos no Brasil de acordo com o grupo filogenético

GRUPO 1	REFERÊNCIA
<i>Cantagalo virus</i>	Damaso <i>et al.</i> , 2000
<i>Aracatuba virus</i>	Trindade <i>et al.</i> , 2003
<i>Passatempo virus</i>	Leite <i>et al.</i> , 2005
<i>Guarani P2 virus</i>	Trindade <i>et al.</i> , 2006
<i>Muriae virus</i>	Trindade <i>et al.</i> , 2007
<i>Serro Virus</i>	Trindade <i>et al.</i> , 2009
<i>Mariana virus</i>	Abrahão <i>et al.</i> , 2009
<i>Pelotas 2 virus</i>	Campos <i>et al.</i> , 2011
<i>Maranhão virus</i>	Oliveira <i>et al.</i> , 2013
DOR2010	Abrahão <i>et al.</i> , 2015
<i>Pará virus</i>	De Assis <i>et al.</i> , 2013
Serro-2011	De Assis <i>et al.</i> , 2012
VACV-BM2012	Franco-Luiz <i>et al.</i> , 2016
Carangola EYE virus 1	Lima <i>et al.</i> , 2018
GRUPO 2	
<i>Guarani P1 virus</i>	Trindade <i>et al.</i> , 2006
<i>Pelotas 1 virus</i>	Campos <i>et al.</i> , 2011
<i>Bean 58058 virus</i>	Da Fonseca <i>et al.</i> , 1998
SPAn23	Da Fonseca <i>et al.</i> , 2002
<i>Belo Horizonte virus</i>	Trindade <i>et al.</i> , 2004
Carangola EYE virus 2	Lima <i>et al.</i> , 2018

Fonte: Tabela produzida pela autora.

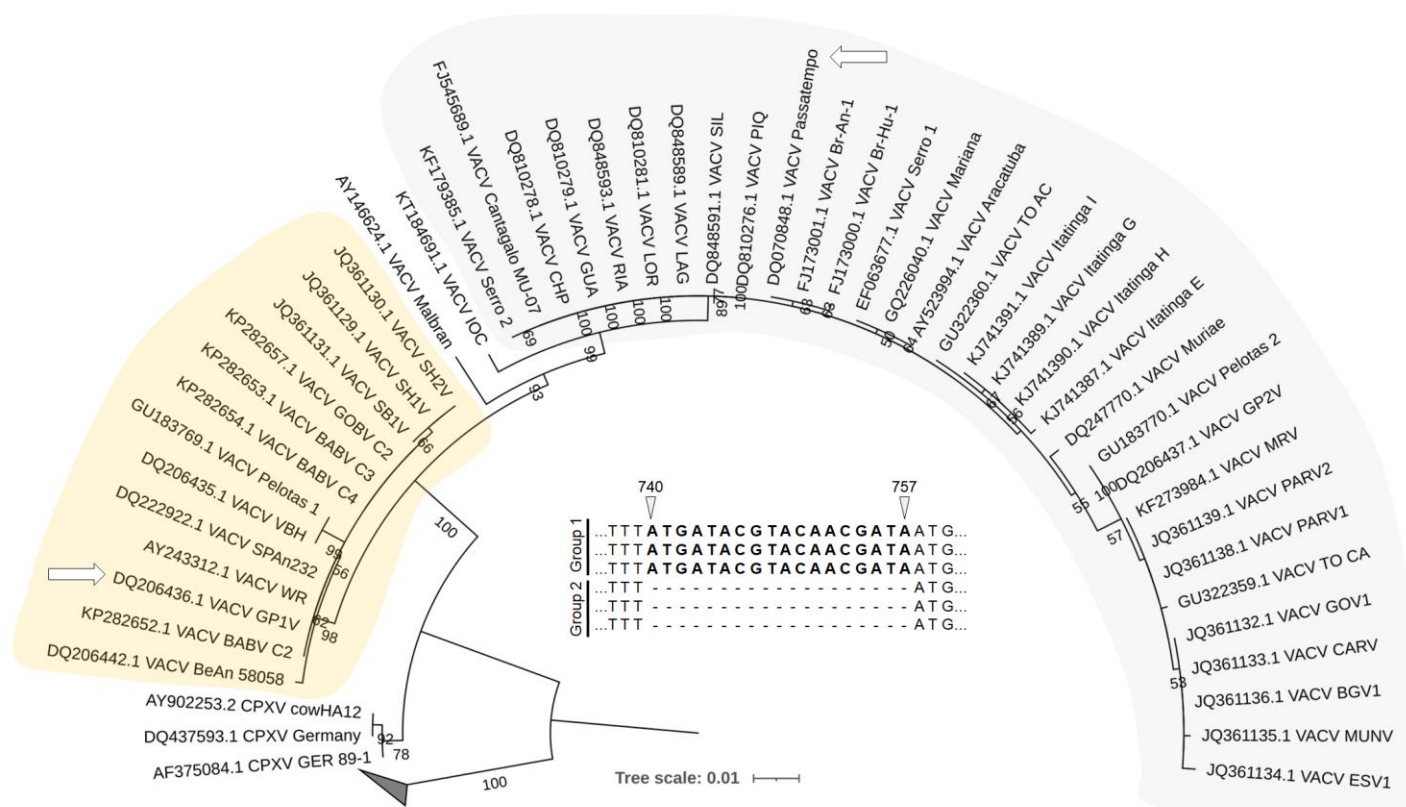


Figura 7 - Arvore filogenética do BR-VACV com base nas seqüências de nucleótídeos do gene A56R (hemaglutinina). BR-VACV grupo 1 é destacado com amarelo claro e o grupo 2 com azul claro. Setas brancas indicam os vírus brasileiros usados neste estudo. Fonte: LOURENÇO *et al.*; 2020 manuscrito submetido para publicação.

Em função da diversidade genética encontrada entre os dois grupos de VACV, são sugeridas hipóteses para sua origem. Uma hipótese propõe que os VACVs podem ter várias e diferentes origens, tendo sido introduzidos, no Brasil, múltiplas vezes e a partir de diversas fontes (DA FONSECA *et al.*, 2011).

1.4 VIAS DE RESPOSTA AO ESTRESSE DO RETICULO ENDOPLASMÁTICO

A multiplicação dos poxvírus está intimamente relacionada ao retículo endoplasmático (RE). As fábricas virais produzidas durante a replicação dos poxvírus são envoltas por membranas do RE e essa conformação é necessária para a eficiente replicação do DNA viral (TOLONEN *et al.*, 2001; MOSS; 2013).

Nas células eucarióticas, o RE é particularmente importante nas modificações pós-traducionais de proteínas, antes destas serem liberadas extracelularmente ou enviadas para outro sistema de endomenbranas. A obtenção da conformação tridimensional correta da maioria das proteínas ocorre no lúmen do RE, que possui um ambiente oxidativo fundamental para a formação de pontes dissulfeto, importantes na manutenção da estrutura de proteínas. O RE é uma organela versátil, que garante a estrutura correta das proteínas é essencial na síntese de lipídeos, esteróis além de oferecer suporte na manutenção do cálcio intracelular (FAGONE & JACKOWSKI, 2009). Por consequência, o RE é capaz de responder a perturbações ocasionadas pelo acúmulo de proteínas mal dobradas, levando ao processamento adequado dessas proteínas ou até a morte celular programada. Uma série de fatores podem levar a indução de uma resposta a proteínas mal-dobradas (*Unfolded Protein Response* – UPR) (**figura 7**) dentre eles: estresses abióticos, mutações genéticas, agentes farmacológicos, patógenos intracelulares. Quando ocorre um acúmulo de proteínas mal dobradas no RE, estas podem sofrer ubiquitinação (Ub) e degradação proteossômica através de componentes do sistema de degradação associado ao RE (ERAD). Uma vez que ocorre uma atividade prolongada da via UPR, indicando que a homeostase não pode ser restabelecida, componentes dessa via induzem a morte celular por apoptose (RUTKOWSKI & KAUFMAN, 2004; NELSON & COX, 2005; XU *et al.* 2005; HUSSAIN & RAMAIAH, 2007).

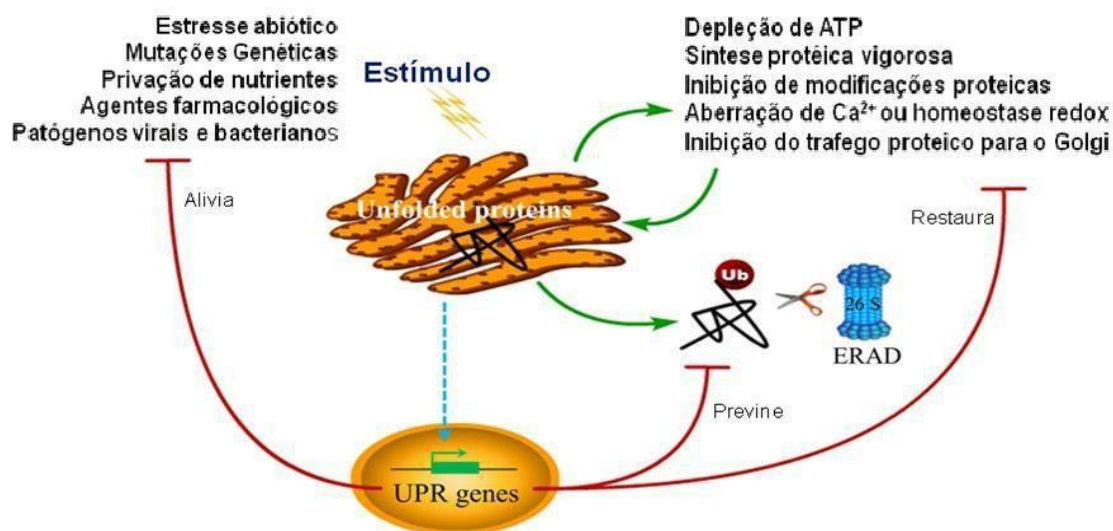


Figura 8 - Estresse do RE e funções da UPR. Alterações na homeostase do RE acarretam na sobrecarga de proteínas mal-dobradas no lúmen do RE, ativando via de resposta ao estresse do RE. A UPR é desencadeada pelo acúmulo de proteínas mal-dobradas induzidas por agentes químicos, carência nutritiva, mutações genéticas e patógenos. A ativação da via UPR tem como objetivo a restauração das funções normais de RE. A UPR é capaz de eliminar proteínas mal-dobradas através de ubiquitinação (Ub) e degradação mediada pelo proteassoma através de uma via conhecida como ERAD. Contudo, se a homeostase do RE não for restabelecida, a via UPR pode ativar vias de apoptose. **Fonte:** Adaptado de ZHANG & WANG, 2012.

Uma das vias pró-apoptóticas inclui a produção do fator de transcrição CCAAT-*Enhancer-Binding Protein Homologous Protein* (CHOP), que está sob regulação de todos os eixos da via UPR (OYADOMARI & MORI, 2004; HUSSAIN & RAMAIAH, 2007; XU et al. 2005). CHOP está vinculado a indução ou supressão de vários genes relacionados com ações corretivas da via. Existe uma indicação que CHOP regula positivamente a síntese de membros da família de receptores TNF (do inglês, *Tumor Necrosis Factor*) que contém o domínio de morte e induz a repressão da transcrição de proteínas supressoras de apoptose da família Bcl-2 (*B Cell Lymphoma 2*) (XU et al. 2005; NISHITOH., 2012). A proteína CHOP é produzida intensamente quando a célula, por exemplo, é exposta a fármacos, e a diminuição da produção ocorre com uma contínua regulação positiva de chaperonas (RUTKOWSKI et al., 2006; HOSOI & OSAWA, 2010; WALTER & RON; 2011; TABAS & RON, 2011).

A ativação das vias de estresse do RE é estabelecida com aumento e acúmulo de proteínas mal dobradas interagindo diretamente com proteínas como a Chaperona BiP (proteína de ligação à imunoglobulina, Grp78), ocorrendo uma competição entre as proteínas mal dobradas e o domínio do sensor IRE1, para a ligação à BiP; dessa forma essas proteínas ativam IRE1 se ligando a BiP levando a sua dissociação do sensor (LI et al., 2008). Contudo, Pincus e colaboradores sugerem que a BiP acelera a desativação de IRE1 quando a homeostase está sendo restabelecida, mas não exerce um papel crucial na ativação dessa via. A via UPR, além de controlar a ativação da resposta a proteínas mal dobradas, tem sido relacionada a funções importantes da resposta imune (KAMIMURA et al., 2008; ROACH et al., 2007; RICHARDSON et al., 2010).

1.4.1 Sensores do Estresse do Retículo Endoplasmático

A via UPR possui três eixos: o do Fator de Transcrição 6 (*Activating Transcription Factor 6* ATF6), o da Proteína Cinase Dependente de Inositol (*Inositol-requiring Transmembrane Kinase and Endonuclease*, ou IRE-1 α) e o da Proteína Cinase Residente no RE semelhante à PKR (*PKR-like Endoplasmic Reticulum Kinase*, ou PERK) (**figura 8**) (MARCINIAK & RON, 2006). Essas moléculas são desativadas por meio da ligação da chaperona do RE, BiP/GRP78 (*Binding Protein/heat shock protein* de 78kDa regulada por glicose) no domínio voltado para o lúmen do RE (LI *et al.*, 2008).

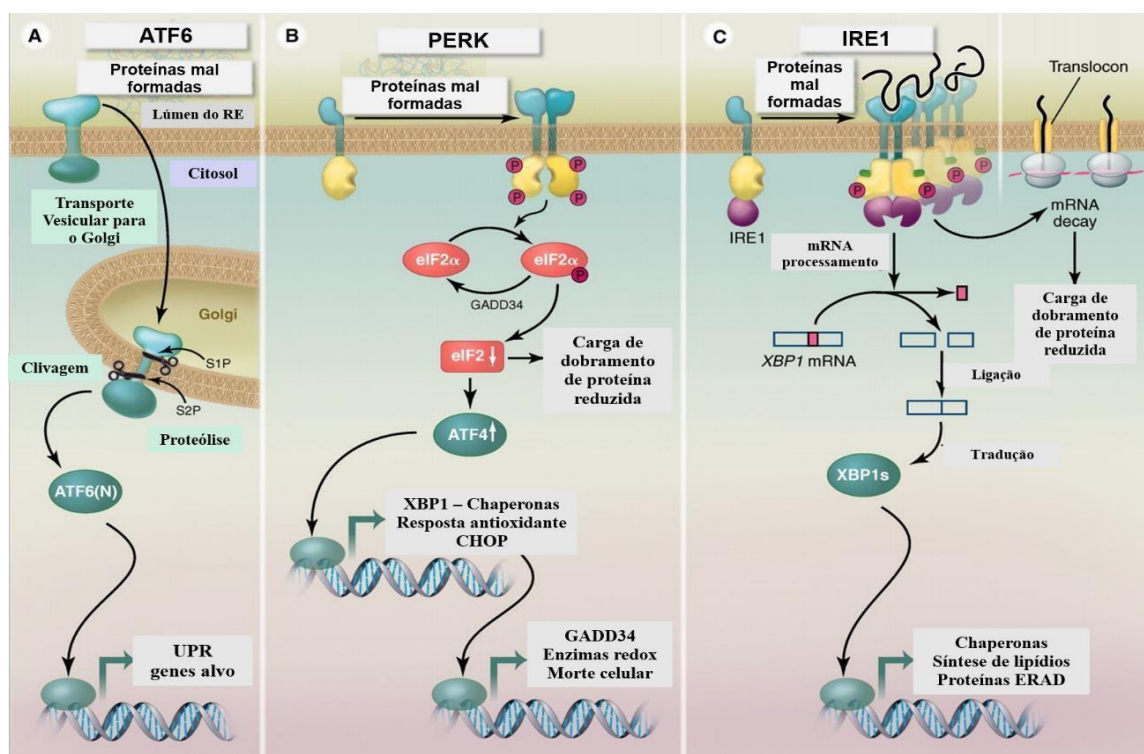


Figura 9 - Mecanismo de ação dos três principais eixos da via UPR. De A a C, os três sensores da via UPR, ATF6, PERK e IRE1. Esses sensores detectam proteínas mal-dobradas no RE, resultando na produção de genes alvos da via UPR. Existe um mecanismo diferente de transdução de sinal para cada sensor da via UPR: IRE1 por *splicing* não convencional de mRNA, ATF6 por proteólise regulada e PERK através de controle translacional. Essas respostas transcricionais auxiliam principalmente na capacidade de dobragem de proteínas no RE. Ademais, PERK e IRE1 são capazes de reduzir a carga de dobragem no RE por tradução e degradação de mRNAs respectivamente. **Fonte:** modificado de WALTER & RON, 2011.

O eixo da via UPR mais conservado é o IRE-1 α , uma glicoproteína transmembrana do tipo I que utiliza um mecanismo único de *splicing* que leva à expressão de genes relacionados com dobramento e controle de qualidade de proteínas. Ela apresenta uma parte voltada para o lúmen do RE sensível à polipeptídeos mal dobrados. A ativação de dessa via ocorre em função

da ligação de proteínas mal dobradas em IRE1, resultando em uma mudança conformacional e ativação do domínio endorribonuclease. A ativação desse domínio inicia o processamento pós-transcricional do mRNA do fator de transcrição XBP-1 (*X-box binding protein*) produzindo outro fator de transcrição da família b-ZIP (zíper de leucina e a região básica da proteína que é responsável pela ligação ao DNA). Esse processo resulta na expressão de chaperonas, enzimas modificadoras e remodelamento de membrana (**figura 9**) (XU *et al.*, 2005; SCHRÖDER & KAUFMAN, 2006; RON & WALTER, 2007; HUSSAIN & RAMAIAH, 2007, LIN *et al.*, 2007; PINCUS *et al.*, 2010; TABAS & RON, 2011 GROOTJANS, KASER, *et al.*, 2017).

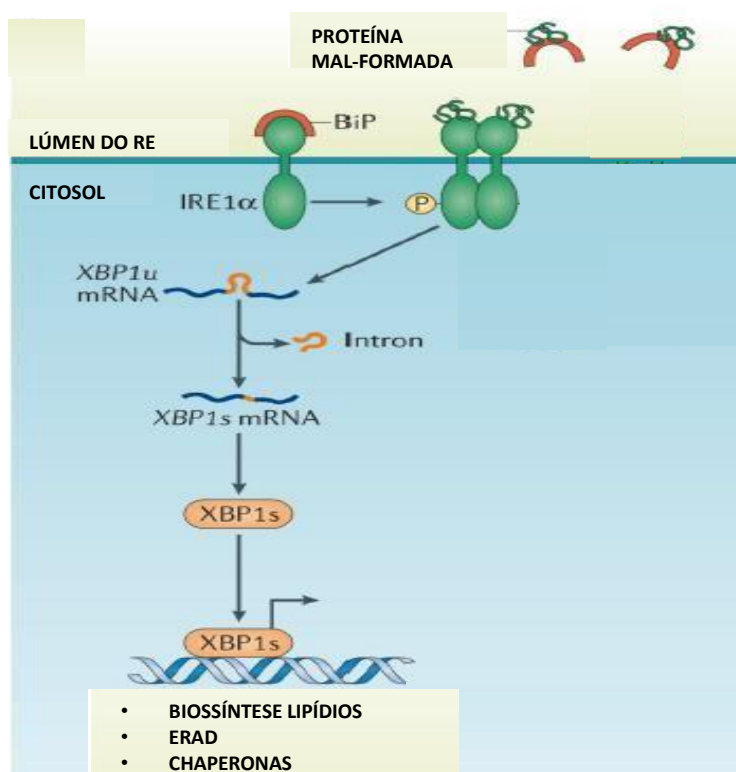


Figura 10 - A proteína cinase dependente de inositol (IRE1). A auto-fosforilação no domínio cinase de IRE1, aumenta a afinidade dos nucleotídeos (N), que alostericamente ativam IRE1 e desencadeiam sua atividade de endorribonuclease. A clivagem de XBP-1 libera um pequeno fragmento de RNA (íntron) e as duas extremidades do mRNA são ligadas. O mRNA XBP1 codifica um ativador transcrricional potente (XBP1s), ao passo que o mRNA XBP1 não clivado codifica XBP1u, um inibidor da via UPR. Em mamíferos, XBP1 regula um conjunto de genes que promovem a ativação de ERAD, síntese de lipídios e chaperonas. **Fonte:** modificado de GROOTJANS, KASER, *et al.*, 2017.

Outro sensor da via UPR é denominado PERK, que quando ativada reconhece e fosforila a subunidade alfa do fator de iniciação da tradução em eucariotos (eIF2 α), inativando indiretamente eIF2 α e inibindo a tradução de mRNAs (**figura 10**). Por consequência, PERK

auxilia na redução do fluxo de proteína, atenuando o estresse. Em condições de estresse, a redução dos níveis de eIF2 α facilita a tradução do fator de transcrição 4 (ATF-4), que induz a transcrição de genes importantes como CHOP, GADD34 e ATF-3, genes relacionados à resistência ao estresse oxidativo, transporte de aminoácidos e biossíntese de glutatona (HUSSAIN & RAMAIAH, 2007; LEE *et al.*, 2010). GADD34 através de sua subunidade reguladora pode desfosforilar eIF2 α , e assim, restaurar as condições normais de proteínas e converter a tradução de ATF-4 para níveis basais. A propriedade de PERK de reverter as condições após episódios de estresse, é importante para prevenir danos causados pela depleção de eIF2 α (WALTER & RON, 2007; WALTER *et al.*, 2015).

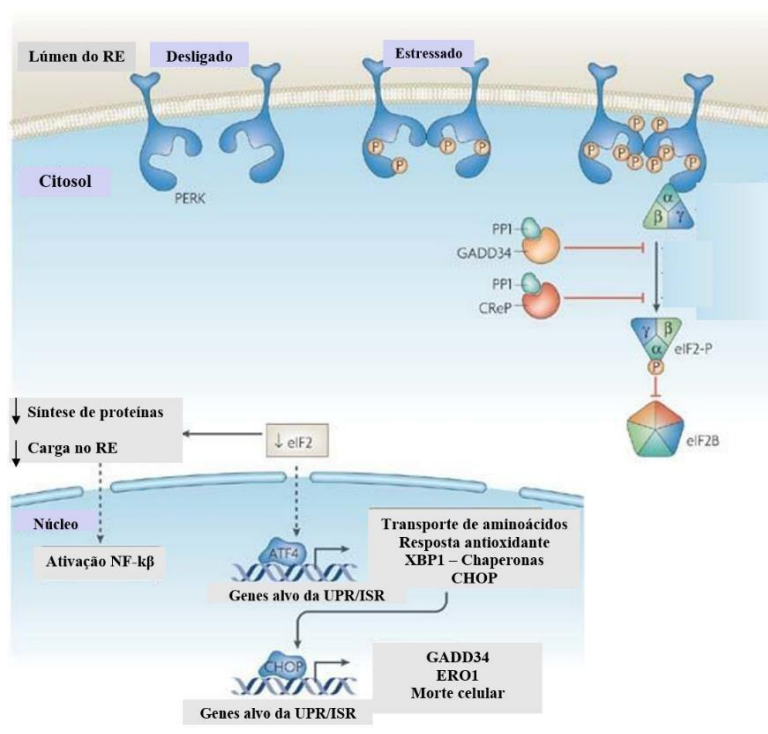


Figura 11- Sinalização por PERK. Quando ativa por fosforilação, PERK reconhece e fosforila a subunidade alfa do eIF2 α , impossibilitando troca do nucleotídeo GDP por GTP feita pelo complexo pentamérico eIF2B e consequentemente atenua a tradução de mRNAs. A diminuição da produção de proteína global diminui a carga de proteínas mal-dobradas, afetando também a transcrição de genes. Os níveis baixos de eIF2 α aumentam a transcrição de ATF4 e ativa NF-K β . Esse processo leva à ativação de genes que codificam transporte de aminoácidos e genes que protegem contra o estresse oxidativo, além de auxiliar na ativação transcripcional de XBP1. CHOP também é ativado por ATF4 e seus genes alvos GADD34, ERO1, necessários para a formação de ligações dissulfeto na dobragem de proteínas. Fonte: modificado de WALTER & RON, 2007.

ATF6 é uma proteína transmembrana do tipo II do RE, que possui um domínio voltado para o lúmen do RE (**figura 11**). Quando ocorre o acúmulo de proteínas mal dobradas ATF-6 é transportado por meio de vesículas até o complexo de Golgi, onde o sensor é clivado por duas

proteases, sítio 1 (S1P) e sítio 2 (S2P), e produzem um domínio amino-terminal de 50 kDa (N-ATF6/p50ATF6). Esse domínio é, então, translocado para o núcleo onde ativa a transcrição de genes alvos da UPR, que resultam na síntese de chaperonas, e enzimas modificadoras de CHOP.

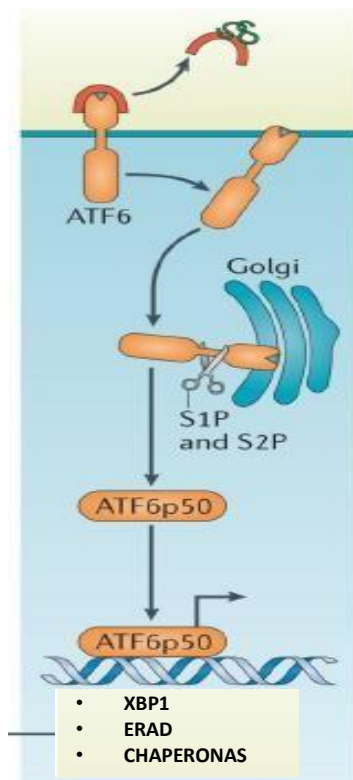


Figura 12 - Sinalização por ATF6. Em condições de estresse, BiP se desliga de ATF6 e CREBH, entregando essas proteínas ao complexo de golgi. No complexo de golgi essas proteínas sofrem clivagem por S1P e S2P, permitindo a importação do domínio amino-terminal para o núcleo. Dessa forma ATF6 ativa um subconjunto de genes da via UPR. CREBH por sua vez ativa genes de resposta de fase aguda que codificam proteínas segregadas envolvidas na inflamação. Fonte: modificado de GROOTJANS, KASER, *et al.*, 2017.

Diversos vírus pertencentes a diferentes famílias virais já foram estudados quanto à sua capacidade de modular vias de resposta ao estresse. Essa modulação pode ativar ou suprimir essas vias, tanto para o escapar de componentes da resposta imune e morte, quanto para explorar essas vias a favor de sua própria replicação. Foi demonstrado que a infecção pelo DENV2, ativa PERK e IRE1 mas suprime a ativação de ATF-6 em monócitos THP-1. A infecção por DENV2 ativa PERK no início da infecção, mas suprime essa resposta posteriormente. Quando as células THP-1 infectadas com DENV2, foram tratadas com um inibidor de BiP, foi verificada a ativação de PERK, ATF-6 e IRE1. A inibição de BiP resultou

na diminuição de expressão das proteínas de envelope de DENV2 e provocou a ativação de fatores imunes inatos, como o fator responsivo ao de interferon (IRF3), NF- κ B e il-1 β (DIWAKER, MISHRA & GANJU; 2015).

A via IRE1 também foi suprimida na infecção em células HeLa pelo *Human herpesvirus 1* (HHV-1). A expressão de XBP1 é reduzida pela proteína UL41 do HHV-1, uma endorribonuclease de grande especificidade que leva a uma rápida degradação de mRNAs do hospedeiro. O *Human herpesvirus 1* (Herpes-virus humano tipo 8 - HHV-8), assim como HHV-1, modula a ativação dos eixos PERK e IRE1, impedindo principalmente a indução de vias pró-apoptóticas (SHIGEMIZ *et al*; 2016; ZHANG; 2017).

Rathore e colaboradores observaram que a infecção em células embrionárias de rim humano (HEK293), pelo *Chikungunya virus* (CHIKV) ativa seletivamente as vias ATF-6 e IRE1 e modula PERK em estágios diferentes da infecção. A replicação de CHIKV acarretou na indução de chaperonas como BiP e HSP-90, induzindo um alívio no estresse causado pelo acúmulo de proteínas mal-dobradas no RE. Em contrapartida, a proteína não estrutural 4 (nsP4), suprime a fosforilação de eIF2 α nos estágios iniciais da infecção, (3-24 h), permitindo uma grande produção de proteínas virais, contudo, foi observado que após 48 horas de infecção, os níveis de fosforilação de eIF2 α estavam elevados. Esses mecanismos de modulação de PERK, fornecem um mecanismo para uma replicação viral robusta (RATHORE, NG & VASUDEVAN; 2013).

Diante da conhecida capacidade de vários vírus pertencentes a famílias virais diferentes em modular vias de resposta ao estresse do RE, foi avaliado o efeito da infecção por VACVs sobre a via de resposta a proteínas mal dobradas. Para essa análise, diferentes linhagens celulares foram infectadas com os vírus VACV-WR e MVA (Vírus Vaccinia Ankara Modificado). Foi observado que WR e MVA, são capazes de modular negativamente a ativação de IRE1, por outro lado, induzem a translocação nuclear de ATF6, além de induzir significativamente sua atividade transcricional. Utilizando células deficientes para o sensor PERK, foi observado que VACV-WR se multiplica de forma eficiente mesmo na ausência desse eixo da via UPR. Entretanto quando avaliada a multiplicação de VACV-WR e MVA em células deficientes para o sensor ATF6, foi visto que esses vírus apresentam menor produtividade quando comparada à infecção em células selvagens (LEÃO *et al*; 2020 manuscrito em preparação).

1.5 RESPOSTA IMUNE DO HOSPEDEIRO ÀS INFECÇÕES PELOS POXVÍRUS

A compreensão acerca da resposta imune aos *Orthopoxvirus* tem sido alvo de estudos, devido às frequentes infecções zoonóticas causadas por esses vírus. Já existem muitos estudos que visam a compreensão da resposta imune em modelos animais. Entretanto, os dados a respeito da resposta imune em seres humanos são limitados, principalmente porque boa parte das informações é proveniente de dados clínicos de pacientes que contraíram varíola ou de indivíduos que foram vacinados (PANCHANATHAN *et al.*, 2008; GOMES *et al.*, 2012).

As infecções por poxvírus induzem uma robusta produção de IFN que apresenta dois papéis no seu controle da infecção. Primeiro, na presença do vírus, ele induz um estado antiviral nas células vizinhas, inibindo o crescimento celular e estimulando a expressão do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe I. Segundo, ele ativa macrófagos, NK e linfócitos T citotóxicos. Apesar disso, níveis elevados de IFN *in vivo* nem sempre estão relacionados com a depuração da infecção (*revisado por* SMITH & KOTWAL, 2002; PANCHANATHAN *et al.*, 2008).

O sistema complemento é um importante componente do sistema imune inato, e é importante no bloqueio da infecção por poxvírus através da via clássica e da via alternativa. Depois da ativação dessas vias, agentes quimiotáticos pró-inflamatórios são liberados e resultam na migração de leucócitos para a área da infecção. A consequência da ativação do complemento é a formação do complexo de ataque à membrana (MAC) que leva a lise da célula infectada. Outra possibilidade é a neutralização dos poxvírus através da acumulação de componentes do complemento na superfície viral (OHTA *et al.*, 1986; SMITH & KOTWAL, 2002; GOMES *et al.*, 2012)

Anticorpos atuam de diversas formas contra os poxvírus: agregando-se ao vírus e impedindo a adsorção viral, provocando sua opsonização e acarretando a fagocitose, ou ainda recobrando a superfície da membrana celular resultando na citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC). Porém algumas pesquisas têm demonstrado que vários mecanismos desempenhados por anticorpos não são capazes de proteger o hospedeiro durante a infecção primária e secundária (HANSSON *et al.*, 1966; SMITH & KOTWAL, 2002).

Células NK são recrutadas para os tecidos infectados por citocinas inflamatórias e quimiocinas. Assim que se tornam ativas, elas lisam a célula alvo por meio da liberação de perforinas e granzinas. (KARUPIAH, COUPAR, *et al.*, 1990; MORETTA *et al.*, 2000; SMITH & KOTWAL, 2002).

Os linfócitos T CD8⁺ são importantes na resposta imune adquirida, mediada por células, contra poxvírus. Eles reconhecem células infectadas com vírus, e destroem-nas antes da maturação do mesmo, assim, reduzindo a propagação viral. Linfócitos T CD8⁺ são importantes também na reinfecção por poxvírus, agindo de forma rápida na eliminação viral (ANDREW V *et al.*, 1989; SMITH & KOTWAL, 2002; XU *et al.*, 2004).

1.5.1 Imunomodulação por poxvírus

A via UPR tem papel crucial na resposta imune, relacionando-se com a maturação e diferenciação de células imunitárias, além da produção de citocinas. O fator de transcrição XBP1 tem papel importante, por exemplo, na diferenciação e função de células plasmáticas e dendríticas (GROOTJANS *et al.*, 2016). Diante disso, a modulação da via UPR teria papel importante na resposta imune pela infecção por poxvírus.

Uma das razões do sucesso replicativo dos poxvírus perante a imunidade inata e adquirida do hospedeiro está na sua habilidade de obstruir, escapar ou ainda subverter elementos essenciais da resposta antiviral. Poxvírus são capazes de codificar um repertório de proteínas relacionadas com a evasão da resposta imune (**figura 12**). Essas proteínas que se relacionam com sistema imune do hospedeiro são surpreendentemente diversas, ao ponto de nenhum gene imunomodulador ser comum a todos os genomas de poxvírus. Essa inexistência de conservação entre os genes imunomoduladores dos poxvírus é um reflexo de sua habilidade de infectar diferentes hospedeiros, apresentar tropismo tecidual variado e também em razão de diferenças fenotípicas observadas durante manifestações clínicas (SMITH & KOTWAL, 2002; JOHNSTON & MCFADDEN, 2003; SEET *et al.*, 2003). Silva-Gomes e colaboradores demonstrou que a habilidade dos poxvírus em modular negativamente a resposta imune do hospedeiro é diretamente proporcional à sua virulência *in vivo* (SILVA-GOMES *et al.*, 2012; DE FREITAS *et al.*, 2018). Esse perfil modulatório também foi observado em pacientes naturalmente infectado por VACV, que apresentaram baixa produção de INF- γ por CD4⁺ (TRINDADE *et al.*, 2009).

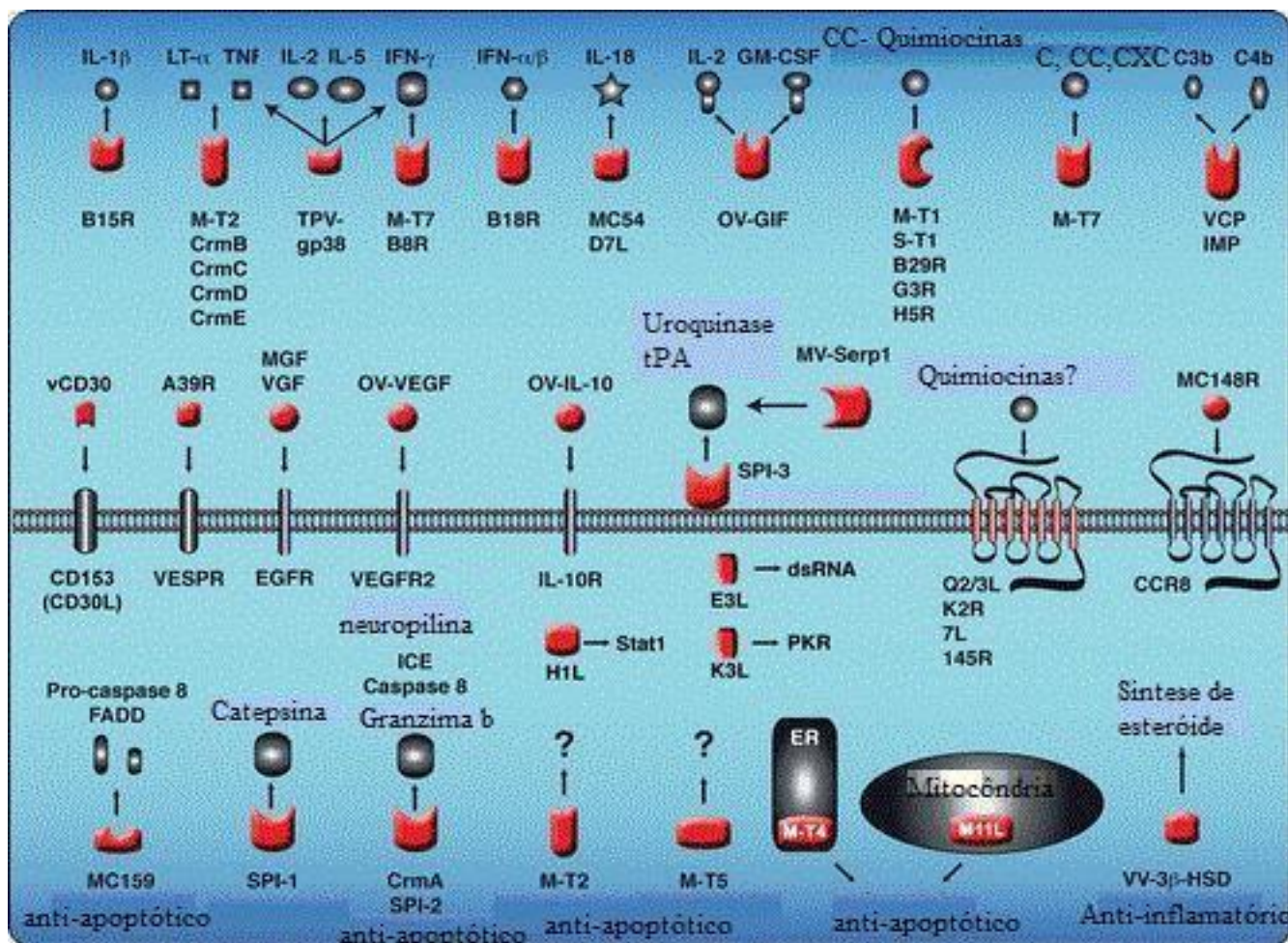


Figura 13 – Representação esquemática das proteínas imunomoduladoras de poxvírus (vermelho) e proteínas do hospedeiro (cinza). Proteínas extracelulares estão acima da membrana e as intracelulares abaixo da membrana. Os viroreceptores funcionam como receptores de superfície celular ou receptores solúveis, que se ligam a citocinas ou quimiocinas do hospedeiro. Virocinas são secretadas e podem se ligar os receptores celulares do hospedeiro. Algumas proteínas intracelulares dos poxvírus, modulam a apoptose e o processamento de citocinas. Fonte: adaptado de (SEET *et al.*, 2003).

Todas essas proteínas moduladoras de poxvírus podem ser classificadas de acordo com o modo de ação, intracelular ou extracelular. As proteínas que atuam intracelularmente e interferem na resposta a infecção no interior da célula, como estado antiviral, explosão oxidativa e vias apoptóticas são denominadas virotransdutores. Proteínas de virocamuflagem operam intracelularmente reduzindo a possibilidade de detecção pelo sistema imunológico através da regulação negativa de moléculas de MHC de classe I e CD4. As proteínas que atuam extracelularmente são classificadas como de viromimetismo, podem também ser agrupadas como viroreceptores e virocinas. Os viroreceptores são secretados na superfície celular, dessa forma atuam como receptores competitivos de citocinas e quimiocinas do hospedeiro, interferindo na sua função. As virocinas imitam citocinas, quimiocinas e fatores de

crescimento, assim subvertendo a resposta do hospedeiro e promovendo um ambiente favorável à replicação e disseminação viral (JOHNSTON & MCFADDEN, 2003; STANFORD *et al.*, 2007).

Tabela 2 - Proteínas imunomoduladoras expressa por poxvírus

<i>Vírus</i>	<i>Proteína</i>	<i>Função</i>	<i>Referência</i>
VACV	VCP	Ligação em proteína do sistema complemento	SMITH & KOTWAL, 2002; DEHAVEN <i>et al.</i> , 2010; SMITH <i>et al.</i> , 2013
<i>Orf virus</i>	vIL-10	Inibição da expressão de citocinas	SMITH & KOTWAL, 2002; SEET <i>et al.</i> , 2003; STEWART & COOKSON, 2016
MCV, ECTV, VACV e CPXV	vIL-18BP	Bloqueia IL-18	SMITH & KOTWAL, 2002; SEET <i>et al.</i> , 2003; STEWART & COOKSON, 2016
VACV, ECTV, VARV, CPXV e CMLV	vIFN γ R	Bloqueia TNF	SMITH & KOTWAL, 2002; JOHNSTON & MCFADDEN, 2003; SEET <i>et al.</i> , 2003; SMITH <i>et al.</i> , 2013
VACV e VARV	VIL-1R	Bloqueia IL-1	SMITH & KOTWAL, 2002; JOHNSTON & MCFADDEN, 2003; SEET <i>et al.</i> , 2003; SMITH <i>et al.</i> , 2013
<i>Orf virus</i>	GIF	Bloquear GM-CSF e IL-2	SMITH & KOTWAL, 2002; SEET <i>et al.</i> , 2003

MCV	MC148	Bloqueia a ligação de quimiocinas	SMITH & KOTWAL, 2002; SEET <i>et al.</i> , 2003
MV	T1	Bloquear a migração de monócitos	GRAHAM <i>et al.</i> , 1997; KETTLE <i>et al.</i> , 1997; SMITH & KOTWAL, 2002
CPXV	CrmA	Impede apoptose através do bloqueio da enzima conversora de IL-1	SMITH & KOTWAL, 2002; SEET <i>et al.</i> , 2003; STEWART & COOKSON, 2016
VACV	SPI-2	Impede apoptose através do bloqueio da enzima conversora de IL-1	SMITH & KOTWAL, 2002; SEET <i>et al.</i> , 2003; STEWART & COOKSON, 2017
MV	Serp-2	Impede apoptose através do bloqueio da enzima conversora de IL-1	SMITH & KOTWAL, 2002; SEET <i>et al.</i> , 2003; STEWART & COOKSON, 2018
VACV	A56	Bloqueio na ativação de células NK	SEET <i>et al.</i> , 2003; JARAHIAN <i>et al.</i> , 2011; SMITH <i>et al.</i> , 2013
VACV	A46, A49, A52, B14, C4, E3, K1, K7, M2 e N1	Inibe a ativação de NF- kB	SEETN <i>et al.</i> , 2003; JARAHIAN <i>et al.</i> , 2011; SMITH <i>et al.</i> , 2013

Fonte: Tabela produzida pela autora.

2 JUSTIFICATIVA

Desde 1999 surtos envolvendo VACV tem sido frequente no Brasil. A maioria das ocorrências zoonóticas acometem o gado leiteiro e ordenhadores, porém, foram associados a inúmeros outros hospedeiros no Brasil. Nas manifestações em humanos são relatadas a formação de lesões vesiculares pelo corpo, linfadenopatia, dor de cabeça e febre. A emergência dessas zoonoses é reflexo da ausência de imunidade adquirida por essa população, uma vez que a vacinação contra varíola teve fim no final dos anos 70, consequentemente boa parte da população é susceptível a infecções por *Orthopoxvirus* (TRINDADE *et al.*, 2003; ABRAHÃO *et al.*, 2010; DA FONSECA *et al.*, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2017).

Os VACV-Br são divididos em dois grupos de acordo com seu perfil de virulência, grupo 1 (menos virulento em modelos de infecção murina), grupo 2 (mais virulento em modelos de infecção murina). As amostras virais PSTV e GP1V fazem parte do grupo 1 e 2 respectivamente (DRUMOND *et al.*, 2008). A capacidade de subversão do sistema imune pelos poxvírus está centrada na sua habilidade de obstruir, escapar ou ainda subverter elementos essenciais da resposta antiviral, produzindo um enorme repertório de proteínas, extraordinariamente diversas, relacionadas com a evasão da resposta imune. Refletindo nas diferenças fenotípicas observadas durante manifestações clínicas (SMITH & KOTWAL, 2002; JOHNSTON & MCFADDEN, 2003; SEET *et al.*, 2003; DE FREITAS *et al.*, 2018).

A via de resposta a proteínas mal dobradas (UPR) também está relacionada com importantes funções do sistema imune (KAMIMURA *et al.*, 2008; ROACH *et al.*, 2007; RICHARDSON *et al.*, 2010). Sendo assim a capacidade de modulação da via UPR, por diversas amostras virais, também está intimamente relacionada com a capacidade de subversão do sistema imune. Recentemente foi observado que os VACV MVA e WR, apresentam capacidade de modulação da via UPR, através ativação ou silenciamento de sensores da via (LEÃO *et al.*; 2020 – manuscrito em preparação). Os VACV GP1V e PSTV não só apresentam diferenças em relação a virulência, como também quanto a modulação da resposta imune do seu hospedeiro (CHINALIA; 2012). Dessa maneira, analisar as amostras virais GP1V e PSTV, obtidas de surtos zoonóticos em propriedades rurais no estado de Minas Gerais (LEITE *et al.*, 2005; TRINDADE *et al.*, 2006), representa uma oportunidade para elucidar a resposta desses vírus frente à infecção por amostras com diferentes padrões de virulência. Contribuindo para avaliar a capacidade dessas amostras de modular vias de resposta a proteínas mal dobradas e verificar se essa modulação apresenta impacto nos mecanismos patogênicos envolvidos na

reposta aguda contra esses vírus. Adicionalmente, estas análises também poderão fortalecer a classificação dos diferentes isolados brasileiros nos grupos 1 e 2, levando em consideração não apenas critérios filogenéticos, mas também biológicos e clínicos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo geral avaliar o efeito da infecção pelos vírus GP1V e PSTV sobre a via de resposta a proteínas mal dobradas da célula hospedeira assim como o efeito dos componentes destas vias sobre a replicação dos vírus.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar e comparar a ativação de IRE1 α /XBP1 durante a infecção por GP1V e PSTV em comparação ao WR;

- Avaliar e comparar a ativação de IRE1 α /XBP1 induzida por tunicamicina em células infectadas por GP1V ou PSTV em comparação ao WR;

- Avaliar a influência de PERK e/ou ATF6 α sobre a ativação de IRE1-XBP1 em células infectadas com GP1V ou PSTV em comparação ao WR;

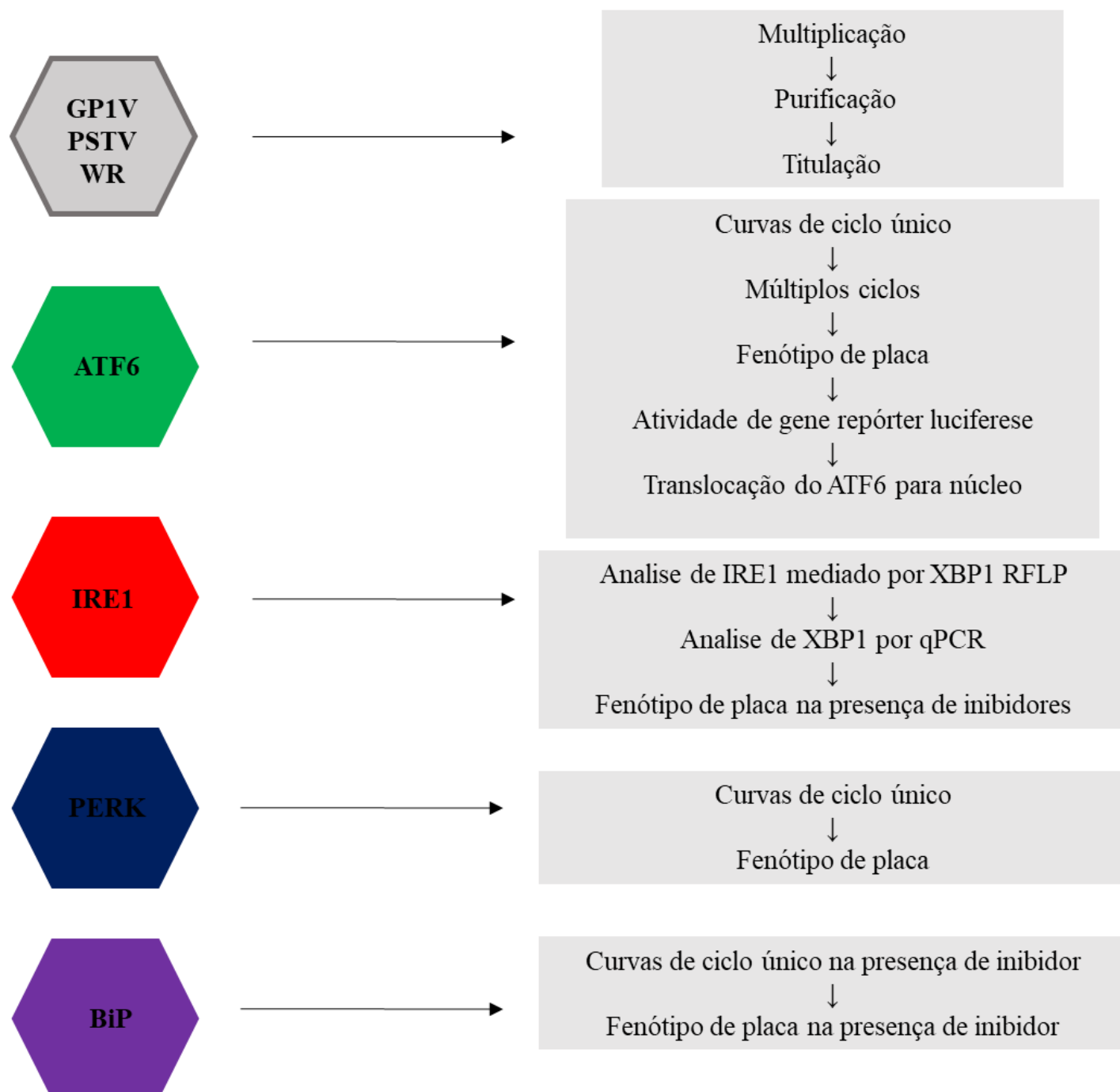
- Determinar o perfil de expressão de genes responsivos ao estresse do RE em células infectadas com GP1V ou PSTV em comparação ao WR;

- Avaliar e comparar a ativação de ATF6 durante a infecção por GP1V ou PSTV em comparação ao WR;

- Investigar os reflexos da ativação de ATF6 sobre a multiplicação de GP1V ou PSTV em comparação ao WR.

4 METODOLOGIA

4.2 ESTRATÉGIA DE TRABALHO



4.2 CÉLULAS

Tabela 3 – Descrição e origem das linhagens celulares

<i>Linhagem celular</i>	<i>Descrição</i>	<i>Condições de cultivo</i>	<i>Fonte/Referência</i>
BSC40	Linhagem tolerante a altas temperaturas derivadas de células epiteliais de rim de macaco (BS-C-1)	Meio Eagle modificado por Dulbecco (D-MEM), suplementado com antibióticos e 10% de soro fetal bovino, em garrafas de cultivo celular a 37° C, em estufa com 5% de CO ₂	Dr. Bernard Moss NIAID, NIH, Bethesda, EUA
BALB/3T3 clone A31	Fibroblastos de embrião de camundongo BALB/c espontaneamente imortalizados	Meio D-MEM, suplementado com antibióticos e 10% soro fetal bovino em garrafas de cultivo celular a 37°C, em estufa com 5% de CO ₂	Dr. Cláudio Antônio Bonjardim, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG
ATF6-KO	Fibroblastos de embrião de camundongo C57/BL6 deficientes para ATF6, imortalizados com 13 dias de idade usando o antígeno T grande do vírus SV-40	Meio D-MEM, suplementado com antibióticos, 10% de soro fetal bovino e aminoácidos não essenciais, em garrafas de cultivo celular a 37° C, em estufa com 5% de CO ₂	Dr. Randal Kaufman, Medical Discovery Institute, SBP, La Jolla, EUA
ATF6-WT	Fibroblastos de embrião de camundongo C57/BL6 imortalizados com 13 dias de idade usando o antígeno T grande do vírus SV-40	Meio D-MEM, suplementado com antibióticos, 10% de soro fetal bovino e aminoácidos não essenciais, em garrafas de cultivo celular a 37° C, em estufa com 5% de CO ₂	Dr. Randal Kaufman, Medical Discovery Institute, SBP, La Jolla, EUA
PERK-KO-DR	Fibroblastos de embrião de camundongo C57/BL6 deficientes para PERK, imortalizados com 13 dias de idade usando o antígeno T grande do vírus SV-40	Meio D-MEM, suplementado com antibióticos, 10% de soro fetal bovino e 2-mercaptoetanol, em garrafas de cultivo celular a 37° C, em estufa com 5% de CO ₂	Dr. David Ron CIMR, University of Cambridge, Cambridge, GBR
MEF-WT (DR-Wildtype)	Fibroblastos de embrião de camundongo C57/BL6 imortalizados com 13 dias de idade usando o antígeno T grande do vírus SV-40	Meio D-MEM, suplementado com antibióticos e 10% soro fetal bovino em garrafas de cultivo celular a 37°C, em estufa com 5% de CO ₂	Dr. David Ron CIMR, University of Cambridge, Cambridge, GBR

4.3 PLASMÍDEOS

Tabela 4 – Descrição e origem dos Plasmídeos

<i>Plasmídeos</i>	<i>Descrição</i>	<i>Fonte/Referência</i>
<i>pCMVshort-ATF6-GFP</i>	~5.3kb, <i>high copy</i> , vetor de expressão em eucariotos para ATF6 alfa com etiqueta GFP na porção N-terminal sobre o controle do promotor CMV	Dr. Kazutoshi mori Kyoto University, Kyoto, JPN
<i>p5x-ATF6-GL3</i>	pOFlucGL3 contendo 5 copias repetidas de sítios de ligação do ATF6	Addgene, Cambridge, MA, EUA
<i>pEGFP-ATF6</i>	~5.7kb, <i>high copy</i> , vetor de expressão em eucariotos para ATF6 alfa com etiqueta GFP na porção N-terminal	Addgene, Cambridge, MA, EUA
<i>pRL-TK</i>	Expressa a luciferase de Renilla sob o controle do promotor da timidina cinase do <u>HSV-1</u> .	Obtido comercialmente (PROMEGA)

4.4 PRODUÇÃO DOS ESTOQUES DE TRABALHO DAS AMOSTRAS VIRAIS

4.4.1 Origem das amostras

O isolado de VACV PSTV, foi obtido em 2003 na cidade de Passa Tempo, Minas Gerais, durante um surto de infecção zoonótica, por Leite e colaboradores (2005). O isolado GP1V, foi obtido de Trindade e colaboradores (2006) em 2001 na cidade de Guarani, Minas Gerais, Brasil. A partir de então, as amostras são rotineiramente cultivadas, purificadas e tituladas no Laboratório de Vírus da Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil e foram gentilmente cedidas pela Prof^a Dra. Erna Geessien Kroon. O VACV-WR foi gentilmente cedido pelo Dr. Bernard Moss (NIAID/NIH, Bethesda, EUA), sendo aplicado como amostra padrão nos experimentos. Todos estes vírus são produzidos e titulados rotineiramente também no Laboratório de Virologia Básica e Aplicada, Departamento de Microbiologia do ICB/UFMG.

4.4.2 Multiplicação viral

Para a multiplicação viral usamos a metodologia descrita por Campos e Kroon (1993). Os estoques dos vírus GP1V, PSTV e VACV-WR foram obtidos através da multiplicação em células epiteliais de rins de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*) (BSC-40), em Meio Eagle modificado por Dulbecco (D-MEM) (Sigma®) suplementado com antibióticos (Estreptomicina a 10mg/ml e Penicilina a 100 U/mL), antifúngico Anfotericina B a 25 µg/ml e 10% de soro fetal bovino (SFB- Cultilab, Campinas, Brasil) em garrafas de cultivo celular de 500 mL (TPP – Trasadingen, Suíça), a 37° C, em estufa com 5% de CO₂ (Thermo Scientific Forma® Series II 3111 Water-Jacket CO₂ Incubator) até atingirem confluência total. As monocamadas de células confluentes foram infectadas com multiplicidade de infecção (M.O.I) de 0,01 PFU (unidades formadoras de placa). Após 1 hora de adsorção viral, foram acrescentados 50 mL de DMEM suplementado com 1% de SFB. Novamente as células foram mantidas a 37° C e monitoradas diariamente ao microscópio óptico até o aparecimento de 90% de efeito citopático (ECP), cerca de 48 horas após a infecção. A seguir, o meio de cultura foi descartado e as células foram lavadas com solução salina EDTA tamponada com fosfato (PBS) 1X (1.5 mM NaCl; 40 mM Na₂HPO₄; 20 mM KH₂PO₄; pH 7.2) e desprendidas da garrafa com cerca de 3 mL de tripsina 0.25%. A suspensão obtida desse processo foi centrifugada por 10 minutos a 1500 rpm (rotor H1000B - Sorvall RT6000 B) a 4° C e o sedimento foi preservado a -70° C para subsequente purificação das partículas virais.

4.4.3 Purificação viral

A purificação das partículas virais foi feita de acordo com a metodologia descrita por Joklik (1962). Em síntese, o sedimento obtido no processo de multiplicação viral, foi homogeneizado em 8 mL de Tris-HCL, pH 8,0 e centrifugado a 2.500 rpm (rotor H1000B - Sorvall RT6000 B) por 15 minutos a 4° C. O sobrenadante obtido foi conservado em gelo, nesse intervalo fizemos a lise do sedimento celular em 10 mL de solução de lise (1 mM MgCl₂, 10 mM Tris-HCl pH 7,6; 10 mM KCl). Em seguida, a suspensão obtida foi incubada em gelo durante 10 minutos e as células foram lisadas mecanicamente em homogeneizador do tipo “Douncer” (Wheaton, USA) por 80 vezes. Este processo foi realizado duas vezes. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 2.500 rpm por 15 minutos a 4° C. A suspensão resultante, contendo vírus e debris celular, foi coletada e centrifugada em um gradiente de sacarose (25 a 40%) a 12.000 rpm (rotor AH 629 - ultracentrífuga Sorvall), 4° C, por 2 horas, para a remoção dos debris

celulares. Ao término do procedimento o sobrenadante e a sacarose foram desprezados e o sedimento contendo as partículas virais foi suspenso em 1 mL de Tris- HCl 10 mM, pH 8,0. O material obtido, que foi utilizado nos demais experimentos, foi distribuído em alíquotas e armazenado a -70°C .

4.4.4 Titulação Viral

Para o processo de titulação viral foi utilizada a metodologia descrita por Campos e Kroon (1993). Resumidamente, células BSC-40 foram cultivadas em placas de seis poços (poço de $9,6\text{cm}^2$ - TPP – Trasadingen, Suíça) por 16 a 24 horas a 37°C , em meio D-MEM, até 100% de confluência.

Um poço foi utilizado para controle de viabilidade celular. Nos cinco poços restantes o meio foi descartado e foram adicionados 500 μL de várias diluições diferentes dos vírus sob a monocamada celular. Depois de 1 hora de adsorção viral, 2 mL de D-MEM (Sigma®) contendo 1% de SFB (Cultilab, Campinas, Brasil) foi adicionado aos poços e as placas foram então incubadas na estufa (Thermo Scientific, EUA) durante um período de 48 horas, a 37°C , em atmosfera de CO_2 a 5%. Após 48 horas, as culturas foram fixadas com formol a 4% e corado com solução de cristal violeta a 1% (p/v) em etanol 20%, por 15 minutos. Para o cálculo da titulação viral foi utilizado o poço da diluição contendo entre 30 a 300 placas de lise, seguindo o cálculo:

$$\text{Título} = \text{números de placas virais} \times \text{inverso da diluição} \times \text{FC volume em mL}$$

4.4.5 Fenótipo de placa

O efeito citopático dos VACVs foi observado através da formação de placas de lise. Sendo assim, o ensaio de fenótipo de placa foi utilizado para verificar, comparativamente, a morfologia das placas de lise apresentada pelos vírus GP1V, PSTV ou WR. Células BSC-40, MEF-WT ou PERK-KO foram cultivadas em placas de 6 poços (poço de $9,6\text{cm}^2$ - TPP – Trasadingen, Suíça) e incubadas na estufa (Thermo Scientific, EUA) a 37°C em atmosfera de CO_2 a 5% até atingirem 90% de confluência. Subsequentemente, as células foram inoculadas com os isolados GP1V, PSTV e WR com 50 PFUs e incubadas em meio com carboximetilcelulose CMC por 48 horas em estufa (Thermo Scientific, EUA) a 37°C em atmosfera de CO_2 a 5%. Após 48 horas de incubação, as células infectadas foram fixadas com

solução de 4% de formol e coradas com cristal violeta a 1%. Os experimentos foram feitos em triplicata.

Os ensaios de fenótipo de placa produzido nas células ATF6-WT e ATF6-KO foram feitos por imunomarcação. Células ATF6-KO e ATF6-WT foram cultivadas em placas de 12 poços (poço de 3,6cm² - TPP – Trasadingen, Suíça) e incubadas na estufa (Thermo Scientific, EUA) a 37° C em atmosfera de CO₂ a 5% até atingirem 90% de confluência. Subsequentemente, as células foram inoculadas com os isolados GP1V, PSTV ou WR com 50 PFUs e incubadas por 48 horas em estufa (Thermo Scientific, EUA) a 37° C em atmosfera de CO₂ a 5%. Após 48 horas de incubação o CMC removido de cada poço e a monocamada foi fixada com uma solução de 1:1 de metanol acetona. A solução de fixação foi removida e os poços foram lavados 3 vezes com PBS. Em seguida a monocamada foi incubada com anticorpo primário (obtido em coelhos imunizados com o vírus WR e doado gentilmente pelo Dr. Bernard Moss) diluído 1:5.000 em PBS contendo 3% de SFB por 1 hora, sob agitação a temperatura ambiente. Após incubação a monocamada foi lavada 3 vezes com PBS e incubada com Proteína A conjugada com peroxidase (Thermo Fisher Scientific – Waltham, EUA) diluída 1:5.000 em PBS contendo 3% de SFB por 1 hora, sob agitação a temperatura ambiente. Após a incubação, a monocamada foi lavada com água corrente e revelada com o substrato o- dianisidina (Sigma-Aldrich Biotechnology – St. Louis, EUA) diluído em PBS com 0,03% de H₂O₂. Os experimentos foram feitos em triplicata.

4.5 EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL E SÍNTESE DE cDNA

O RNA total foi extraído das células utilizando TRI Reagent (Sigma) de acordo com as instruções do fabricante e antes da transcrição reversa, tratamos as amostras com TURBO DNA-free™ (Invitrogen) para retirar a contaminação de DNA genômico residual. O RNA extraído foi ressuspensionado em água previamente tratada com *diethylpyrocarbonate* (DEPC), e a concentração e pureza do RNA estimada por espectrofotometria (espectrofotômetro NanoVue, GE Healthcare Life Sciences). Alíquotas das amostras de RNA foram analisadas por eletroforese em gel desnaturante de 1% de agarose contendo brometo de etídio como corante para verificar a integridade das amostras. O cDNA foi sintetizado a partir do RNA, utilizando a enzima transcriptase reversa MMLV e oligo-dT (Promega) de acordo com o protocolo do fabricante. O produto de transcrição reversa foi armazenado a -20 ° C.

4.5.1 Análise do processamento de XBP1



Utilizamos o método de polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição, para identificar o efeito da infecção sobre o processamento do mRNA do fator de transcrição XBP1, principal substrato do sensor IRE1.

Paras as reações de amplificação por PCR, o cDNA foi utilizado em reações com a enzima DNA polimerase GoTaq® Flexi (Promega) de acordo com as instruções do fabricante e os iniciadores senso e anti-senso, que amplificam um produto de DNA de 600 pb abrangendo os sítios de clivagem (*splicing*) por IRE1 (CALFON et al., 2002). Um terço do volume da reação de RT-PCR foi submetido à digestão enzimática com PstI (Promega) a 37°C por 3 horas. Os produtos foram analisados em gel de agarose a 1,4% contendo brometo de etídio (Life Technologies). Os géis foram fotografados usando o sistema de imagens UVP MultiDoc-It e as bandas quantificadas utilizando o programa ImageJ (NIH). O percentual da forma processada foi calculado subtraindo a quantidade de XBP1 do total (soma das isoformas).

4.6 PCR QUANTITATIVA (qPCR)

Reações de qPCR foram usadas para se avaliar os níveis de mRNA de *ATF4* (fator de transcrição induzido por CHOP), *ATF6*, *GADD34* (inibidor de PERK, atua no restabelecimento da síntese de proteínas), *p58IPK* (regulada pelo fator de transcrição ATF6), *ERO1* (atua na dobramento de proteínas induzido por CHOP), *Pdia4* (auxilia no dobramento de proteínas), *Bip* (chaperona responsável pela ativação dos eixos da via UPR), *Chop* (fator de transcrição induzido por ATF6 e PERK) e *Xbp1* (processado e total, induzido por IRE1). Para tanto usamos o sistema SYBR® Green PCR Master Mix (AppliedBiosystems, Foster City, CA) contendo nucleotídeos, tampão, UDG, AmpliTaq®, referência passiva (ROX) e água em reações com 10 µL de volume final. Todos os iniciadores utilizados neste estudo estão listados na Tabela 3. As análises de expressão relativa de genes foram realizadas utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ e normalizadas pela expressão de mRNA da proteína RPL32 e Beta-actina. Os experimentos

foram feitos em duplicata biológica e os resultados da amplificação foram processados pelo StepOne Software v2.3 do equipamento (7500 Real Time PCR System Applied Biosystems®) e posteriormente, analisados conforme o método do $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001).

Tabela 5 – Lista de iniciadores

<i>Iniciadores</i>	<i>Sequência</i>	<i>Aplicação</i>
<i>BIP/GRP78 – F</i>	TGGTATTCTCCGAGTGACAGC	qPCR
<i>BIP/GRP78 – R</i>	AGTCTTCAATGTCCGCATCC	
<i>Pdia4 - F</i>	TCCCATTTGCTGTAGCGAAGAT	qPCR
<i>Pdia4 - R</i>	GGGGTAGCCACTCACATCAAAT	
<i>p58^{ipk} - F</i>	GGCGCTGAGTGTGGAGTAAAT	qPCR
<i>p58^{ipk} - R</i>	GCGTGAAACTGTGATAAGGCG	
<i>Xbp1 total – F</i>	AAGAACACGCTTGGGAATGG	qPCR
<i>Xbp1 total – R</i>	ACTCCCCTTGGCCTCCAC	
<i>XBP1 spliced - F</i>	GAGTCCGCAGCAGGTG	qPCR
<i>XBP1 spliced - R</i>	GTGTCAGAGTCCATGGGA	
<i>ATF4 – F</i>	ATGGCCGGCTATGGATGAT	qPCR
<i>ATF4 – R</i>	CGAAGTCAAACCTTTTCAGATCCATT	
<i>ATF6 – F</i>	ACTGACTGACTGACTGACTGACTG	qPCR
<i>ATF6 - R</i>	ACTGACTGACTGACTGACTGACTG	
<i>GADD34 – F</i>	ACCATGACTCAGTGCTGTGAC	qPCR
<i>GADD34 – R</i>	CGCAGCTTCTATCTGATCTGC	
<i>ERO1 – F</i>	ACCCTGAGCTTCTCTCAAGT	qPCR
<i>ERO1 - R</i>	AAAGGACATGGTCGTTTCAGATT	
<i>CHOP – F</i>	TGCAGTCATGGCAGCTGAGTC	qPCR
<i>CHOP - R</i>	TAGAACTCTGACTGGAATCTG	
<i>RPL32 – F</i>	GCTGCCATCTGTTTTACGG	qPCR
<i>RPL32 – R</i>	TGACTGGTGCCTGATGAACT	
<i>BETA-ACTINA- F</i>	GGCTGTATTCCCCTCCATCG	qPCR
<i>BETA-ACTINA-R</i>	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT	

4.7 TRANSFORMAÇÃO DE BACTÉRIAS COMPETENTES

Os plasmídeos pEGFP-ATF6 e p5x-ATF6-GL3 foram adquiridos da addgene. O plasmídeo pCMV-Short-ATF6 α nos foi cedido gentilmente pelo Doutor Kazutoshi Mori.

Esses plasmídeos foram utilizados para a transformação de bactérias *Escherichia coli* XL10-Gold® ultracompetent cells (Stratagene) quimicamente competentes, que foram preparadas de acordo com o protocolo descrito por Sambrook e colaboradores (1989). Assim,

1-2 μL do plasmídeo eluído em tampão TE foi misturado a 100 μL de bactérias XL10-Gold quimiocompetentes e imediatamente incubados em banho de gelo por 30 minutos. Após esse tempo, as bactérias foram submetidas a um choque térmico a 42°C por 3 minutos e novamente incubados em banho de gelo por 1 minuto em seguida, foram adicionados 500 μL de meio LB sem antibiótico (Bacto triptona a 1% p/v; extrato de levedura a 0,5% p/v; 171 mM NaCl) e as bactérias foram incubadas a 37°C, sob agitação de 250 rpm (New Brunswick Scientific Classic Series C24 incubator/shaker), por 1 hora (HANAHAN et al., 1991). A cultura bacteriana resultante foi centrifugada a 14.000 rpm (microcentrifuga Eppendorf 5415C) por 1 minuto e o sedimento foi homogeneizado em 100 μL de LB. A suspensão bacteriana foi inoculada em placas de Petri contendo LB-ágar suplementado com ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para o p5xATF6-GL3) ou canamicina (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para os pEGFP-ATF6 e pCMV-Short-ATF6), as placas foram incubadas a 37°C e o crescimento bacteriano foi observado após 16-24 horas (SAMBROOK et al., 1989).

4.8 OBTENÇÃO DE PLASMÍDEO EM PEQUENA ESCALA

As culturas identificadas como positivas foram utilizadas na obtenção de DNA plasmidial em pequena escala, empregando-se o Kit Wizard Plus SV Miniprep (Promega-USA), conforme instruções do fabricante. O DNA obtido foi quantificado por espectrofotometria (espectrofotômetro ND-1000, NanoDrop, EUA) e a sua integridade verificada por eletroforese em gel de agarose 1%. O DNA plasmidial foi estocado a -20°C.

4.9 ENSAIO DE ATIVIDADE DO GENE REPÓRTER LUCIFERASE

A avaliação da ativação a via de estresse ATF6 do RE também foi avaliada utilizando o plasmídeo p5x-ATF6-GL3 obtido da Addgene (plasmid # 11976) em ensaios de gene repórter. Esse plasmídeo contém 5 cópias repetidas de sítios de ligação ao fator ATF6 clonado no plasmídeo pOFlucGL3 (WANG, Y et al., 2000) depositado pelo Dr. Ron Prywes, Columbia University, EUA. MEFs foram co-transfectados com os plasmídeos p5xATF6-GL3 e pRL-TK (que expressa a luciferase de Renilla sob o controle do promotor da timidina cinase do HHV-1). Os complexos de DNA (400 ng de p5xATF6-GL3 e 100 ng de pRL-TK e Lipofectamine 2000 (Invitrogen) – 1.25 μL /transfecção) foram feitos em meio OPTIMEM (Invitrogen) e incubados à temperatura ambiente por 20 minutos. Posteriormente, os complexos foram

adicionados às células por 24 horas. Ao término deste período, as células foram infectadas com diferentes MOI dos vírus GP1V, PSTV e WR, por diferentes intervalos de tempo. Os extratos celulares obtidos ao final foram utilizados para a análise da atividade luciferase.

O ensaio de luciferase foi realizado com o kit “Dual-Luciferase® Reporter (DLR) Assay System” (Promega). Para a leitura da atividade da luciferase, 20 µL de cada amostra de extrato celular obtido foi adicionado a cada poço de uma placa FluoroNunc™ de noventa e seis poços, seguido da adição de 40 µL do substrato luciferina de *Photinus pyralis* (reagente LAR II do kit DLR) e leitura por 3 segundos para cada amostra. Para a normalização dos resultados, foi feita em seguida a leitura da luciferase da *Renilla reniformis* onde foram adicionados 40 µl do reagente Stop & Glo (Promega) a cada poço contendo as amostras em análise. A leitura das amostras foi realizada no luminômetro (Lumicount Packard BioSciences) pelo programa Reader (Packard BioSciences).

4.10 QUANTIFICAÇÃO DA TRANSLOCAÇÃO DO ATF6 - ISOLAMENTO DE NÚCLEO E ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO

Neste ensaio utilizamos o plasmídeo pCMVshort-ATF6-GFP, que possui uma cópia do gene codificador da proteína ATF6 fusionada à proteína verde fluorescente (GFP) sob controle de um promotor do vírus CMV. Para quantificar a translocação do repórter ATF6-GFP, células A31 foram transfectadas com pCMVshort-ATF6-GFP e infectadas com os vírus GP1V, PSTV e WR por 24 horas. Para o isolamento dos núcleos dessas células, foi usado tampão de isolamento nuclear gelado (320mM sucrose, 5mM MgCl₂, 10mM HEPES and Triton X-100 pH 7,4) posteriormente a suspensão foi centrifugada 1000g por 5 minutos (microcentrifuga Eppendorf 5415C). A integridade dos núcleos foi verificada após verificar com azul de tripan em câmara de Neubauer os núcleos positivos para GFP foram contados por citometria de fluxo (BD FACSCalibur™).

4.11 CINÉTICA DE PRODUÇÃO DE VÍRUS INTRACELULAR MADURO

4.11.1 Titulação dos IMVs

Para determinação do rendimento viral, monocamadas de células ATF6-KO, ATF6-WT, PERK-KO e MEF-WT foram infectadas com MOI 10 dos vírus GP1V, PSTV e WR por diferentes intervalos. Após a infecção, as células foram removidas mecanicamente e submetidas

à sonicação em banho de gelo em 3 ciclos de 30 segundos, com intervalos de 30 segundos entre cada ciclo. Foram feitas diluições seriadas dessa suspensão em meio DMEM, sendo utilizados 1mL de cada diluição para infectar as respectivas monocamadas de BSC40 em placas de 6 poços. Um poço da placa foi reservado para controle de célula, sendo acrescentados 1 mL de DMEM. A adsorção foi feita a 37°C, em uma atmosfera de 5% de CO₂ e com homogeneização constante durante 1 hora. Posteriormente as monocamadas de células foram lavadas com PBS 1X e acrescentados 2 mL de DMEM contendo SFB a 2,5% em cada poço. As placas foram incubadas a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO₂ por 48 horas. Dois dias após a infecção, as células foram fixadas com solução de 4% de paraformaldeído e coradas com cristal violeta. Os experimentos foram feitos em duplicata.

4.11.2 Curvas de multiplicação e fenótipo de placa na presença dos inibidores de componentes das vias UPR

Para as curvas de multiplicação na presença dos inibidores de componentes das vias UPR, utilizamos o inibidor 4μ8C na concentração de 25μm (inibidor do domínio Rnase de IRE1), Kira6 na concentração de 5μm (inibidor do domínio cinase de IRE1) e HA15 na concentração de 10 μm (inibidor da chaperona BiP/GRP78) para avaliar o rendimento viral e fenótipo de placa dos vírus GP1V, PSTV e WR. Os inibidores foram diluídos e aplicados na monocamada durante todo o experimento: 30 minutos antes da adsorção dos vírus, durante a adsorção e posteriormente a adsorção até a fixação em solução com cristal violeta a 1%. Utilizamos DMSO como controle não tratado, por ser o diluente utilizado nos inibidores. Os fenótipos de placa foram analisados em triplicata.

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE DO EIXO ATF6 DURANTE A INFECÇÃO PELOS GP1V, PSTV E WR

5.1.1 - Cinética de produção de vírus em células ATF6-KO e ATF6-WT

Como parte das estratégias para se verificar a inter-relação entre as vias UPR e a replicação dos VACVs analisados neste trabalho, comparamos a cinética de produção dos vírus GP1V, PSTV e WR em células ATF6- WT em comparação com as células ATF6-KO como forma de avaliar a influência do fator de transcrição na eficiência replicativa dos diferentes vírus. Foram feitos fenótipos de placa, curvas de ciclo único e múltiplos ciclos. Para o fenótipo de placa (FIGURA 14), as células foram infectadas com 50 PFU dos vírus GP1V, PSTV e WR, por 48 horas. Foi observado que, nas células ATF6-KO em comparação à ATF6-WT, uma diminuição do tamanho das placas de lise do vírus WR, e uma diminuição menos acentuada nas placas dos vírus GP1V e PSTV. As curvas de ciclo único (FIGURA 15A) e múltiplos ciclos (FIGURA 15B) foram feitas em células ATF6-KO e ATF6-WT em diferentes intervalos de tempo com diferentes M.O.Is e o título viral foi determinado por ensaios de placa em células BSC-40. As curvas de ciclo único mostraram leve aumento nos títulos dos diferentes vírus nas células ATF6-WT em comparação as células ATF6-KO. É possível observar a partir do tempo de 6 horas, nas curvas de ciclo único, aumento nos títulos dos vírus GP1V e WR em comparação ao PSTV nas duas células avaliadas. Nas curvas de múltiplos ciclos, observa-se aumento nos títulos dos vírus GP1V e WR, nas células ATF6-WT em comparação as células ATF6-KO. Diferentemente, nas células ATF6-KO é observado aumento no título do vírus PSTV, nos tempos de 72 e 96 horas e uma queda no título do vírus WR no intervalo de 96h.

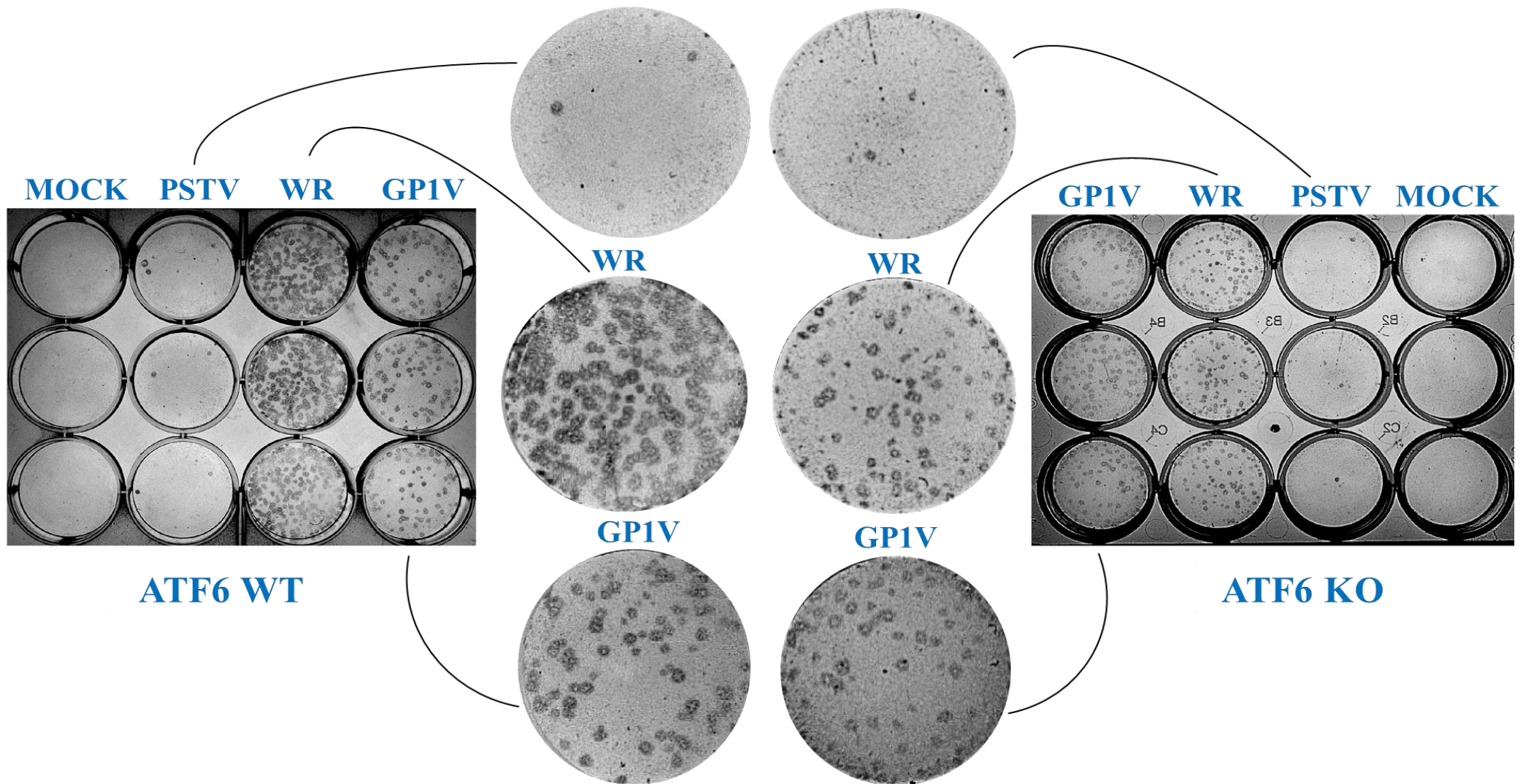


FIGURA 14 - Ensaio de fenótipo de placa e curvas de multiplicação dos vírus GP1V, PSTV e WR em células MEFs ATF6-WT e ATF6-KO. Os ensaios de fenótipo de placa dos vírus GP1V, PSTV e WR, foram feitos em células ATF6-WT e ATF6-KO. As monocamadas foram infectadas com 50 PFU desses vírus e incubadas por 48 horas. Após esse tempo as células foram fixadas em solução 1:1 de metanol acetona seguido de imunomarcção.

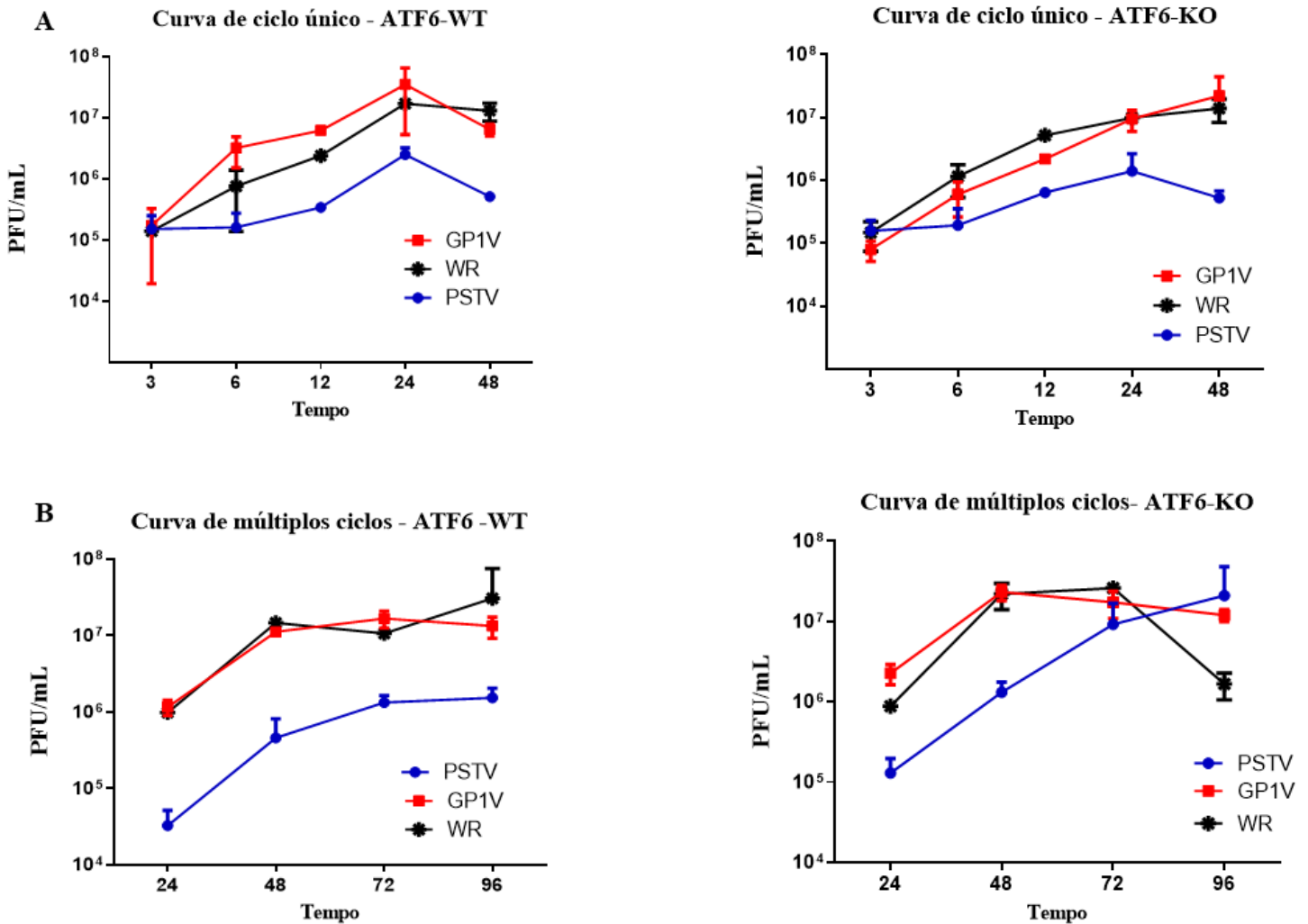


FIGURA 15 – Curva de multiplicação dos vírus GP1V, PSTV e WR em células MEFs ATF6-WT e ATF6-KO. As curvas de multiplicação foram obtidas após infecção pelos vírus GP1V, PSTV e WR em células ATF6-WT e ATF6-KO. As monocamadas foram infectadas com MOI de 10 e coletadas nos tempos de 3, 6, 12, 24 e 48 horas para a obtenção das curvas de ciclo único (A). Para as curvas de múltiplos ciclos (B) as monocamadas foram infectadas em MOI de 0,01 e coletadas nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas. Os títulos virais foram obtidos em células BSC40, a monocamada foi infectada e incubada por 48 horas e após esse tempo as células foram fixadas com solução de 4% de formol e coradas com cristal violeta a 1%.

5.1.2 - Ativação de ATF6-GFP em fibroblasto embrião de camundongo balb/3t3 clone A31 infectadas com os vírus GP1V, PSTV e WR.

Avaliamos a ativação de ATF6 após a infecção pelos vírus GP1V, PSTV e WR em fibroblastos de embrião de camundongo BALB/3T3 clone A31. A translocação de ATF6 foi avaliada utilizando células A31 transfectadas com plasmídeo contendo ATF6 fusionado a proteína verde fluorescente (pShortCMV-ATF6-GFP). Em resposta ao estresse do RE o sensor ATF6 precisa ser translocado para o núcleo para poder exercer sua atividade transcricional. Após a transfecção a monocamada foi infectada com os vírus GP1V, PSTV e WR em uma

M.O.I de 5 e incubadas por 24 horas (FIGURA16). Foi utilizado controle de células transfectadas sem a infecção pelos vírus. Foi possível observar a translocação do ATF6 para núcleo nas células infectadas com os vírus GP1V, PSTV e WR. Diferente do controle de célula não infectado, onde não é possível observar a fluorescência no núcleo celular.

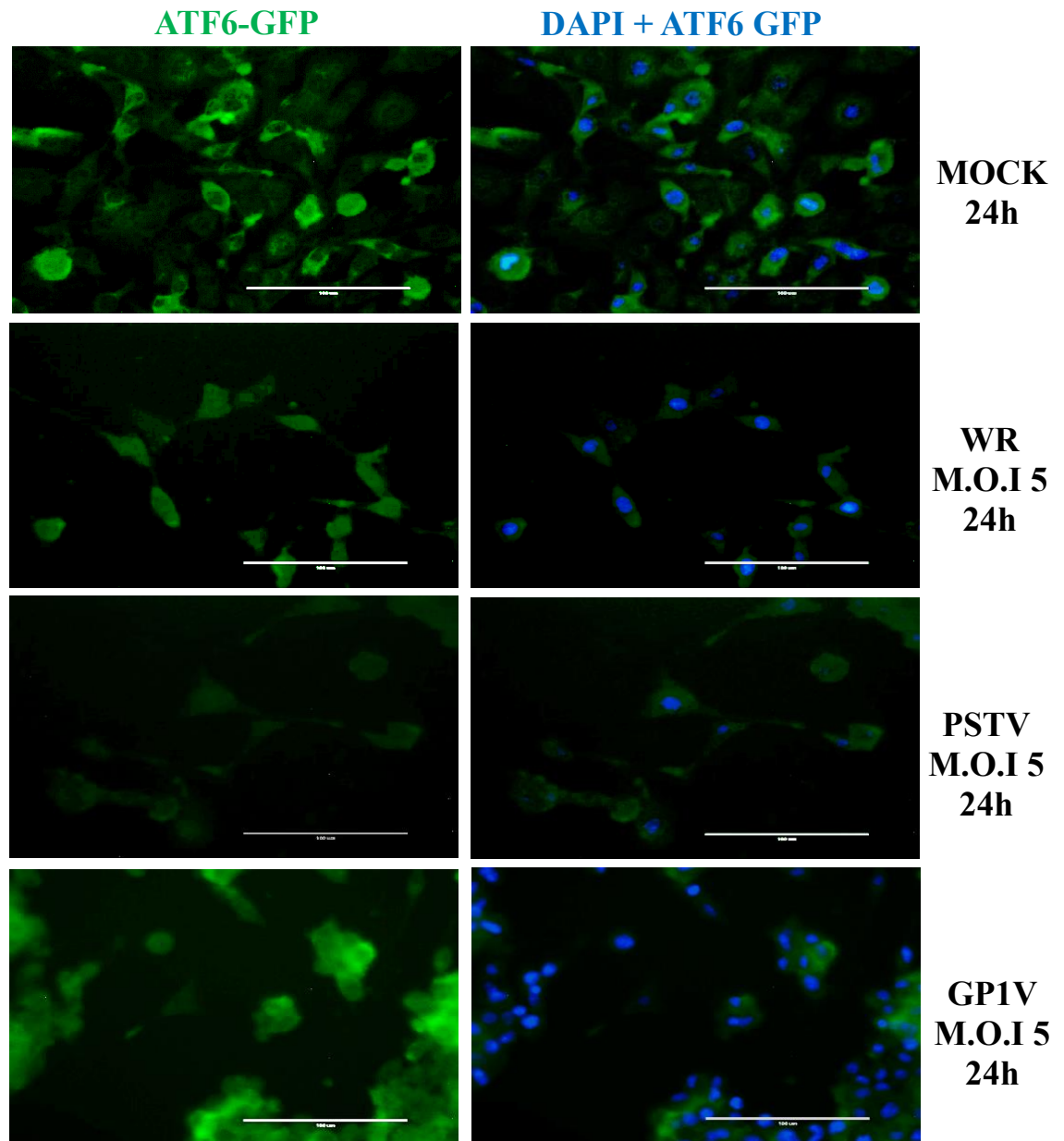


FIGURA 16 - Ativação de ATF6-GFP em células A31 infectadas com os vírus GP1V, PSTV e WR. Células MEF A31 transfectadas com plasmídeo pShortCMV-ATF6-GFP e posteriormente infectadas com os vírus WR, PSTV e GP1V em MOI de 5 e controle de células (MOCK). Após 24 horas as células foram fixadas com 4% de paraformaldeído. As células do mock apresentam um padrão de distribuição citoplasmática/RE, enquanto nas células infectadas com GP1V, PSTV e WR o ATF6-GFP é translocado para o núcleo (corado com Hoechst 33258). As imagens foram obtidas por microscopia de fluorescência (EVOS FL image system).

5.1.3- Atividade transcricional e quantificação da translocação nuclear de ATF6- GFP em células A31 infectadas com os vírus GP1V, PSTV e WR.

Posto que, a visualização da translocação de ATF6-GFP por microscopia de epifluorescência traz certa subjetividade ao resultado, avaliamos a atividade transcricional de ATF6-GFP em células A31 infectadas por esse vírus. As células foram transfectadas com o plasmídeo p5xATF6-GL3, que apresenta cinco sítios para o fator de transcrição ATF6 controlando o gene da luciferase. As células também foram co-transfectadas com o plasmídeo pRL-TK utilizado como normalizador para determinar a atividade da luciferase. Após a transfecção a monocamada foi infectada com os diferentes VACV-Br com MOI de 10 e incubadas por 24 horas. Foram utilizados controles de célula (MOCK) e de indução de estresse do RE, tunicamicina (inibidor de glicosilação, ativador da via UPR) (FIGURA 17A). Observamos aumento da atividade transcricional de ATF6 nas células infectadas com os vírus GP1V, PSTV e WR quando comparadas ao controle positivo. A translocação do ATF6 para núcleo das células infectadas ou não também foi avaliada por citometria de fluxo (FIGURA 17B). Células A31 foram transfectadas com plasmídeo pCMVshort-ATF6-GFP e infectadas com os vírus GP1V, PSTV e WR com MOI de 10 e incubadas por 24 horas, depois desse período tiveram seus núcleos isolados para quantificação. Foi possível observar aumento na porcentagem de núcleos positivos para ATF6-GFP nas células infectadas com os GP1V, PSTV e WR quando comparadas ao controle positivo.

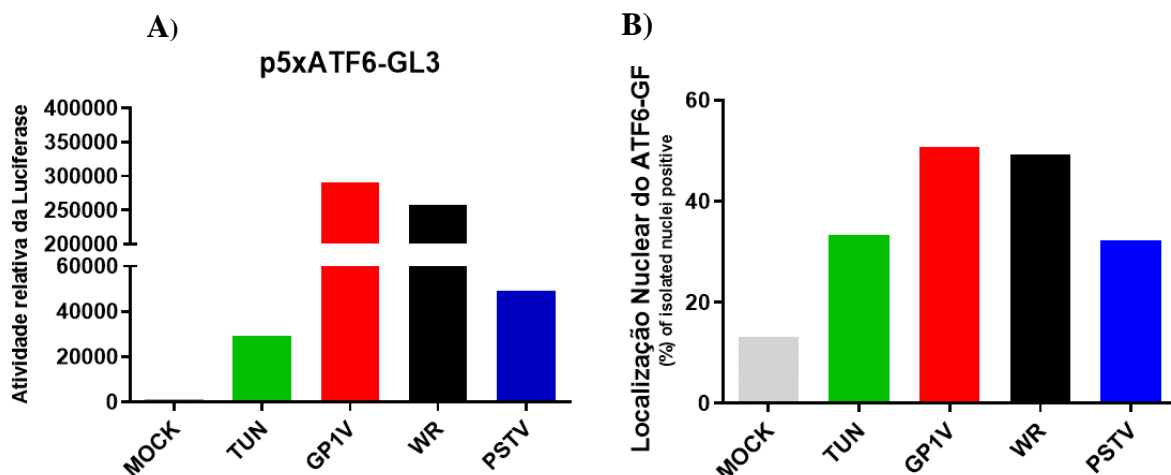


Figura 17 - Atividade transcricional e quantificação da translocação nuclear de ATF6-GFP em células A31 infectadas com os vírus GP1V, PSTV e WR. (A) Análise da atividade transcricional após infecção pelos vírus GP1V, PSTV e WR. Células A31 foram transfectadas e infectadas com MOI de 10 dos vírus GP1V, PSTV e WR por 24 horas. O extrato celular foi obtido com o Passive Lysis Buffer do kit Dual Luciferase (Promega) e as leituras de atividade de luciferase foram realizadas conforme instruções do fabricante. A atividade relativa da

luciferase foi calculada pela razão entre as leituras de luciferase do vagalume (p5xATF6-GL3) e a luciferase da Renilla (pLR-TK). (B) A quantificação dos núcleos positivos ou não para ATF6 foi feita em células A31 transfectadas com plasmídeo pCMVshort-ATF6-GFP, infectadas pelos vírus GP1V, PSTV e WR por 24 horas. Os núcleos positivos para ATF6-GFP foram contados por citometria de fluxo (BD FACSCalibur™).

5.2 ANÁLISE DO EIXO IRE1 DURANTE A INFECÇÃO PELOS GP1V, PSTV E WR

5.2.1 Análise semi-quantitativa do processamento do mRNA de XBP1 mediado por IRE1

A ativação do eixo IRE1 pode levar ao processamento do fator de transcrição XBP1 através da ativação do seu domínio RNase. Avaliamos se após a infecção pelos vírus GP1V, PSTV e WR, ocorria o processamento do fator de transcrição XBP-1. Para isso células A31 foram infectadas com MOI de 1 e incubadas por 24 horas para ensaios de PCR-RFLP e densitometria (FIGURA18). Utilizamos como controle positivo células tratadas com tunicamicina que induz aumento significativo no processamento do mRNA de XBP1. Transcritos de mRNA de XBP1 foram amplificados por RT-PCR, digeridos com *PstI* e fracionados em gel de agarose 1,4% corado com brometo de etídio. O mRNA de XBP1 possui um sítio para enzima *PstI*. Quando não há estresse, e esse material é amplificado por PCR, e posteriormente digerido com *PstI*, é observado no gel duas bandas correspondentes a forma não processada e processada de XBP1. Quando há estresse, ocorre um processamento (spliced) no local exato do sítio de *PstI* e na canelata digerida é observado no gel apenas uma banda correspondente a forma processada de XBP1. Após 24 horas foi observado que a infecção pelo vírus GP1V, PSTV e WR não leva ao processamento de XBP1, diferente das células tratadas com tunicamicina. Demonstrando uma modulação negativa no processamento de XBP1 nas células infectas com amostras zoonóticas isoladas no Brasil de VACV.

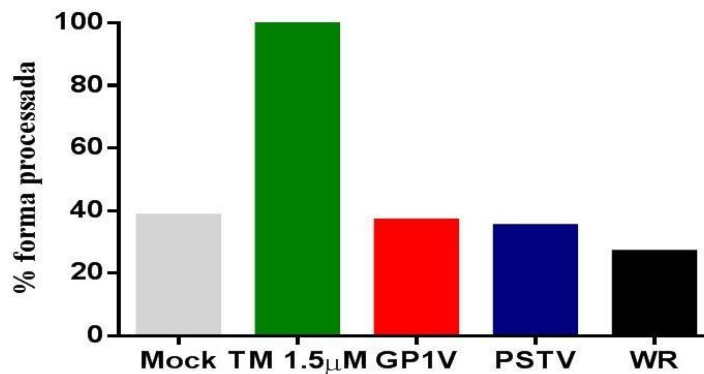
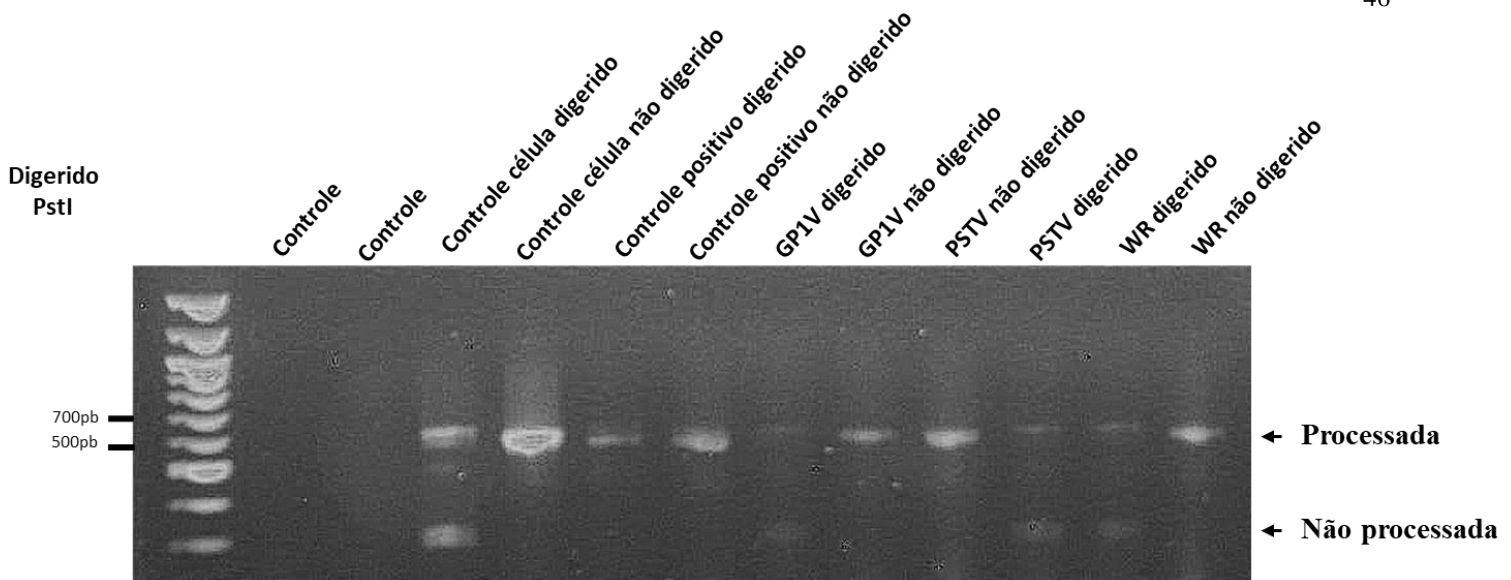
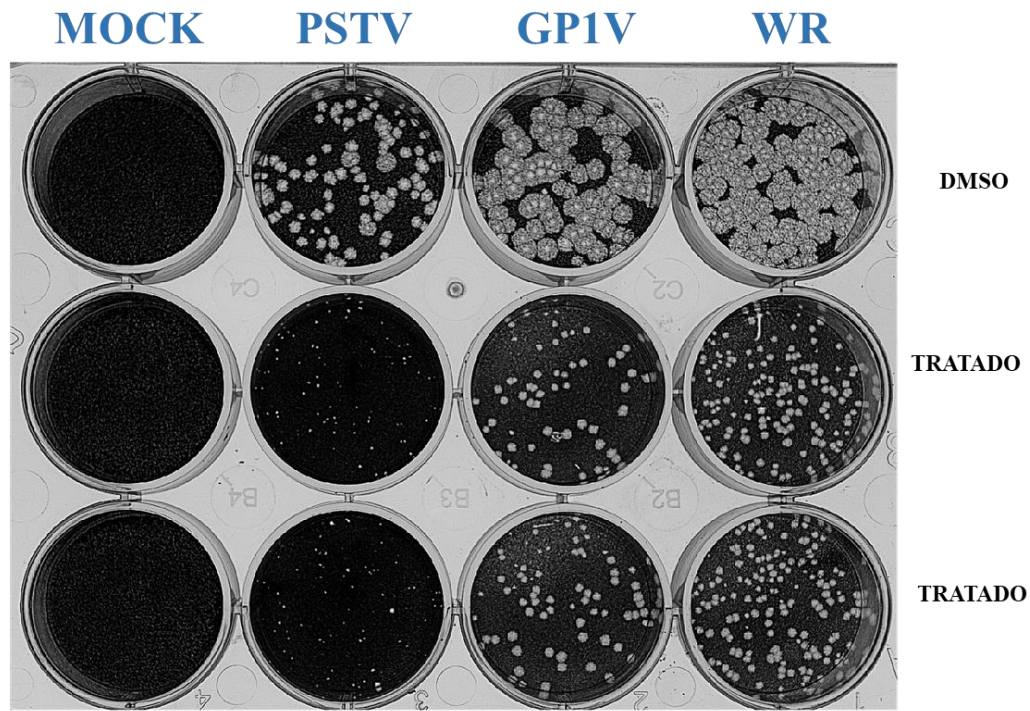


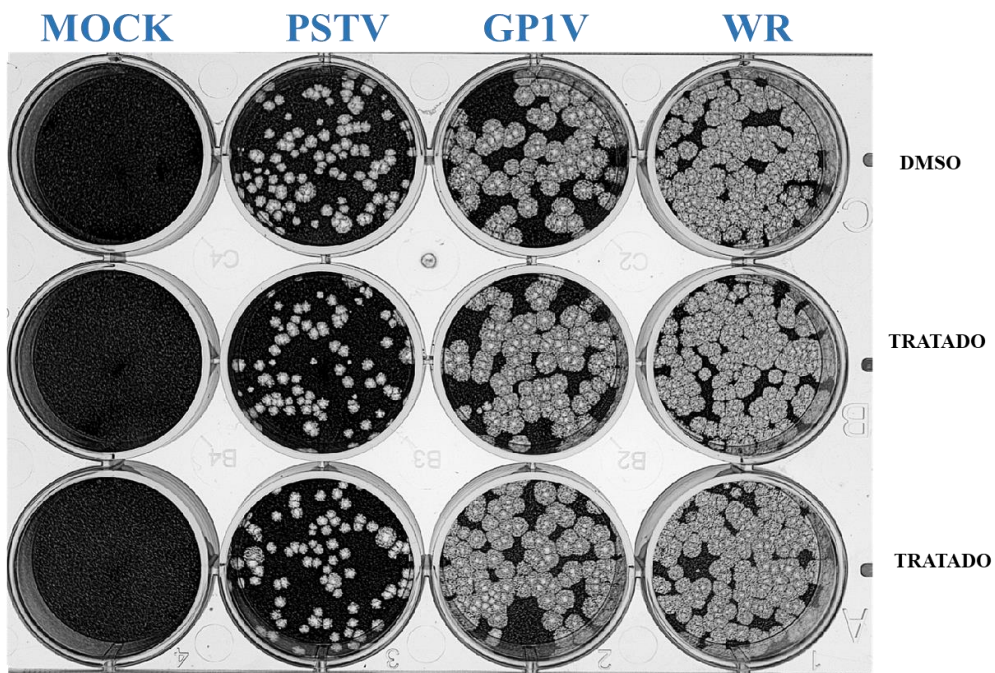
Figura 18- Análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição do DNA (PCR-RFLP) de células infectadas com os VACV. Células tratadas com tunicamicina 1µM (TM) ou infectadas com os vírus GP1V, PSTV e WR. Como controle, MEFs submetidas a uma simulação de infecção (Mock). Transcritos de mRNA de XBP1 foram amplificados por RT-PCR, digeridos com *PstI* e fracionados em gel de agarose 1,4% corado com brometo de etídio. A forma processada, XBP1, não possui sítio de restrição para *PstI*. A relação entre a quantidade das bandas correspondente as duas isoformas de XBP1 é apresentada no gráfico. (B) A quantificação das bandas correspondentes à forma íntegra e a forma processada de XBP1 foi executada utilizando o programa ImageJ (NIH).

5.2.2 Fenótipo de placa na presença de inibidores do domínio cinase e Rnase de IRE1

Uma vez que não foi observado o processamento de XBP1 após a infecção pelos vírus, investigamos se o tratamento com inibidores do domínio cinase e Rnase tem impacto na produtividade desses vírus. Para isso células BSC40 foram tratadas com inibidores para domínio Rnase (4µ8C) na concentração de 25µm (FIGURA 19A) e domínio cinase (Kira6) na concentração de 5µm (FIGURA 19B) e infectadas com 50 PFU dos vírus GP1V, PSTV e WR por 48 horas. Foi utilizado DMSO como controle, por ser o diluente das drogas. Foi observado que o tratamento com a droga para domínio cinase (KIRA6) levou a redução do tamanho da placa de lise dos vírus GP1V, PSTV e WR em comparação ao controle. O tratamento com a droga para o domínio Rnase (4µ8C), não levou a redução da placa de lise dos vírus GP1V, PSTV e WR em comparação ao controle.



Inibidor cinase (KIRA6)



Inibidor Rnase (4μ8C)

Figura 19 - Fenótipo de placa na presença de inibidores do domínio cinase e Rnase. Ensaio de fenótipo de placa na presença do inibidor para domínio Rnase (4μ8C) na concentração de 25μm (A) e cinase (KIRA6) na concentração de 5μm (B). Células BSC40 foram tratadas com os inibidores e infectadas com 50 PFU dos vírus GP1V, PSTV e WR por 48 horas. Após esse período as células foram fixadas em solução de formol 4% e coradas com cristal violeta a 1%.

5.3 ANÁLISE DO EIXO PERK DURANTE A INFECÇÃO PELOS GP1V, PSTV E WR

5.3.1 - Ensaios de infectividade e aspectos de produtividade em células MEF-WT e PERK-KO

Com a finalidade de avaliar a produtividade viral na ausência do eixo PERK da via UPR, foram feitos ensaios de infectividade em células deficientes para o eixo PERK em comparação as células MEF-WT. Desta maneira células MEF-WT e PERK-KO foram infectadas GP1V, PSTV e WR com MOI de 10 e coletadas nos intervalos de 3, 6, 12, 24 e 48 horas para obtenção das curvas de ciclo único (FIGURA 20A). Os títulos virais foram determinados em células BSC40, infectadas e incubadas por 48 horas. As curvas de ciclo único mostraram diferença na produtividade do vírus GP1V e PSTV no tempo de 6 horas nas células MEF-WT em relação a PERK-KO. Para os demais tempos, não foi possível observar diferenças na produtividade desses vírus. Com intuito de observar o fenótipo das placas virais em nas células MEF-WT em comparação com as células PERK-KO, infectamos as monocamadas celulares com 50 PFU dos vírus GP1V, PSTV e WR por 48 horas (FIGURA 20B). Após esse intervalo as células foram fixadas e coradas. Foi possível observar, aumento da placa de lise dos vírus GP1V, PSTV e WR nas células PERK-KO em comparação as placas de lise formadas por esses vírus nas células MEF-WT.

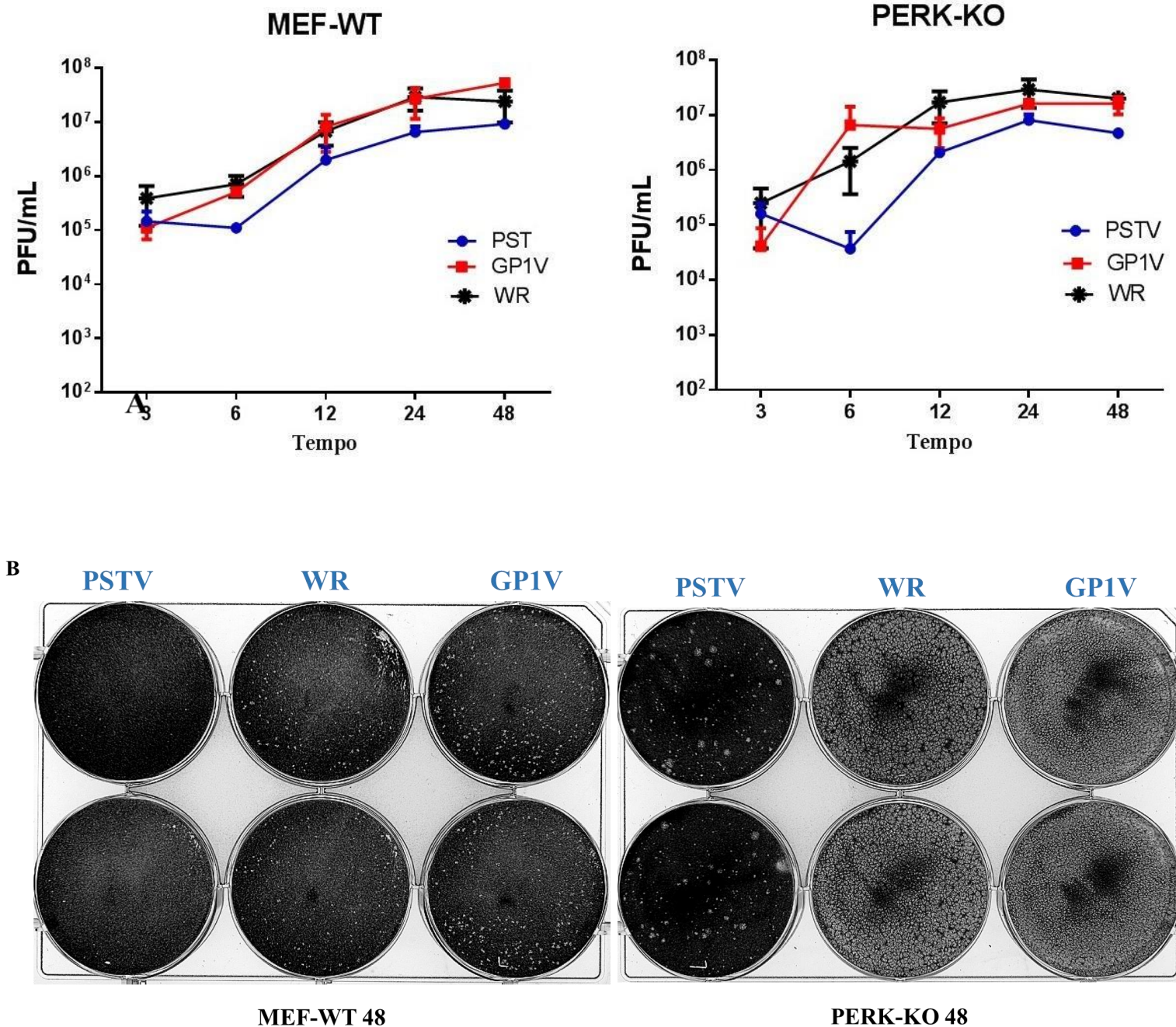


Figura 20 - Ensaio de infectividade e fenótipo de placa em células MEF-WT e PERK-KO: (A) Células MEF-WT e PERK-KO foram infectadas com os vírus GP1V, PSTV e WR em MOI de 10 para obtenção de curvas de ciclo único. As amostras foram coletadas nos tempos de 3, 6, 12, 24 e 48 horas, os títulos virais foram obtidos em células BSC40. (B) Ensaio de fenótipo de placa foram feitos em células MEF-WT e PERK-KO infectadas com 50 PFU dos vírus GP1V, PSTV e WR, incubadas por 48 horas. Após esse período as células foram fixadas em solução de formol 4% e coradas com cristal violeta a 1%. (C) imagens dos ensaios de fenótipo de placa foram feitas em microscópio de fluorescência (EVOS FL image system), antes da fixação das placas.

5.4 ASPECTOS DE CRESCIMENTO E ENSAIOS DE PLACA NA PRESENÇA DO INIBIDOR DE BIP (HA15)

Com o propósito de avaliar se a inibição da chaperona BiP/GRP78 teria impacto na produtividade dos VACV-Br, foram feitas curvas de ciclo único com e sem a presença do inibidor de BiP, HA15 (FIGURA21A). Células BSC40 foram tratadas ou não com inibidor HA15 na concentração de 10 μ m e infectadas com vírus GP1V, PSTV e WR com MOI de 10. As amostras foram coletas nos tempos de 3, 6, 12, 24 e 48 horas e posteriormente tituladas. Não foi observada diferença significativa na produtividade dos vírus GP1V, PSTV e WR nas curvas produzidas na presença do inibidor HA15 em relação aos ensaios sem inibidor. Ensaio de fenótipo de placa foram feitos com objetivo de avaliar o perfil das placas de lise na presença do inibidor HA15 (FIGURA21B). Para isso células BSC40 foram tratadas e infectadas com 50 PFU dos vírus GP1V, PSTV e WR por 48 horas. Nesse ensaio é possível observar redução do tamanho da placa de lise dos vírus GP1V, PSTV e WR na presença do inibidor HA15 em relação ao controle não tratado.

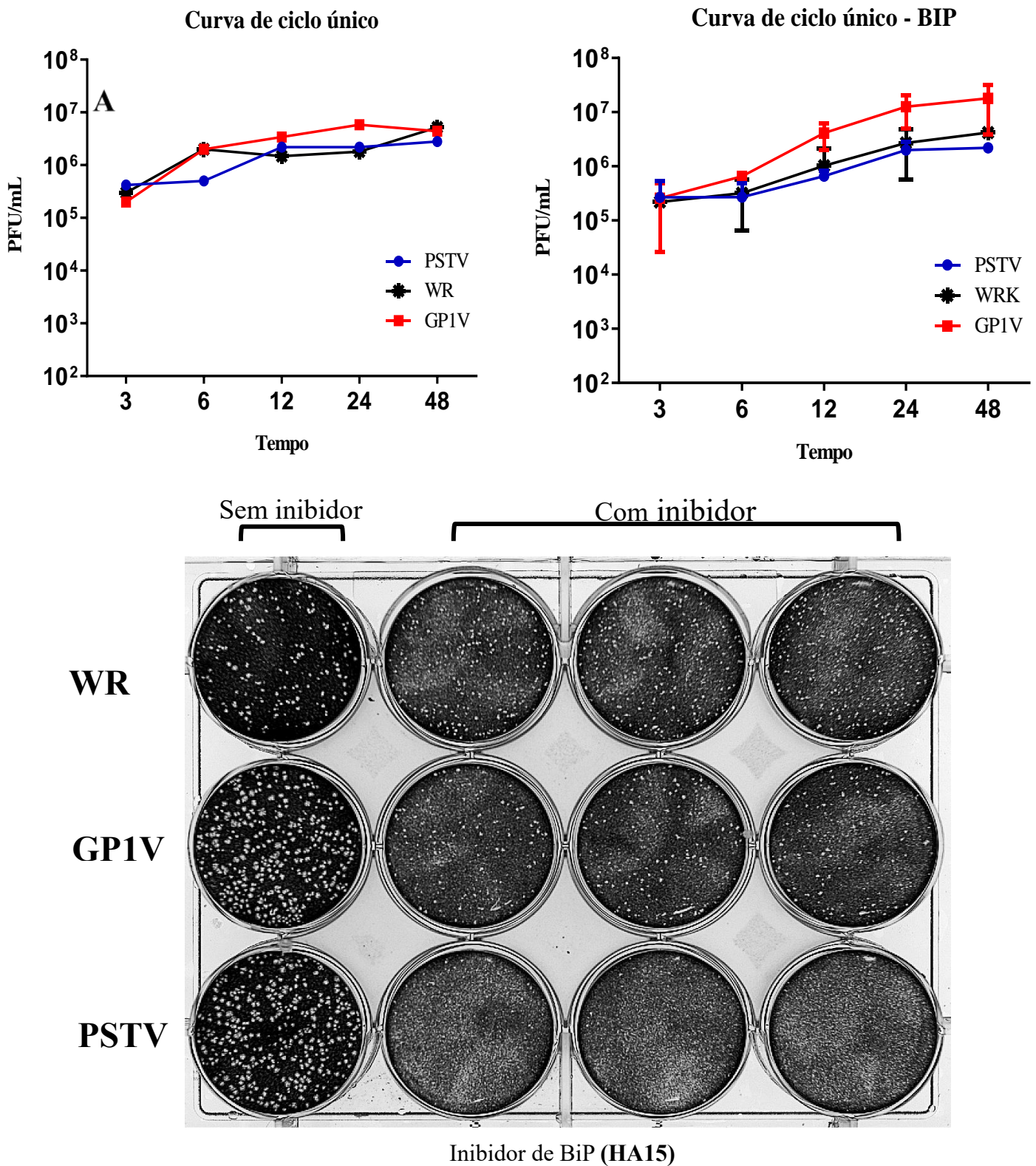


Figura 21 - Curva de ciclo único e ensaios de placa na presença do inibidor de BiP (HA15): (A) Curvas de ciclo único foram feitas em células BSC40 tratadas ou não com o inibidor HA15 e posteriormente infectadas com os vírus GP1V, PSTV e WR com MOI de 10. As amostras foram coletadas nos tempos de 3, 6, 12, 24 e 48 horas e posteriormente tituladas. (B) Os ensaios de fenótipo de placa dos vírus GP1V, PSTV e WR foram feitos em células BSC40, tratadas ou não com o inibidor HA15. As células foram infectadas com 50 PFU dos vírus e incubadas por 48 horas, posteriormente as células foram fixadas em solução de formol 4% e coradas com cristal violeta a 1%.

5.5 EXPRESSÃO DE GENES RESPONSIVOS AO ESTRESE DO RETICULO PELOS VÍRUS GP1V, PSTV E WR

Com a finalidade de comparar os níveis de mRNA de genes induzidos pela ativação da via UPR, células A31 foram infectadas com os vírus GP1V, PSTV e WR com MOI de 10 por 24 horas. Foram analisados por PCR quantitativa em tempo real o RNA total das células infectadas e não infectadas, para determinar os níveis de expressão de *ATF4* (fator de transcrição induzido por CHOP), *ATF6*, *GADD34* (inibidor de PERK, atua no restabelecimento da síntese de proteínas), *p58IPK* (regulada pelo fator de transcrição ATF6), *ERO1* (atua na dobragem de proteínas induzido por CHOP), *Pdia4* (auxilia no dobramento de proteínas), *Bip* (chaperona responsável pela ativação dos eixos da via UPR), *Chop* (fator de transcrição induzido por ATF6 e PERK) e *Xbp1* (processado e total, induzido por IRE1). Além disso utilizamos células tratadas com tunicamicina como controle positivo de estresse. Para a normalização dos dados deste experimento, foi utilizado a média geométrica de dois genes expressos constitutivamente, Rpl32 e Beta-actina. Não foram observados aumento na expressão dos genes, ATF4, p58IPK, CHOP, ERO1a, PDIA4, GADD34 e ATF6 na presença ou ausência das infecções virais. Os níveis de XBP1 processado não aumentaram nas células infectadas por cada um dos três vírus, em concordância com os ensaios de RFLP. A forma não processada de XBP1 nas células infectadas com os diferentes vírus não apresentou aumento significativo em relação aos controles.

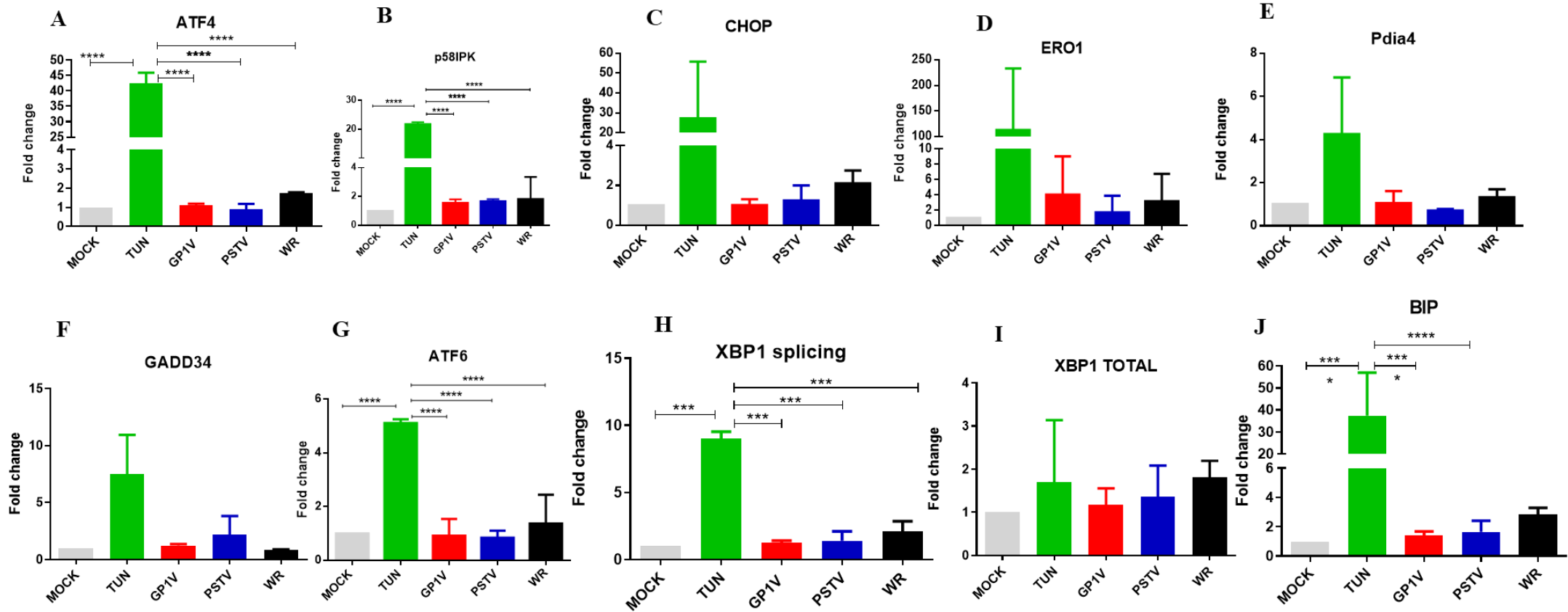


Figura 22 - Representação gráfica da expressão de genes da UPR em MEFS A31 infectadas com os vírus GP1V, PSTV e WR avaliado por ensaios de PCR quantitativa (qPCR). Ensaio de qRT-PCR realizado em extrato total de células A31 não infectadas (Mock) ou infectadas com os vírus GP1V, PSTV e WR por 24 horas. Os ensaios foram realizados em duplicata biológica, com MOI de 10 e controle de estresse, tunicamicina. Com iniciadores específicos para (A) *ATF4*, (B) *p58IPK*, (C) *CHOP*, (D) *ERO1*, (E) *Pdia4*, (F) *GADD34*, (G) *ATF6*, (H) *Xbp1* splicing, (I) *Xbp1* total, (H) *Bip*. Os valores de $2^{-\Delta Ct}$ estão representados pelas barras e demonstram o número de vezes que o gene de interesse está expresso após normalização com os genes constitutivos de referência, RPL32, Beta-actina. As análises estatísticas foram realizadas através do ORDINARY ONE-WAY ANOVA *Tukey's multiple comparisons test*: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ **** $P < 0.0001$.

6 DISCUSSÃO

O retículo endoplasmático é uma organela capaz de responder a perturbações na homeostase celular aliviando o estresse por meio da via de resposta a proteína mal dobradas e infecções virais produtivas estimulam a ativação dessa via pelo acúmulo de proteínas virais no lúmen do RE. Diversos vírus são capazes de manipular distintamente os braços da via UPR com a finalidade de promover a tradução de suas proteínas e persistência na célula infectada (ZHANG & WANG, 2012.).

A multiplicação dos VACV ocorre em íntima associação ao RE, em fabricas virais que estão envoltas por suas membranas, sendo assim não é difícil de imaginar que a infecção por esses vírus tenha um impacto aumentado na via UPR. As amostras brasileiras de VACV são classificadas em dois grupos, de acordo com critérios genéticos e biológicos dos isolados. Neste trabalho, investigamos como a infecção pelas amostras GP1V e PSTV pertencentes a clados diferentes de VACV manipulam os componentes da via UPR.

O Fator de transcrição ATF6 é frequentemente ativado durante infecções virais, e essa ativação pode favorecer a replicação por diferentes fatores, como extensão da capacidade do RE pela ativação de genes relacionados ao dobramento de proteínas. A ativação de ATF6 pode, por exemplo, conduzir a expressão do mRNA de XBP1, ação importante que pode levar a ativação de chaperonas ou ainda atuar evitando a ativação de PERK e assim a atenuação global da síntese de proteínas (GALINDO, HERNÁNDEZ, *et al.*, 2012; AMBROSE e MACKENZIE, 2013; SONG, CHI, *et al.*, 2019). Nas curvas de ciclo único nas células deficientes em ATF6, é possível observar discreta redução no título dos três vírus em comparação as células ATF6-WT. Houve ainda diferença quando comparado os títulos entre as amostras avaliadas, PSTV apresenta menores títulos em comparação a GP1V e WR. Esta diferença em produtividade vista em cultivo celular já havia sido descrita anteriormente (FERREIRA, J. M. S. *et al.* 2008). As curvas de múltiplos ciclos apresentaram perfil similar observado nas curvas de ciclo único, entretanto nas células deficientes em ATF6 nos tempos tardios observou-se queda nos títulos para o vírus VACV-WR e aumento nas células infectadas com PSTV. De forma mais evidente, os ensaios de fenótipo de placa dos VACV-Br (FIGURA 14) mostram diferença na multiplicação dos vírus. É possível observar placas de lise menores nas células ATF6-KO em comparação com placas de lise formadas na monocamada de célula

ATF6-WT. Uma possível explicação para as diferenças mais perceptíveis observadas nos fenótipos das placas em comparação as curvas de multiplicação, está na importância e abundância das formas do vírus VACV. Nas curvas de multiplicação é possível detectar as diferentes formas de VACV, que são em sua maioria os IMVs. Contudo, no fenótipo de placa, as formas CEV e EEV que são menos abundantes, mas destacam-se por serem críticas para propagação célula a célula (APPLEYARD., HAPPEL., & BOULTER., 1971; PAYNE., 1980; BLASCO & MOSS., 1992).

A ativação do eixo ATF6 da via UPR decorre da sua translocação para núcleo celular onde apresenta atividade transcricional. A translocação do ATF6 para núcleo foi observada por microscopia de fluorescência (EVOS FL image system) em células A31 transfectadas e infectadas com os vírus GP1V, PSTV e WR (FIGURA 16). O controle mock diferentemente das células infectadas, não apresenta fluorescência no núcleo celular, demonstrando que não ocorreu a translocação do ATF6. A análise da atividade transcricional do ATF6 (FIGURA 17A) mostrou em comparação ao controle positivo tunicamicina, ativação do ATF6 por todos VACV-Br. A infecção pelo vírus GP1V apresenta atividade transcricional maior que o controle positivo, a infecção por PSTV também apresenta atividade transcricional do ATF6, apresentando um perfil menos intenso que GP1V. O vírus WR por sua vez apresenta um perfil semelhante a GP1V. A quantificação dos núcleos positivos para ATF6-GFP (FIGURA 17B) nos mostrou um perfil semelhante a avaliação da atividade transcricional do ATF6. As células transfectadas e infectadas com GP1V e WR apresentam maior porcentagem de núcleos positivos quando comparados ao controle tunicamicina, PSTV apresenta um perfil similar ao controle positivo tunicamicina. Foi demonstrado que o vírus da hepatite C, ativa ATF6 para promover a sobrevivência em hepatócitos, além disso em infecções agudas pelo ASFV, a ativação desse ramo é importante pro auxiliar o vírus no dobramento correto de suas proteínas (TARDIF *et al.*, 2004; PASQUAL *et al.*, 2011; GALINDO *et al.*, 2012). Da mesma forma foi sugerido que a proteína 8ab do vírus SARS-CoV, ativa ATF6 para facilitar o enovelamento de proteínas virais (SUNG *et al.*, 2009). Alguns estudos inclusive sugerem o uso de chaperonas farmacológicas como uma estratégia terapêutica para COVID-19, com intuito de bloquear a ativação dos braços da via UPR (AOE., 2020; SURESA *et al.*, 2020).

A proteína Cinase dependente de Inositol é o eixo da via UPR mais estudado e diversos vírus são capazes de modular esse eixo de diferentes formas. IRE1 possui um domínio cinase, com funções específicas, e um domínio endonuclease que remove 26

nucleotídeos do mRNA de XBP1. O processamento do mRNA de XBP1 foi observado durante a infecção pelos vírus WNVKUN e CMV, foi relatado que essa ativação seria vantajosa a infecção viral por estimular chaperonas que podem conferir as proteínas virais a conformação correta (ISLER, SKALET e ALWINE, 2005; AMBROSE e MACKENZIE, 2013). Por outro lado, vírus como HCV, HSV-1, HRV e ASFV modulam negativamente o processamento de XBP1 com a finalidade de bloquear por exemplo a degradação por ERAD e EDEM1 (*ER-degradation enhancing-a-mannosidase-like protein 1*) (TARDIF, MORI, *et al.*, 2004; GALINDO, HERNÁEZ, *et al.*, 2012; SU, WANG, *et al.*, 2017; SONG, CHI, *et al.*, 2019). Nós verificamos os níveis de XBP1 processado após a infecção pelos vírus GP1V, PSTV e WR por PCR-RFLP e densitometria de banda (FIGURA 18) e por PCR quantitativa (FIGURA 22H). Os níveis de XBP1 processado chegam a quase 100% nas células tratadas com tunicamicina, um indutor positivo da via. Em contrapartida os níveis de XBP1 nas células infectadas com os VACV-Br não sofrem alterações significativas em relação aos controle não estimulados, sugerindo que a infecção por esses vírus modula negativamente o processamento de XBP1. A ativação de XBP1 leva a expressão de proteínas envolvidas na degradação associada ao estresse do RE, prejudicando a multiplicação viral. Além disso, o processamento de XBP1 tem papel nos mecanismos de imunidade, sendo importante para produção de citocinas por macrófagos (MARTINON, CHEN, *et al.*, 2010; LEÃO e DA FONSECA, 2014). Os VACV interferem na sinalização dos receptores do tipo toll (TLR) (BOWIE *et al.*, 2000) que por sua vez podem ativar XBP1. Dados do nosso grupo de pesquisa e de outros grupos demonstraram que a infecção por VACV modulam negativamente a produção de macrófagos, monócitos, células TCD4+, INF- γ , TNF- α , IL-4 e IL-10 (SILVA GOMES *et al.*, 2011; CHINALIA., 2012; DE FREITAS *et al.*, 2019). Ademais, dados ainda não publicados mostram modulação negativa de XBP1 mesmo após a infecção por VACV e posterior tratamento com tunicamicina. Já foi observado que a infecção pelo SARS-CoV, modula negativamente o processamento de XBP1, processo mediado pela proteína E do vírus (DEDIEGO *et al.*, 2011), semelhantemente observado na infecção por ASFV, onde houve diminuição na indução de XBP1 após infecção pelos vírus (GALINDO *et al.*, 2012).

Para determinar o efeito da atividade Rnase e cinase de IRE1, nós utilizamos inibidores 4 μ 8C e KIRA6 em células A31 infectadas com os vírus GP1V, PSTV e WR (FIGURA 19). A infecção pelo vírus HHV1 é capaz de afetar de maneira distinta os domínios de IRE1, ativando o domínio cinase e desativando o domínio RNAs, ambos por

mecanismos ainda não totalmente elucidados (SU *et al.*, 2017). O tratamento com a droga 4u8C não causou diferenças no tamanho da placa de lise dos vírus GP1V, PSTV e WR, quando comparado ao controle não tratado, fortalecendo os dados observados do processamento de XBP1. Surpreendentemente foi observado que o tratamento com a droga KIRA6, inibidor do domínio cinase, reduziu o tamanho da placa de lise dos três vírus de forma significativa, quando comparado as células não tratadas. Estes dados sugerem uma importância do domínio cinase para os VACV-Br e a irrelevância do domínio Rnase da proteína IRE1.

Enquanto IRE1 e ATF6 podem ativar mecanismos para expressão de genes que levam a extensão da capacidade do RE, PERK leva a uma parada translacional transitória. Quando ativada PERK oligomeriza-se e é ativado via trans-autofosforilação; ativado ele é capaz de reconhecer e ativar eIF2 α . A fosforilação de eIF2 α leva a atenuação global da síntese de proteínas, o que pode conferir desvantagem para alguns vírus, desempenhando um papel importante no controle da infecção. Na infecção pelo vírus da gastroenterite transmissível (TGEV) a ativação de PERK regula negativamente a replicação o TGVE, pela inibição do I κ B α sobre o NF-K β . A infecção pelo vírus WNV_{KUN} inibe a sinalização de PERK por intermédio da ativação de ATF6/IRE1, assim impedindo a atenuação global de proteínas (AMBROSE e MACKENZIE, 2013; XUE, FU, *et al.*, 2018). O HHV-1 mantém PERK inativado durante sua infecção pela associação da glicoproteína viral gB ao domínio luminal. A regulação em abundância da proteína gB é evitada em células deficientes do sensor PERK (MULVEY., ARIAS., MOHR., 2007). O fator de iniciação da tradução em eucariotos é um alvo em infecções virais justamente pelo seu papel importante na ativação de PERK. A infecção pelo HCV também inativa PERK, de forma diferente do HHV-1, a proteína E2 do vírus inibe o EIF2 α com a finalidade de aliviar a inibição geral da tradução (PAVIO., *et al* 2003). Experimentos feitos em células PERK-KO e MEF-WT infectadas pelo vírus da estomatite vesicular (VSV), mostram que a infecção em células nocaute para o sensor PERK é mais eficiente pela incapacidade dessas células em induzir a ativação de EIF2 α (BALTIZIS., *et al* 2004). Os ensaios de infectividade realizados nas células MEF-WT e PERK-KO (FIGURA 20) mostram aumento na produtividade do vírus GP1V, aproximadamente 1log, nas células PERK-KO quando comparada a MEF-WT no tempo de 6 horas. Para vírus PSTV, foi observada uma diminuição no título no tempo de 6 horas, que poderia ser explicado por um atraso na montagem desse vírus. Nos demais intervalos de tempo não observamos diferença na produtividade viral para todos os vírus analisados. Isso pode suscitar a possibilidade de

que a flutuação de título vista nos períodos precoces da replicação, para GP1V ou PSTV por exemplo, seja inespecífica, um artefato experimental, já que os tempos tardios não refletem de forma explícita estas flutuações, como seria de se esperar caso houvesse um impacto biológico mais severo trazido pela ausência de PERK. Em relação ao fenótipo de placa realizado nas células PERK-KO, o tamanho das placas de lise dos vírus GP1V, PSTV e WR é maior do que nas células MEF-WT. O *Vaccinia virus* codificam dois genes reguladores da resposta antiviral que conferem resistência viral ao interferon, K3L e E3L. O gene K3L é um homólogo de EIF2 α , substrato para proteína cinase dependente de RNA de fita dupla, PKR, e pode atuar como inibidor competitivo de EIF2 α . O gene E3L atua sequestrando RNA de fita dupla evitando a ativação de PKR, e foi sugerido que os VACV também inibem a ativação de PERK por meio dessas proteínas. O VACV-WR apresenta esses dois genes (SOOD *et al.*, 2000; LANGLAND & JACOBS, 2002).

Verificamos a influência de BiP na produtividade dos vírus GP1V, PSTV e WR mediante ensaios de fenótipo de placa na presença do inibidor de BiP (HA15) (FIGURA 21). A chaperona BiP exerce um papel importante no monitoramento da via UPR, desligando ou ligando os sensores IRE1, ATF6 e PERK. Ademais Bip também é capaz de impedir a morte celular por interferência na expressão de CHOP (LYOO, PARK, *et al.*, 2015). As curvas de ciclo único na presença do inibidor HA15 mostraram que a multiplicação desses vírus parece não ter sido afetada pela falta de BiP. Diante desse resultado, decidimos observar o fenótipo das placas de lise dos VACV-Br na presença do HA15. Curiosamente, o fenótipo de placa mostrou redução no tamanho das placas de lise dos três vírus quando as células foram tratadas com inibidor HA15. Este resultado pode sugerir certa importância de BiP para a infecção dos VACV avaliados, por exemplo na geração das formas extracelulares virais. Porém, o decréscimo do *fitness* das células na ausência de BiP funcional também pode resultar no fenótipo observado, de forma que o resultado não pode ser considerado definitivo.

Na comparação dos transcritos utilizando o método delta Ct, é possível observar que os níveis de expressão do fator de transcrição 4 (ATF4) (FIGURA 22A) não aumentam nas células infectadas com vírus GP1V, PSTV e WR, quando comparados as células não infectadas ou tratadas com tunicamicina. A co-chaperona p58IPK é regulada positivamente pelo fator de transcrição ATF6 e por IRE1-XBP1. Os níveis de expressão de p58IPK não aumentaram nas células infectadas quando comparamos ao controle não infectado (FIGURA 22B). O fator de transcrição CHOP pode ser induzido por ATF6 e PERK quando esses eixos da via UPR estão ativados. Não observamos o aumento

significativo na expressão do mRNA de CHOP (FIGURA 22C) nas células infectadas com os três vírus quando comparados ao controle de célula. CHOP por sua vez induz a expressão da oxidoreductase do RE, a ERO1a, que pode levar a dobragem de proteínas ou ainda tornar o lúmen do RE um ambiente altamente oxidado, ativando vias pró-apoptóticas. Não houve aumento significativo na expressão dos níveis de ERO1 (FIGURA 22D) nas células infectadas com os três vírus em comparação ao controle de célula. Os níveis de expressão da proteína dissulfeto isomerase (PDIA4), responsável por auxiliar no dobramento de proteínas, não aumentaram nas células infectadas com os vírus GP1V, PSTV e WR quando comparados ao controle de célula (FIGURA 22E). Foi analisada a expressão da proteína GADD34, que atua no restabelecimento da síntese de proteínas e homeostase celular. Não houve aumento na expressão da proteína GADD34 nas células infectadas pelos diferentes vírus. Surpreendentemente os níveis de expressão do fator de transcrição ATF6 não aumentaram nas células infectadas com os vírus GP1V, PSTV e WR, quando comparados ao controle de célula (FIGURA 22G). Em consonância com ensaios de PCR-RFLP (FIGURA 18), os níveis de expressão de XBP1 processado, não aumentam em relação ao controle de célula não infectado célula (FIGURA 22H). As células tratadas com tunicamicina apresentaram aumento significativo em relação as células infectadas com os vírus GP1V, PSTV e WR (FIGURA 22H). Os níveis de expressão de XBP1 total nas células infectadas com diferentes vírus, não apresentaram aumento significativo em relação ao controle de célula e controle positivo (FIGURA 22I). A chaperona BiP é responsável pela ativação dos eixos da via UPR quando se encontra dissociada dos mesmos. Não observamos aumento nos níveis de expressão dessa chaperona nas células infectadas com os três vírus em relação ao controle de célula (FIGURA 22J). De uma forma global, o conjunto de nossos dados sugere que a via IRE1a é ativamente afetada pela infecção causada pelos diferentes VACVs, o que sugere que esta via interfere de alguma maneira na replicação viral. Por outro lado, as outras duas vias principais da UPR (ATF6, e PERK) parecem ser pouco alteradas pela infecção e também não causam alterações dramáticas na dinâmica replicativa dos vírus, sugerindo que sua relevância para a biologia dos VACCVS é limitada.

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos é possível concluir que:

- ✓ O eixo ATF6 da via UPR é ativado durante a infecção pelos vírus GP1V, PSTV e WR.
- ✓ O processamento de XBP1 é modulado negativamente durante a infecção dos vírus GP1V, PSTV e WR.
- ✓ O domínio cinase de IRE1 tem papel importante na produtividade dos vírus GP1V, PSTV e WR.
- ✓ O domínio Rnase de IRE1 é irrelevante para produtividade dos vírus GP1V, PSTV e WR.
- ✓ Os vírus GP1V, PSTV e WR multiplicaram eficientemente nas células deficientes para o sensor PERK.

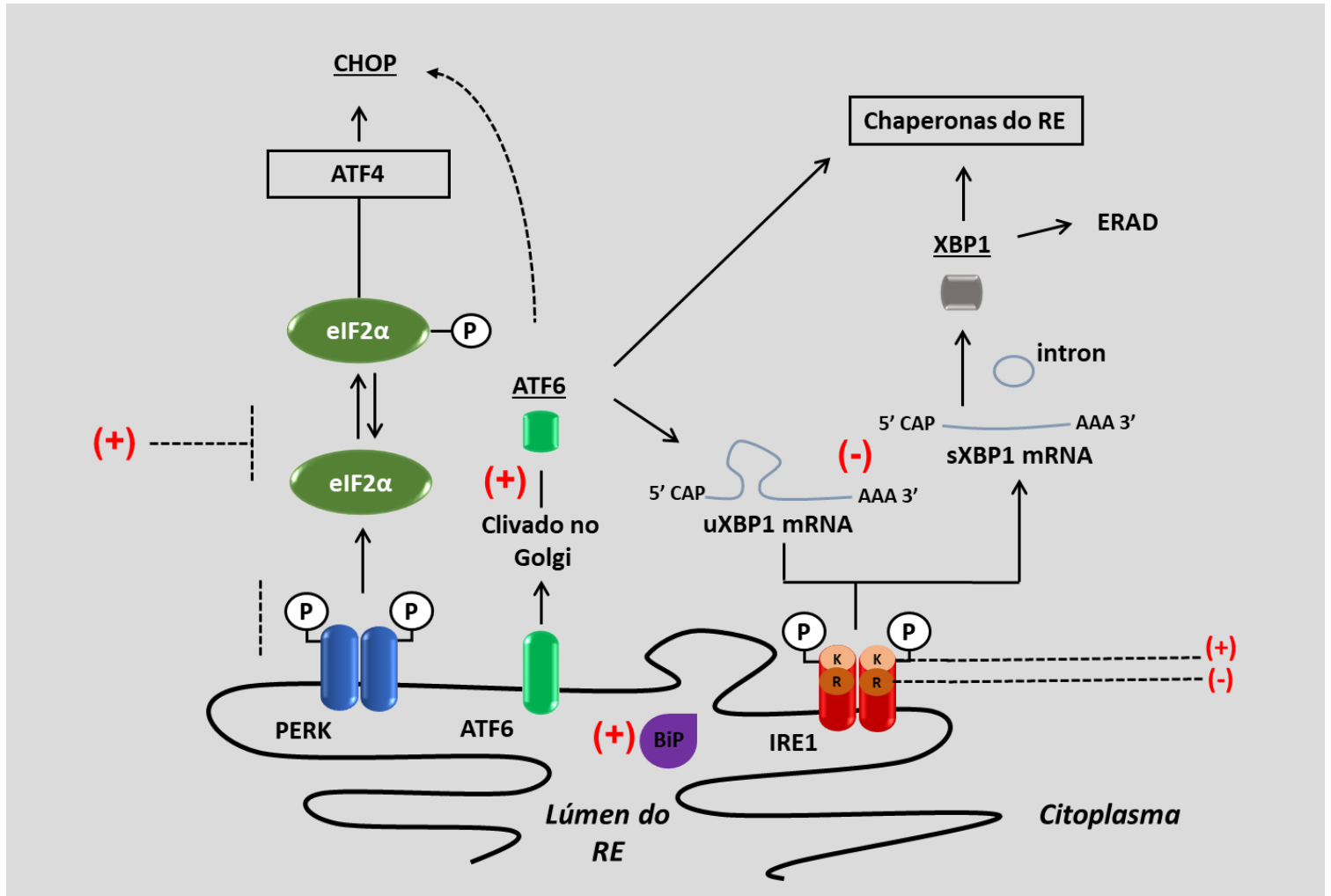


Figura 23: Modelo de efeitos da infecção por VACV sobre a via UPR. No modelo proposto, a infecção com os VACV GP1V, PSTV e WR induz a ativação de ATF6. O ramo ATF6 é importante para eficiente replicação viral. Por outro lado, o ramo PERK parece ser dispensável para o ciclo. PERK é sabidamente inibido pela expressão da proteína viral K3 que possui homologia ao eIF2a e funciona como um pseudosubstrato para as cinases como PERK. Independente do aumento nos níveis de expressão de XBP1, o processamento do mRNA de XBP1 é modulado negativamente. O domínio cinase de IRE1 parece ter papel importante na produtividade dos três vírus. Entretanto o domínio RNase parece ser irrelevante para a produtividade dos vírus.

8 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS NO PERÍODO

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

- **LOURENÇO, K. L., LEÃO, T. L., QUEIROZ, C. O., FONSECA, F.G** ZONOTIC VACCINIA VIRUS BELONGING TO DIFFERENT GENETIC CLADES PRESENT IMMUNOMODULATION ABILITIES THAT ARE PROPORTIONAL TO THEIR PATHOGENIC POTENTIAL. Apresentação de Pôster no XXXI Congresso Brasileiro de Virologia, 2020, Ouro Preto.

- **LOURENÇO, K. L., LEÃO, T. L., QUEIROZ, C. O., FONSECA, F.G** VACCINIA VIRUS ZOONÓTICOS PERTENCENTES A DIFERENTES CLADOS GENÉTICOS EXIBEM HABILIDADES DE IMUNOMODULAÇÃO PROPORCIONAIS AO SEU POTENCIAL PATOGÊNICO. Apresentação de Pôster no VII Simpósio de Microbiologia da UFMG, 2020, Belo Horizonte.

- **LOURENÇO, K. L., LEÃO, T. L., SERUFO, A. V.; DA FONSECA, F.G.** EXPRESSÃO DE GENES RESPONSIVOS AO ESTRESE DO RETICULO PELOS VACCINIA VIRUS GUARANI P1 (GP1V) E PASSATEMPO (PSTV). Apresentação de Pôster no XXX Congresso Brasileiro de Virologia, 2019, Belo Horizonte.

- **LOURENÇO, K. L., LEÃO, T. L., SERUFO, A. V.; DA FONSECA, F.G.** INTERAÇÃO VÍRUS-HOSPEDEIRO: A ATIVAÇÃO DE COMPONENTES DA VIA DE RESPOSTA A PROTEÍNAS MAL DOBRADAS (UPR) PELOS VACCINIA VIRUS GUARANI P1 (GP1V) E PASSATEMPO (PSTV). Apresentação de Pôster no VI Simpósio de Microbiologia da UFMG, 2019, Belo Horizonte.

- **LOURENÇO, K. L., LEÃO, T. L., QUEIROZ, C. O., FONSECA, F.G.** INTERAÇÃO VÍRUS-HOSPEDEIRO: A ATIVAÇÃO DE COMPONENTES DA VIA DE RESPOSTA A PROTEÍNAS MAL DOBRADAS (UPR) PELOS VACCINIA VIRUS GUARANI P1 (GP1V) E PASSATEMPO (PSTV). Apresentação de Pôster no V Simpósio de Microbiologia da UFMG, 2018, Belo Horizonte.

- **LOURENÇO, K. L., LEÃO, T. L., QUEIROZ, C. O., FONSECA, F.G.** POXVIRUS-HOST INTERACTIONS: THE ACTIVATION OF COMPONENTS OF THE HOST'S UNFOLDED PROTEIN RESPONSES (UPR) DURING INFECTIONS BY THE VACCINIA VIRUS STRAINS GUARANI P1 AND PASSATEMPO. Apresentação Oral no XXIX Congresso Brasileiro de Virologia, 2018, Belo Horizonte.

- **PRÊMIOS:**

- **MELHOR PÔSTER APRESENTADO** NO V SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG. 2018.

- **ORGANIZAÇÃO DE EVENTOS**

- VI SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG. 2019.

- XXX BRAZILIAN CONGRESS OF VIROLOGY & XIV MERCOSUR MEETING OF VIROLOGY, 2019.

- V SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA. 2018.

- IV SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG. 2017.

- XXVIII CONGRESSO BRASILEIRO DE VIROLOGIA & XII ENCONTRO DE VIROLOGIA DO MERCOSUL. 2017.

- III SIMPÓSIO DE MICROBIOLOGIA DA UFMG. 2016.

- **ORIENTAÇÕES**

- CID DE OLIVEIRA QUEIROZ. AVALIAÇÃO DO SENSOR IRE1 DA VIA UPR. INICIAÇÃO CIENTÍFICA (GRADUANDO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS) - UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE MINAS GERAIS.

- **PALESTRAS**

- **Degradação do Meio Ambiente e Vírus emergentes.** 2020. (Centro Universitário Una).

- **Covid19: Um panorama geral sobre a pandemia que mudou o mundo.** 2020. (Secretária de Estadual de saúde; Faculdade Pitágoras; Centro Universitário Una; 36^a Semana de Engenharia Química (SEQ) da UFMG).

- **A pandemia que mudou o mundo: do diagnóstico a vacina.** 2020. (COLTEC UFMG).

- **Vírus: tudo aquilo que você não vê.** 2018. (Centro Universitário Una).

- **Microbiologia: tudo aquilo que você não vê.** 2018. (Faculdade Pitágoras).

- **ARTIGO PUBLICADO**

- **DETECTION OF SARS-COV-2 RNA ON PUBLIC SURFACES IN A DENSELY POPULATED URBAN AREA OF BRAZIL: A POTENTIAL TOOL FOR MONITORING THE CIRCULATION OF INFECTED PATIENTS.** Science of The Total Environment; 2020.

9 REFERÊNCIAS

ABRAHÃO *et al.* Outbreak of Severe Zoonotic *Vaccinia Virus* Infection, Southeastern Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, p. 665-668, abril 2015.

ABRAHÃO *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, outubro 2009.

ABRAHÃO *et al.* *Vaccinia Virus* Infection in Monkeys, Brazilian Amazon. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, p. 976-979, junho 2010.

AOE, T. Pathological aspects of COVID-19 as a conformational disease and the use of pharmacological chaperones as a potential therapeutic strategy. **Frontiers in pharmacology**, 11, 1095, 2020.

AMBROSE, L.; MACKENZIE, J. M. ATF6 Signaling Is Required for Efficient West Nile Virus Replication by Promoting Cell Survival and Inhibition of Innate Immune Responses. **Journal of Virology**, Melbourne, v. 87, p. 2206 –2214, fevereiro 2013.

ANDREW, E.; COUPAR, B. E. H.; BOYLE, D. B. Humoral and cell-mediated immune responses to recombinant vaccinia viruses in mice. **Immunology and Cell Biology**, v. 67, p. 331–337, junho 1989.

APPLEYARD, G.; HAPEL, A. J.; BOULTER, E. A. An antigenic difference between intracellular and extracellular rabbitpox virus. **Journal of General Virology**, v. 13, n. 1, p. 9-17, 1971.

BALDICK; MOSS, B. Characterization and Temporal Regulation of mRNAs Encoded by *Vaccinia Virus* Intermediate-Stage Genes. **Journal of Virology**, v. 67, p. 3515-3527, junho 1993.

BALTZIS, *et al.* Resistance to vesicular stomatitis virus infection requires a functional cross talk between the eukaryotic translation initiation factor 2 α kinases PERK and PKR. **Journal of virology**, v. 78, n. 23, p. 12747-12761, 2004.

BLASCO, RAFAEL; MOSS, BERNARD. Role of cell-associated enveloped vaccinia virus in cell-to-cell spread. **Journal of virology**, v. 66, n. 7, p. 4170-4179, 1992.

BOWIE *et al.* A46R and A52R from vaccinia virus are antagonists of host IL-1 and toll-like receptor signaling. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, p. 10162-10167. 2000.

CAMPOS *et al.* Assessing the variability of Brazilian *Vaccinia virus* isolates from a horse exanthematic lesion: coinfection with distinct viruses. **Springer**, p. 275–283, 2011.

CHINALIA, L; Caracterização e comparação da resposta imune de camundongos Balb/c durante a infecção aguda pelos isolados zoonóticos *Vaccinia vírus Guarani P1* (GP1) e *Passatempo* (PST). **Universidade Federal de Minas Gerais**, Belo Horizonte, p. 1-114, março 2013.

CHUNG, C.-S.; HUANG, C.-Y.; CHANG, W. Vaccinia Virus Penetration Requires Cholesterol and Results in Specific Viral Envelope Proteins Associated with Lipid Rafts. **Journal of Virology**, v. 79, p. 1623–1634, fevereiro 2005.

COSTA *et al.* Detection of Vaccinia Virus in Urban Domestic Cats, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, fevereiro 2017.

CUADAL, C; TONISSI, M, F.; BILLALBA, C, T. ENRIQUECIMENTO FÍSICO AFETA PARÂMETROS INDICADORES DE BEM ESTAR EM CAMUNDONGOS (*Mus musculus*). **RESBCAL**, São Paulo, v. 2, p. 195-205, 2013.

CUSH *et al.* Locally Produced IL-10 Limits Cutaneous *Vaccinia Virus* Spread. **PLOS Pathogens**, p. 1- 23, março 2016.

DA FONSECA *et al.* Morphological and molecular characterization of the poxvirus *BeAn 58058*. **Archives of Virology**, p. 1171–1186, janeiro 1998.

DA FONSECA *et al.* Characterization of a vaccinia-like virus isolated in a Brazilian forest. **Journal of General Virology**, p. 223–228, 2002.

DA FONSECA *et al.* Zoonotic vaccinia virus outbreaks in Brazil. **Future Medicine**, p. 697–707, 2011.

DAMASO *et al.* An Emergent Poxvirus from Humans and Cattle in Rio de Janeiro State: Cantagalo Virus May Derive from Brazilian Smallpox Vaccine. **Virology**, p. 439- 449, 2000.

DE ASSIS *et al.* Group 2 *Vaccinia Virus*, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.18, p. 2035-2038, dezembro 2012.

DE ASSIS *et al.* Reemergence of *Vaccinia Virus* during Zoonotic Outbreak, Pará State, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, p. 2017-2020, dezembro 2013.

DEHAVEN *et al.* Poxvirus Complement Control Proteins Are Expressed on the Cell Surface through an Intermolecular Disulfide Bridge with the Viral A56 Protein. **Journal of Virology**, v. 84, p. 11245–11254, novembro 2010.

DEDIEGO, Marta L. et al. Severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein regulates cell stress response and apoptosis. **PLoS pathog**, v. 7, n. 10, p. e1002315, 2011.

DIWAKER; MISHRA, K. P.; GANJU; Effect of modulation of unfolded protein response pathway on dengue virus infection, v. 47, p. 960–968, dezembro 2015.

DI GIULIO, D. B.; ECKBURG, P. B. Human monkeypox: an emerging zoonosis. **The Lancet Infectious Diseases**, p. 15-25, janeiro 2004.

DRUMOND *et al.* Brazilian *Vaccinia virus* strains are genetically divergent and differ from the Lister vaccine strain. **Microbes and Infection**, v. 10, p. 185-197, fevereiro 2008.

DUTRA *et al.* Molecular evidence of Orthopoxvirus DNA in capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) stool samples. **Springer**, v. 162, n. 2, p. 439–448, setembro 2017.

EARL, P. L.; AMERICO, J. L.; MOSS, B. Insufficient Innate Immunity Contributes to the Susceptibility of the Castaneous Mouse to *Orthopoxvirus* Infection. **Journal Virology**, p. 1-43, julho 2017.

FAGONE, P.; JACKOWSKI. Membrane phospholipid synthesis and endoplasmic reticulum function. **The Journal of Lipid Research**, p. 311–316, Abril 2009.

FERREIRA, J. M. S. *et al.* Virulence in Murine Model Shows the Existence of Two distinct populations of Brazilian *Vaccinia virus* strains. **Plos one**, v. 3, p. 1-10, agosto 2008.

FILHO, L. S. **História geral da medicina brasileira**. São Paulo: Hucitec/Edusp, v. 2, 1991.

FRANCO-LUIZ *et al.* The detection of *Vaccinia virus* confirms the high circulation of Orthopoxvirus in buffaloes living in geographical isolation, Marajó Island, Brazilian Amazon. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, p. 16-19, 2016.

GALINDO *et al.* The ATF6 branch of unfolded protein response and apoptosis are activated to promote African swine fever virus infection. **Cell Death and Disease**, Madri, n. 341, p. 1-10, julho 2012.

GAZZINELLI *et al.* Immune responses during human schistosomiasis mansoni. X. Production and standardization of an antigen-induced mitogenic activity by peripheral blood mononuclear cells from treated, but not active cases of schistosomiasis. **The Journal of Immunology**, 1983.

GOMES *et al.* ImmuneModulation in Primary *Vaccinia virus* Zoonotic Human Infections. **Clinical and Developmental Immunology**, v. 2012, p. 1-11, setembro 2012.

GRAHAM *et al.* The T1/35kDa family of poxvirus-secreted proteins bind chemokines and modulate leukocyte influx into virus-infected tissues. **Virology**, p. 12-24, março 1997.

GROOTJANS *et al.* The unfolded protein response in immunity and inflammation. **NATURE**, p. 469–484, junho 2016.

GUBSER *et al.* Poxvirus genomes: a phylogenetic analysis. **Journal of General Virology**, p. 105–117, 2004.

HALLER *et al.* Poxviruses and the Evolution of Host Range and Virulence. **Elsevier**, janeiro 2014. 15-40.

HANSSON, O.; JOHANSSON, G. O.; VAHLQUIST, B. *Vaccinia* Gangrenosa with normal humoral antibodies. A case possibly due to deficient cellular immunity treated with N-methylisatin beta-thiosemicarbazone. **Acta paediatrica** , p. 264-72, 1966.

HAYASAKA, D.; ENNIS, F. A.; TERAJIMA. Pathogenesis of respiratory infections with virulent and attenuated vaccinia viruses. **Virology Journal**, p. 1-14, fevereiro 2007.

HOSOI, T.; OSAWA, K. Endoplasmic reticulum stress in disease: mechanisms and therapeutic opportunities. **Clinical Science**, p. 19-29, 2010.

HUSSAIN, S. G.; RAMAIAH, K. V. A. Endoplasmic reticulum: Stress, signalling and apoptosis. **Current Science**, v. 93, p. 1684-1696, 2007.

ICTV. International Committee on Taxonomy of Viruses. **ICTV**, 2015. Disponível em: <<http://www.ictvonline.org/virustaxonomy.asp>>. Acesso em: 26 de agosto de 2020.

ISLER, A.; SKALET, H.; ALWINE, C. Human Cytomegalovirus Infection Activates and Regulates the Unfolded Protein Response. **Journal of Virology**, Filadélfia, v. 79, p. 6890-6899, junho 2005.

JARAHIAN *et al.* Modulation of NKp30- and NKp46-Mediated Natural Killer Cell Responses by Poxviral Hemagglutinin. **PLoS Pathogens**, v. 7, p. 1-18, agosto 2011.

JOHNSTON, J. B.; GRANT MCFADDEN. Poxvirus Immunomodulatory Strategies: Current Perspectives. **Journal of virology**, v. 77, p. 6093–6100, junho 2003.

KAMIMURA, D.; BEVAN, M. J. Endoplasmic reticulum stress regulator XBP-1 contributes to effector CD8+ T cell differentiation during acute infection. **J Immunol**, p. 5433–5441., 2008.

KAMIMURA, D.; BEVAN, M. J. Endoplasmic reticulum stress regulator XBP-1 contributes to effector CD8+ T cell differentiation during acute infection. **J Immunol**, p. 5433–5441, novembro 2009.

KARUPIAH *et al.* Elevated natural killer cell responses in mice infected with recombinant vaccinia virus encoding murine IL-2. **The Journal of Immunology**, v. 144, p. 290-298, janeiro 1990.

KETTLE *et al.* *Vaccinia virus* serpin B13R (SPI-2) inhibits interleukin-1beta-converting enzyme and protects virus-infected cells from TNF- and Fas-mediated apoptosis, but does not prevent IL-1beta-induced fever. **Journal of General Virology**, p. 677–685, 1997.

LANGLAND, J. O.; JACOBS, B. L. The Role of the PKR-Inhibitory Genes, E3L and K3L, in Determining *Vaccinia Virus* Host Range. **Virology**. 299: 133-141, 2002.

LEÃO, T.; DA FONSECA, G. Subversion of cellular stress responses by poxviruses. **World Journal of Clinical Infectious Diseases**, Belo Horizonte, p. 27-40, novembro, 2014.

LÊAO, T. L. Efeitos da infecção por *Vaccinia virus* sobre a ativação de componentes da via de resposta a proteínas mal dobradas (UPR) em fibroblastos de embriões de camundongo (MEFS), Belo Horizonte, dezembro 2017.

LEFKOWITZ, E. J.; WANG, C.; UPTON, C. Poxviruses: past, present and future. **Elsevier**, fevereiro 2006. 105–118.

LEITE, A. *et al.* *Passatempo Virus*, a *Vaccinia Virus* Strain, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, p. 1935-1938, dezembro 2005.

LI *et al.* The unfolded protein response regulator GRP78/BiP is required for endoplasmic reticulum integrity and stress-induced autophagy in mammalian cells. **Cell Death Differ**, p. 1460–1471, setembro 2008.

LIMA, Mauricio Teixeira *et al.* An update on the known host range of the Brazilian vaccinia virus: An outbreak in buffalo calves. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 3327, 2019.

LIN *et al.* Divergent Effects of PERK and IRE1 **Signaling on Cell Viability**. PLoS ONE. v. 4, i. 1, 2009.

LIU *et al.* Bioluminescent imaging of *Vaccinia virus* infection in immunocompetent and immunodeficient rats as a model for human smallpox. **Scientific Reports**, p. 1-11, agosto 2015.

LYOO, *et al.* Constant up-regulation of BiP/GRP78 expression prevents virus-induced apoptosis in BHK-21 cells with Japanese encephalitis virus persistent infection. **Virology Journal**, Seoul, p. 1-8, 2015.

MARCINIAK, S. J.; DAVID RON. Endoplasmic reticulum stress signaling in disease. **Physiol Rev.**, v. 86, p. 1133-49, outubro 2006.

MARSCHANG, R. E. Viruses Infecting Reptiles. **Viruses**, v. 3, p. 2087-2126, novembro 2011.

MARTINON, F. *et al.* Toll-like receptor activation of XBP1 regulates innate immune responses in macrophages. **Nat Immunol**, Boston, p. 1-20, maio 2010.

MCFADDEN; Poxvirus tropism. **Nature**, v. 3, p. 201-213, março 2005.

MEGID et al. Vaccinia Virus in Humans and Cattle in Southwest Region of São Paulo State, Brazil. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, p. 647–651, 2008.

MORETTA L. *et al.* On the pathogenesis of perforin defects and related immunodeficiencies. **Immunology Today**, p. 593, novembro 2000.

MOSS, B. Poxvirus entry and membrane fusion. **Elsevier**, p. 48 – 54, setembro 2005.

MOSS, B. Poxviridae. In: KNIPE, D. M., et al. **Fields Virology**. 6. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, v. 1, 2013. Cap. 66, p. 2129-2159.

MOSS, B. Poxvirus DNA Replication. **Cold Spring Harbor Perspectives Biology**, p.1-12, setembro 2013.

MULVEY, M; A, MOHR, C; Ian. Maintenance of ER homeostasis in HSV-1 infected cells through the association of a viral glycoprotein with PERK, a cellular ER-stress sensor. **Journal of Virology**, 2007.

OHTA *et al.* Effect of Complement Depletion by Cobra Venom Factor on *Fowlpox Virus* Infection in Chickens and Chicken Embryos. **Journal of Virology**, p. 670-673; fevereiro 1986.

OLIVEIRA *et al.* Group 1 *Vaccinia virus* Zoonotic Outbreak in Maranhão State, Brazil. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, p. 1142–1145, 2013.

OLIVEIRA *et al.* Short Report: Group 1 *Vaccinia virus* Zoonotic Outbreak in Maranhão State, Brazil. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, p. 1142–1145, 2013.

OLIVEIRA *et al.* From Lesions to Viral Clones: Biological and Molecular Diversity amongst Autochthonous Brazilian *Vaccinia Virus*. **Viruses**, p. 1218-1237, Março 2015.

OYADOMARI, S.; MORI, M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. **Cell Death Differ**, p. 381-9, abril 2004.

PANCHANATHAN, V.; CHAUDHRI; KARUPIAH. Correlates of protective immunity in poxvirus infection: where does antibody stand? **Immunology and Cell Biology**, p. 80-86, 2008.

PARRINO, J.; GRAHAM, B. S. Smallpox vaccines: Past, present, and future. **J Allergy Clin Immunol**, v. 118, p. 1320-1326, dezembro 2006.

PASQUAL, Giulia et al. Role of the host cell's unfolded protein response in arenavirus infection. **Journal of virology**, v. 85, n. 4, p. 1662-1670, 2011.

PAVIO *et al.* Protein synthesis and endoplasmic reticulum stress can be modulated by the hepatitis C virus envelope protein E2 through the eukaryotic initiation factor 2 α kinase PERK. **Journal of virology**, v. 77, n. 6, p. 3578-3585, 2003.

PAYNE, Lendon G. Significance of extracellular enveloped virus in the in vitro and in vivo dissemination of vaccinia. **Journal of General Virology**, v. 50, n. 1, p. 89-100, 1980.

PINCUS, *et al.* BiP Binding to the ER-Stress Sensor Ire1 Tunes the Homeostatic Behavior of the Unfolded Protein Response. **PLoS Biol**, p. 1-14, julho 2010.

QUAH, B. J. C.; WARREN, H. S.; PARISH, C. R. Monitoring lymphocyte proliferation in vitro and in vivo with the intracellular fluorescent dye carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. **Nature**, p. 2049 - 2056, 2007.

QUIXABEIRA-SANTOS *et al.* Animal Movement and Establishment of *Vaccinia Virus* Cantagalo Strain in Amazon Biome, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, p. 726-729, abril 2011.

RATHORE, A. P. S.; NG, M.-L.; VASUDEVAN, S. G. Differential unfolded protein response during Chikungunya and Sindbis virus infection: CHIKV nsP4 suppresses eIF2 α phosphorylation. **Virology Journal**, p. 1-15, 2013.

REARDON, S. SMALLPOX WATCH. **Nature**, abril 2014. 22-24.

REED *et al.* The Detection of *Monkeypox* in Humans. **The new england journal of medicine**, p. 342-350, janeiro 2004

.

ROACH *et al.* Transcription factor expression in lipopolysaccharide-activated peripheral-blood-derived mononuclear cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, p. 16245– 16250, outubro 2009.

ROBERTS, L.; SMITH, L. *Vaccinia virus* morphogenesis and dissemination. **Trends in Microbiology**, v. 16, p. 472–479, outubro 2008.

RON, D.; WALTER; Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. **Nature**, p. 519–529, julho 2007.

RUTKOWSKI, D. T.; KAUFMAN, R. J. A trip to the ER: coping with stress. **Trends Cell Biol**, v. 14, p. 20-28, 2004.

SAKALA *et al.* Poxvirus-Encoded Gamma Interferon Binding Protein Dampens the Host Immune Response to Infection. **Jornal of Virology**, v. 81, p. 3346–3353, abril 2007.

SCHMIDT *et al.* *Vaccinia Virus* Entry Is Followed by Core Activation and Proteasome-Mediated Release of the Immunomodulatory Effector VH1 from Lateral Bodies. **Cell Reports**, p. 464–476, agosto 2013.

SCHMIDT, I.; BLECK, C. K. E.; MERCER, Poxvirus host cell entry. **Elsevier**, p. 20–27, 2012.

SCHRAMM, B.; LOCKER, K. Review Cytoplasmic Organization of Poxvirus DNA Replication. **Traffic**, p. 839–846, 2005.

SEET *et al.* POXVIRUSES AND IMMUNE EVASION. **Annu. Rev. Immunol**, p. 377–423, janeiro 2003.

SCHRÖDER, M.; KAUFMAN, R. J. Divergent Roles of IRE1 α and PERK in the Unfolded Protein Response. **Current Molecular Medicine**. 6, 5-36, 2006.

SILVA GOMES *et al.* Immune modulation in primary vaccinia virus zoonotic human infections. **Clin Dev Immunol** 2011, 2012.

SHIGEMI, *et al.* Effects of ER stress on unfolded protein responses, cell survival, and viral replication in primary effusion lymphoma. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, p. 565-572, 2016.

SMITH, G. ; MCFADDEN, G. *Smallpox: anything to declare?* **NATURE**, v. 2, p. 521-527, julho 2002.

SMITH, G; *Genus Orthopoxvirus: Vaccinia virus*, Suíça, Birkhäuser Verlag, 2002.

SMITH *et al.* *Vaccinia virus* immune evasion: mechanisms, virulence and immunogenicity. **Journal of General Virology**, v. 94, p. 2367–2392, agosto 2013.

SOOD *et al.* Pancreatic eukaryotic initiation factor-2 α kinase (PEK) homologues in humans, *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans* that mediate translational control in response to endoplasmic reticulum stress. **Biochemical Journal**, v. 346, n. 2, p. 281-293, 2000.

SONG *et al.* Non-Structural Protein 2B of Human Rhinovirus 16 Activates Both PERK and ATF6 Rather Than IRE1 to Trigger ER Stress. **Viruses**, Beijing, v. 11, n. 133, p. 1-17, janeiro 2019.

STANFORD *et al.* Immunopathogenesis of poxvirus infections: forecasting the impending storm. **Immunology and Cell Biology**, v. 85, p. 93–102, 2007.

STEWART, M. K.; COOKSON, B. T. Evasion and interference: intracellular pathogens modulate caspase-dependent inflammatory responses. **Nature**, v. 14, p. 346-349, junho 2016.

SU *et al.* Opposite Roles of RNase and Kinase Activities of Inositol-Requiring Enzyme 1 (IRE1) on HSV-1 Replication. **Viruses**, Nanjing, v. 9, p. 1-17, agosto 2017.

SUNG, S. C; CHAO, C. Y; JENG, K. S; YANG, J. Y; LAI, M. M. The 8ab protein of SARS-CoV is a luminal ER membrane-associated protein and induces the activation of ATF6. **Virology**. May 10;387(2):402-13, 2009.

SUREDA *et al.* Endoplasmic reticulum as a potential therapeutic target for covid-19 infection management?. **European journal of pharmacology**, 882, 173288, 2020.

TABAS; RON. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. **Nat Cell Biol**, p. 185-190, março 2011.

TARDIF *et al.* Hepatitis C Virus Suppresses the IRE1-XBP1 Pathway of the Unfolded Protein Response. **The Journal of Biological Chemistry**, Denver, v. 279, p. 17158–17164, fevereiro 2004.

TOLONEN *et al.* *Vaccinia Virus* DNA Replication Occurs in Endoplasmic Reticulum-enclosed Cytoplasmic Mini-Nuclei. **Molecular Biology of the Cell**, p. 2031–2046, julho 2001.

TRINDADE *et al.* *Belo Horizonte virus*: a *Vaccinia*-like virus lacking the A-type inclusion body gene isolated from infected mice. **Journal of General Virology**, p.2015–2021, 2004

TRINDADE *et al.* *Araçatuba Virus*: A *Vaccinia* like Virus Associated with Infection in Humans and Cattle. **Emerging Infectious Diseases**, v. 9, p. 155-160, fevereiro 2003.

TRINDADE, D. S. *et al.* Zoonotic *Vaccinia Virus* Infection in Brazil: Clinical Description and Implications for Health Professionals. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, p. 1370–1372, abril 2007.

TRINDADE *et al.* Isolation of two *Vaccinia virus* strains from a single bovine vaccinia outbreak in rural area from Brasil: Implications on the emergence of zoonotic orthopoxviruses. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, p. 486–490, 2006.

TRINDADE *et al.* Zoonotic *Vaccinia Virus*: Clinical and Immunological Characteristics in a Naturally Infected Patient. **Clinical Infectious Diseases**, p. 37–40, 2009.

TRINDADE *et al.* Real-time PCR assay to identify variants of *Vaccinia virus*: Implications for the diagnosis of bovine vaccinia in Brazil. **Journal of Virological Methods**, p. 63–71, 2008.

TRINDADE *et al.* Zoonotic *Vaccinia Virus*: Clinical and Immunological Characteristics in a Naturally Infected Patient. **Brief Report**, p. 37-40, fevereiro 2008.

TSURU, *et al.* Mechanism of Protection During the Early Phase of a Generalized Viral Infection. II. Contribution of Polymorphonuclear Leukocytes to Protection against Intravenous Infection with Influenza Virus. **Journal of General Virology**, v. 68, p.419-424, 1987.

UEDA; MORIKAWA, S.; WATANABE. Unclassified Poxvirus: Characterization and Physical Mapping of Cotia Virus DNA and Location of a Sequence Capable of Encoding a Thymidine Kinase. **Virology**, p. 67-72, março 1995.

VANDERPLASSCHEN *et al.* Extracellular enveloped vaccinia virus is resistant to complement because of incorporation of host complement control proteins into its envelope. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, p. 7544–7549, 1998.

VIRALZONE. ViralZone. **ViralZone**, 2014. Disponível em: <http://viralzone.expasy.org/all_by_species/174.html>. Acesso em: 1 junho 2016.

WALTER, P.; RON, D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. **Science**, p. 1081–1086, novembro 2011.

WALTER, F. *et al.* Imaging of single cell responses to ER stress indicates that the relative dynamics of IRE1/XBP1 and PERK/ATF4 signalling rather than a switch between signalling branches determine cell survival. **Cell Death Differ**, p. 1502–1516, 2015.

WANG, Y. *et al.* IL-12p40 and IL-18 Play Pivotal Roles in Orchestrating the Cell-Mediated Immune Response to a Poxvirus Infection1. **The Journal of Immunology**, p. 3324-3331, agosto 2009.

WEST, B. C. *et al.* Neutrophil Uptake of Vaccinia Virus in Vitro. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 156, p. 597–606, 1987

WHO. World Health Organization. **World Health Organization**, 1979. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/195316/1/WHA33_3_spa.pdf?ua=1>. Acesso em: 31 de Maio DE 2016 maio 2016.

XUE, M. *et al.* The PERK Arm of the Unfolded Protein Response Negatively Regulates Transmissible Gastroenteritis Virus Replication by Suppressing Protein Translation and Promoting Type I Interferon Production. **Journal of Virology**, Harbin, v. 92, p. 1-21, agosto 2018.

XU, R. *et al.* Cellular and Humoral Immunity against Vaccinia Virus Infection of Mice. **The Journal of Immunology**, p. 6265-6271, março 2004.

XU, C.; BAILLY-MAITRE, B.; REED, J. C. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. **The Journal of Clinical Investigation**. v. 115, n. 10, pp. 2656-2664, 2005.

ZHANG, L.; WANG, A. Virus-induced ER stress and the unfolded protein response. **Front Plant**, 2012

ZHANG, P. *et al.* *Herpes Simplex Virus 1* UL41 Protein Suppresses the IRE1/XBP1 Signal Pathway of the Unfolded Protein Response via It

10 ANEXO

10.1 Manuscrito em preparação para submissão à revista científica *Journal of Virology*.

TITLE: MANIPULATION OF UNFOLDED PROTEIN RESPONSE BY *VACCINIA VIRUS GUARANI P1* (GP1V) AND *PASSATEMPO* (PSTV)

Lourenço, K. L.¹; Leão, T. L.²; da Fonseca, F.G.¹

Laboratório de Virologia Básica e Aplicada, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, UFMG. E-mail: karine_lourenco@hotmail.com

ABSTRACT

The replicative success of *Vaccinia virus* depends on their ability to subvert antiviral host mechanisms. Poxviruses multiplication and maturation are closely associated with the endoplasmic reticulum (ER) and their membranes. The RE can respond to disturbances through the unfolded protein response (UPR) pathway. Here, we investigate the effects of infections by zoonotic VACV Brazilian strains, *Guarani P1 virus* (GP1V) and *Passatempo virus* (PSTV), on the activation of UPR pathway sensors. Several studies show that different viruses can activate pathway components and negatively modulate others. We observed translocation of ATF6 to the nucleus as well as transcriptional increase after GP1V, PSTV and WR infection. XBP1 processing appears to be negatively modulated after VACV infection, however, inhibition of the IRE1 kinase domain led to a reduction in the lysis plate of these viruses. PERK seems to be irrelevant to the productivity of the VACVs studied here. These results indicate that GP1V, PSTV and WR manipulate the three arms of the UPR path differently to ensure replicative success.

INTRODUCTION

Obtaining the correct three-dimensional protein conformation occurs in the RE lumen, which has a fundamental oxidative environment for the formation of disulfide bridges, important in maintaining protein structure. Consequently, RE can respond to disturbances caused by the accumulation of malformed proteins, leading to the proper processing of these proteins or even programmed cell death. Several factors can lead to the induction of a response to Unfolded Protein Response (UPR) among them: abiotic stress, genetic mutations, pharmacological agents, viral and bacterial pathogens. Since prolonged UPR pathway activity occurs, indicating that homeostasis cannot be restored, components of this pathway induce cell death. (RUTKOWSKI & KAUFMAN, 2004; NELSON & COX, 2005; XU *et al.* 2005; HUSSAIN & RAMAIAH, 2007).

A via UPR possui três braços: o Fator de Transcrição 6 (Activating Transcription Factor 6 – ATF6), a Proteína Cinase Dependente de Inositol (Inositol-requiring Transmembrane Kinase and Endonuclease, ou IRE-1 α) e Proteína Cinase Residente no RE semelhante à PKR (PKR-like

Endoplasmic Reticulum Kinase, ou PERK) (MARCINIAK & RON, 2006). Essas moléculas são desativadas por meio da ligação da chaperona do RE, BiP/GRP78 (Binding Protein/heat shock protein de 78kDa regulada por glicose) no domínio voltado para o lúmen do RE (LI *et al.*, 2008).

Vaccinia virus is a member of *Poxviridae* replicative success is dependent on its ability to block, evade or subvert essential elements of the immune response and cellular. VACVs have a double strand of DNA and encode about 200 proteins. The multiplication of poxviruses is closely related to the endoplasmic reticulum since the viral factories produced during poxvirus replication are surrounded by their membranes, this conformation is necessary for efficient viral DNA replication (TOLONEN *et al.*, 2001; MOSS; 2013). VACVs are divided into two groups: group 1 (less virulent in murine infection models), group 2 (more virulent in murine infection models). Other features such as plaque phenotype and nucleotide deletions of proteins common to these viruses are considered in this division.

In this work, we used two VACV that have different virulence patterns, *Vaccinia virus* Guarani P1 (GP1V) which belongs to group 2 and Passatempo virus (PSTV) which members of group 1. Here we demonstrate how GP1V and PSTV viruses manipulate the components of the UPR pathway, as well as the importance of these components for viral productivity after infection in mouse embryonic fibroblasts.

RESULTS

Kinetics of virus production in ATF6-KO and ATF6-WT cells

We compared the production kinetics of GP1V, PSTV and WR viruses in ATF6-WT cells compared to ATF6-KO cells. One-step growth curve, multi-step growth curve, and plaque phenotype were made. For the plaque phenotype (Fig. 1a), cells were infected with 50 PFU of GP1V, PSTV and WR viruses for 48 hours. After this time the cells were fixed in 4% formalin solution and labeled with hyperimmune serum. One-step growth curve (Fig. 1b) and multi-step growth curve (Fig. 1c) were made on ATF6-KO and ATF6-WT cells. The monolayers were infected with MOI of 10 and collected at 3, 6, 12, 24 and 48 hours to obtain one-step growth curves (b). For the multiple cycle curves (c) the monolayers were infected with MOI of 0.01 and collected at 24, 48, 72 and 96 hours. Viral titers were obtained from BSC40 cells, the monolayer was infected and incubated for 48 hours and after that time the cells were fixed with 4% formaldehyde solution and stained with 1% violet crystal. As shown, in ATF6-KO cells GP1V, WR and PSTV virus lysis plaques are smaller when compared to plaques formed in ATF6-WT cells. We did not observe significant differences in the productivity of these viruses in one-step and multi-step growth curves.

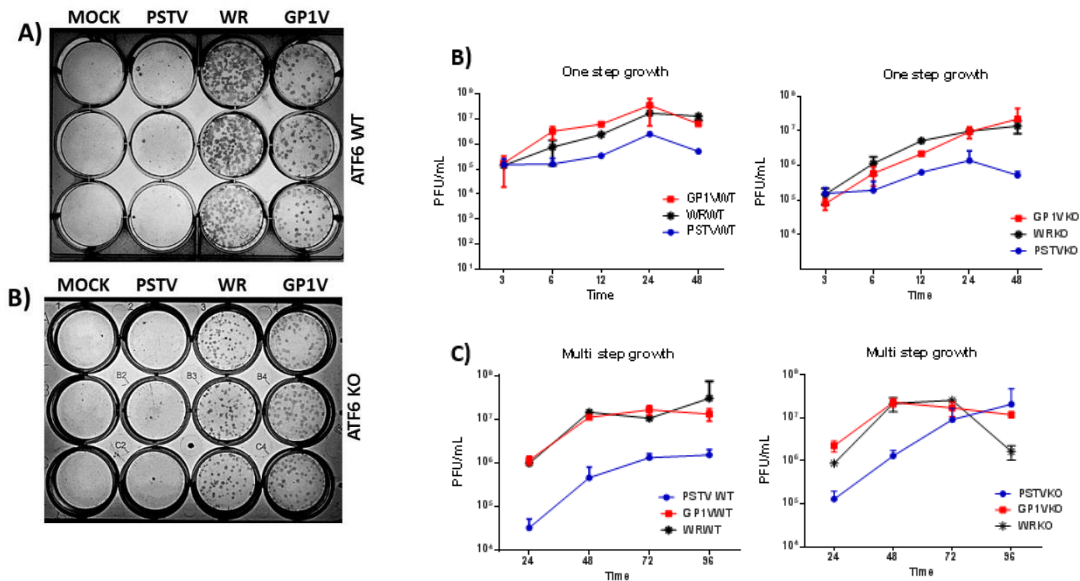


FIGURE 1 - Plaque phenotype assays and multiplication curves of GP1V, PSTV and WR viruses in MEFs ATF6-WT and ATF6-KO cells. GP1V, PSTV and WR virus plaque phenotype assays were performed on ATF6-WT and ATF6-KO (A) cells, the monolayers were infected with 50 PFU of these viruses and incubated for 48 hours. After this time the cells were fixed in 4% formalin solution and labeled with hyperimmune serum. Multiplication curves were obtained after infection by GP1V, PSTV and WR viruses in ATF6-WT and ATF6-KO cells. The monolayers were infected with MOI of 10 and collected at 3, 6, 12, 24 and 48 hours to obtain one-step curves (B). For the multi-step curves (C) the monolayers were infected with MOI of 0.01 and collected at 24, 48, 72 and 96 hours.

Activation of ATF6-GFP in BALB / 3T3 clone A31 mouse embryo infected with GP1V, PSTV, and WR viruses

We evaluated ATF6 activation following GP1V, PSTV and WR infection in BALB / 3T3 clone A31 mouse embryo fibroblasts. ATF6 translocation was evaluated using plasmid-transfected A31 cells containing green fluorescent protein-fused ATF6 (pShortCMV-ATF6-GFP). Following transfection, the monolayer was infected with GP1V, PSTV and WR viruses at an MOI of 5 and incubated for 24 hours (Fig. 2 a, b, c). After this time the cells were fixed with 4% paraformaldehyde. Mock cells have a cytoplasmic / RE distribution pattern, while in GP1V, PSTV and WR infected cells ATF6-GFP is translocated to the nucleus (stained with Hoechst 33258). The images were obtained by fluorescence microscopy (EVOS FL image system). Control of transfected cells without virus infection was used (Fig. 2d). As a result, ATF6 translocation to the nucleus was observed in cells infected with GP1V, PSTV and WR viruses.

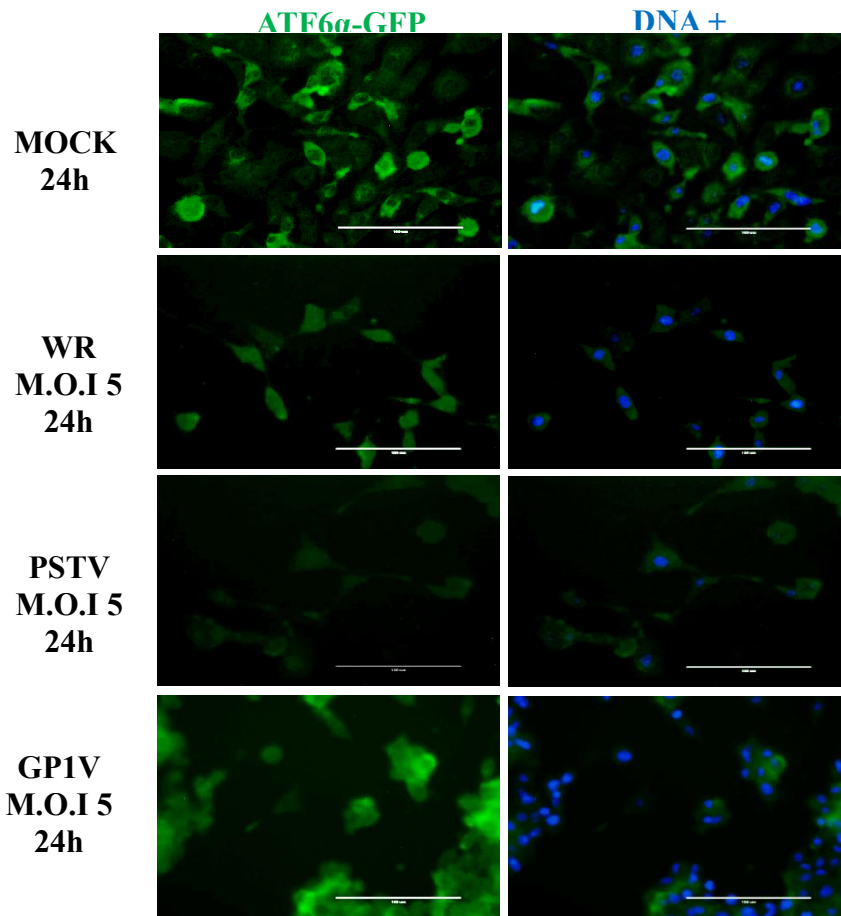


FIGURE 2 - Activation of ATF6-GFP in A31 cells infected with GP1V, PSTV, and WR viruses. MEF A31 cells transfected with plasmid pShortCMV-ATF6-GFP and subsequently infected with WR (A), PSTV (B) and GP1V (C) viruses in MOI 5 and cell control (MOCK). After 24 hours the cells were fixed with 4% paraformaldehyde. Mock cells have a cytoplasmic / RE distribution pattern, while in GP1V, PSTV and WR infected cells ATF6-GFP is translocated to the nucleus (stained with Hoechst 33258). The images were obtained by fluorescence microscopy (EVOS FL image system).

Transcriptional activity and quantification of nuclear translocation of ATF6-GFP in A31 cells infected with GP1V, PSTV, and WR viruses.

Once the activation of ATF6 by GP1V, PSTV and WR viruses was observed, we analyzed the transcriptional activity of ATF6-GFP in A31 cells infected by this virus. Cells were transfected with plasmid p5xATF6-GL3, this plasmid has five sites for the ATF6 transcription factor controlling the luciferase gene. Cells were also co-transfected with the pRL-TK plasmid used as normalizer to determine luciferase activity. After transfection, the monolayer was infected with the different VACV-Br with MOI of 10 and incubated for 24 hours. Cell controls (MOCK) and

ER stress induction control, tunicamycin (glycosylation inhibitor, UPR pathway activator) were used. The translocation of ATF6 to infected or non-infected cell nuclei was also assessed by flow cytometry (Fig. 3). A31 cells were transfected with plasmid pCMVshort-ATF6-GFP and infected with GP1V, PSTV and WR viruses with MOI of 10 and incubated for 24 hours, after which time their nuclei were isolated for quantitation. The result demonstrates the translocation of ATF6 to the nucleus in cells infected with GP1V, PSTV, and WR viruses as well as increased transcriptional activity of ATF6 in cells infected with different viruses when compared to the positive tunicamycin control.

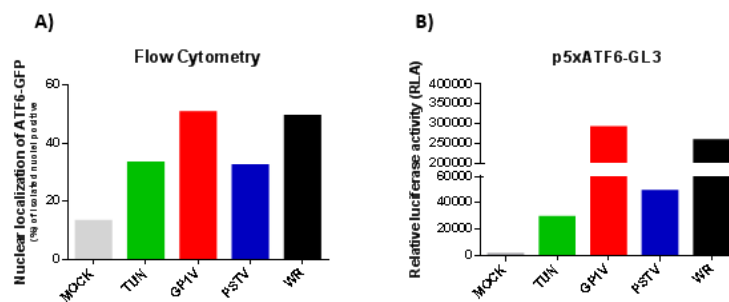


Figure 3 - Transcriptional activity and quantification of nuclear translocation of ATF6-GFP in A31 cells infected with GP1V, PSTV and WR viruses. (A) Analysis of transcriptional activity following infection by GP1V, PSTV and WR viruses. A31 cells were transfected and infected with MOI of 10 GP1V, PSTV and WR viruses for 24 hours. Cell extract was obtained with the Passive Lysis Buffer from the Dual-Luciferase Kit (Promega) and luciferase activity readings were taken as per manufacturer's instructions. Relative luciferase activity was calculated by the ratio between firefly luciferase readings (p5xATF6-GL3) and Renilla luciferase (pLR-TK). (B) Quantification of ATF6 positive or non-positive nuclei was performed on A31 cells transfected with plasmid pCMVshort-ATF6-GFP, infected by GP1V, PSTV, and WR viruses for 24 hours. ATF6-GFP positive nuclei were counted by flow cytometry (BD FACSCalibur™).

Semi-quantitative analysis of IRE1-mediated XBP1 mRNA processing

Activation of the IRE1 axis may lead to the processing of the transcription factor XBP1 through the activation of its RNase domain. We evaluated whether, after GP11V, PSTV and WR infection, transcription factor XBP-1 processing occurred. For this purpose, A31 cells were infected with MOI 1 and incubated for 24 hours for PCR-RFLP and densitometry assays (Fig. 4). We used tunicamycin-treated cells as a positive control. XBP1 mRNA transcripts were amplified by RT-PCR, digested with PstI and fractionated on ethidium bromide-stained 1.4% agarose gel. The processed form, XBP1s, has no restriction site for PstI and migrates more slowly than the unprocessed form, XBP1u. The relationship between the number of bands corresponding to the two XBP1 isoforms is shown in the graph (Fig. 4). As shown, it can be seen that infection with GP1V, PSTV and WR viruses does not induce XBP1 mRNA processing.

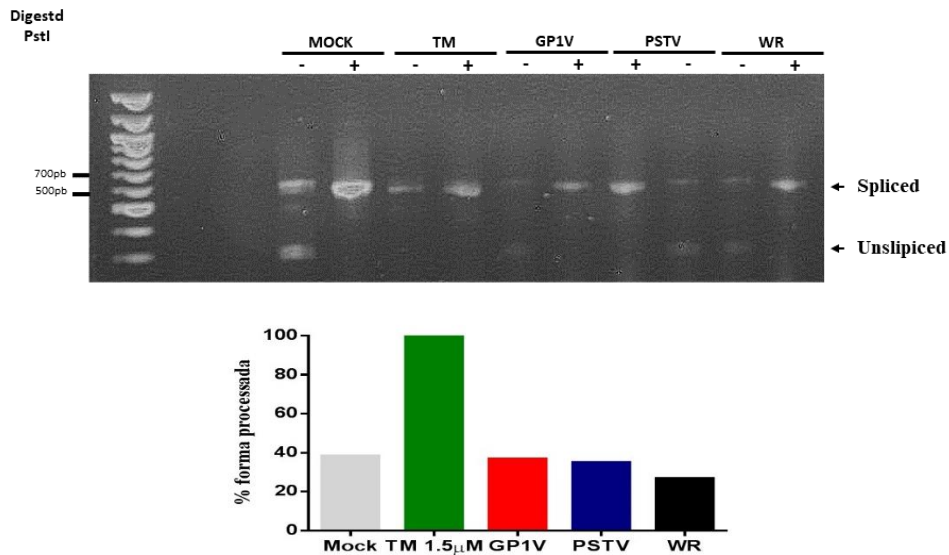


Figure 4 - DNA restriction fragment polymorphism (PCR-RFLP) analysis of cells infected with VACV. Visualization after electrophoretic fractionation of amplicons on 6% polyacrylamide gel and 1X TBE. Quantitation of the bands corresponding to the integral form and the processed form of XBP1 was performed using the ImageJ (NIH) program.

Plaque phenotype in the presence of IRE1 kinase and Rnase domain inhibitors

Since XBP1 processing was not observed after virus infection, we investigated whether treatment with kinase and Rnase domain inhibitors has an impact on virus productivity. BSC40 cells were treated with inhibitors for the Rnase domain ($4\mu\text{8C}$) at $25\mu\text{m}$ concentration (Fig. 5A) and kinase domain (Kira6) at $5\mu\text{m}$ concentration (Fig. 5B) and infected with 50 PFU of GP1V, PSTV, and WR viruses for 48 hours. DMSO was used as the untreated control. This result shows the reduction of GP1V, PSTV and WR virus lysis plaques in cells treated with kinase domain inhibitor (Kira6), however infected cells treated with Rnase domain ($4\mu\text{8C}$) did not show a reduction of lysis plaques when compared to untreated control.

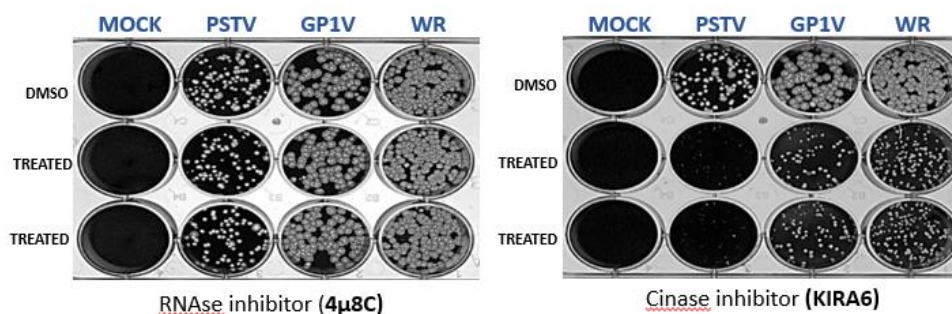


Figure 5 - Plaque phenotype in the presence of kinase and Rnase domain inhibitors. Plaque phenotype tests in the presence of RNase domain inhibitor ($4\mu\text{8C}$) at $25\mu\text{m}$ (A) and kinase (KIRA6) at $5\mu\text{m}$ (B). BSC40 cells were treated with inhibitors and infected with 50 PFU of GP1V, PSTV and WR viruses for 48 hours. After this period the cells were fixed in 4% formalin solution and stained with 1% violet crystal.

Infectivity assays and productivity aspects in MEF-WT and PERK-KO cells

To evaluate viral productivity in the absence of the PERK axis of the UPR pathway, infectivity assays were performed on cells deficient for the PERK axis compared to MEF-WT cells. Thus MEF-WT and PERK-KO cells were infected with GP1V, PSTV, and WR with MOI of 10 and collected at intervals of 3, 6, 12, 24 and 48 hours to obtain one-step curves (Fig. 6A). Viral titers were determined in BSC40 cells, infected and incubated for 48 hours. To observe the viral plaque phenotype in MEF-WT cells compared to PERK-KO cells, we infected the cell monolayers with 50 PFU of GP1V, PSTV, and WR viruses for 48 hours (Fig. 6B). After this interval, the cells were fixed and stained. The appearance of cell monolayers in the plaque phenotype assay was also observed by microscopy images (Fig. 6C) 48 hours after infection by the three viruses. As a result, we observed GP1V, PSTV and WR virus lysis plaque reduction in MEF-WT cells when compared to PERK-KO, however, it was not possible to see this difference in one-step curves performed in MEF-WT cells compared to PERK-KO cells.

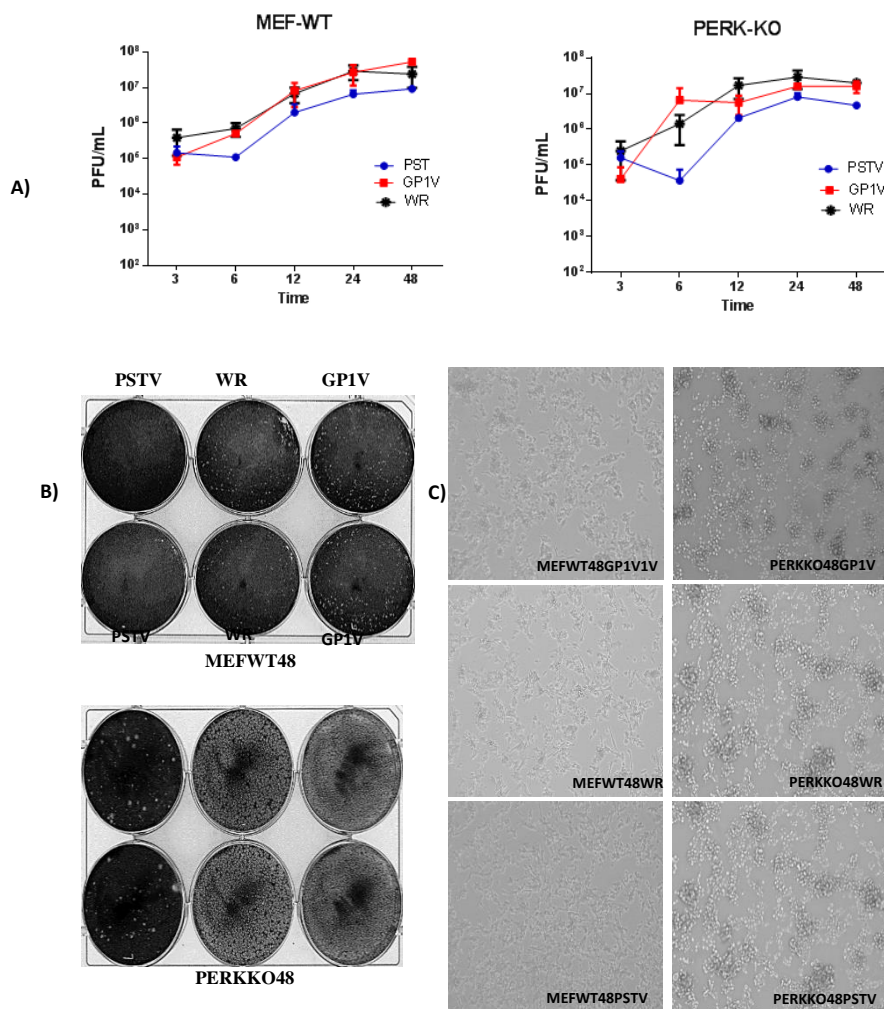


Figure 6 - Infectivity and plaque phenotype assays in MEF-WT and PERKO-KO cells: (A) MEF-WT and PERK-KO cells were infected with GP1V, PSTV, and WR viruses at MOI of 10 to obtain one-step curves. Samples were collected at 3, 6, 12, 24 and 48 hours, viral titers were obtained in BSC40 cells. (B) Plaque phenotype assays were performed on MEF-WT and PERK-KO cells infected with 50 PFU of GP1V, PSTV and WR viruses incubated for 48 hours. After this period the cells were fixed in 4% formalin solution and stained with 1% violet crystal. (C) images of plaque phenotype assays were taken under a fluorescence microscope (EVOS FL image system) before plaque fixation.

Growth aspects and plaque assays in the presence of the BPI inhibitor (HA15)

To assess whether inhibition of chaperone BiP / GRP78 would impact VACV-Br productivity, one-step curves were made with and without the presence of BiP inhibitor HA15 (Fig. 7A). BSC40 cells were treated or not with HA15 inhibitor at a concentration of 10 μ m and infected with GP1V, PSTV and WR virus with MOI of 10. Samples were collected at 3, 6, 12, 24 and 48 hours and subsequently titrated. Plaque phenotype assays were performed to evaluate the profile of the lysis plaques in the presence of the inhibitor HA15 (Fig. 7B). For this BSC40 cells were treated and infected with 50 PFU of GP1V, PSTV and WR viruses for 48 hours. This result showed a reduction in GP1V, PSTV and WR virus lysis plate in the presence of HA15 inhibitor, however, this profile was not observed in the one-step curve in the presence of HA15 inhibitor.

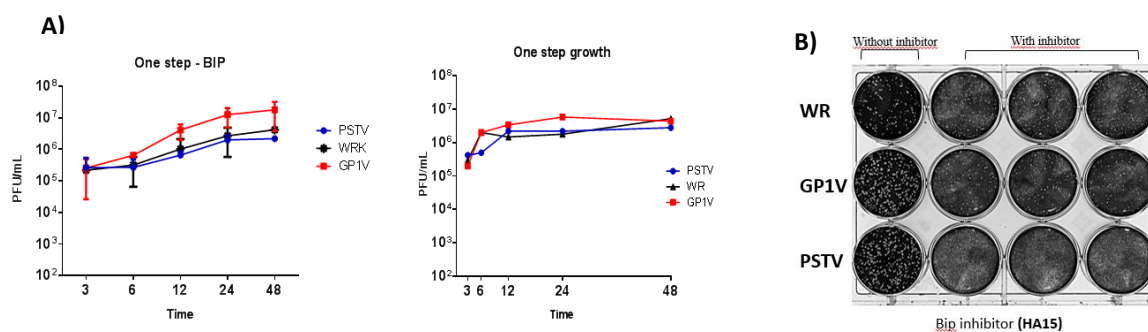


Figure 7 - One-step curve and plaque assays in the presence of BiP inhibitor (HA15): (A) One-step curves were performed on BSC40 cells treated or not with the HA15 inhibitor and subsequently infected with GP1V, PSTV, and WR with MOI of 10. Samples were collected at 3, 6, 12, 24 and 48 hours and subsequently titrated. (B) GP1V, PSTV and WR virus plaque phenotype assays were performed on BSC40 cells, whether or not treated with the HA15 inhibitor. The cells were infected with 50 PFU of the viruses and incubated for 48 hours, after which the cells were fixed in 4% formalin solution and stained with 1% violet crystal.

Expression of genes responsive to reticulum stress by GP1V, PSTV, and WR viruses

To compare gene mRNA levels induced by UPR pathway activation, A31 cells were infected with GP1V, PSTV and WR viruses with MOI of 10 for 24 hours. Total RNA from infected and uninfected cells were analyzed by real-time quantitative PCR to determine the expression levels of processed and total *ATF4*, *ATF6*, *GADD34*, *p58IPK*, *ERO1*, *Pdia4*, *Bip*, *Chop*, *Xbp1*. Also, we use cells treated with tunicamycin as positive stress control. To normalize

the data of this experiment, the geometric mean of two constitutively expressed genes, Rpl32 and β -actin, was used. It can be observed that infection by GP1V, PSTV and WR viruses does not induce the increase of PERK arm-related UPR responsive genes, as well as ATF6. However, it is observed that infection by VACV-Br does not lead to increased gene expression of the processed form of XBP1.

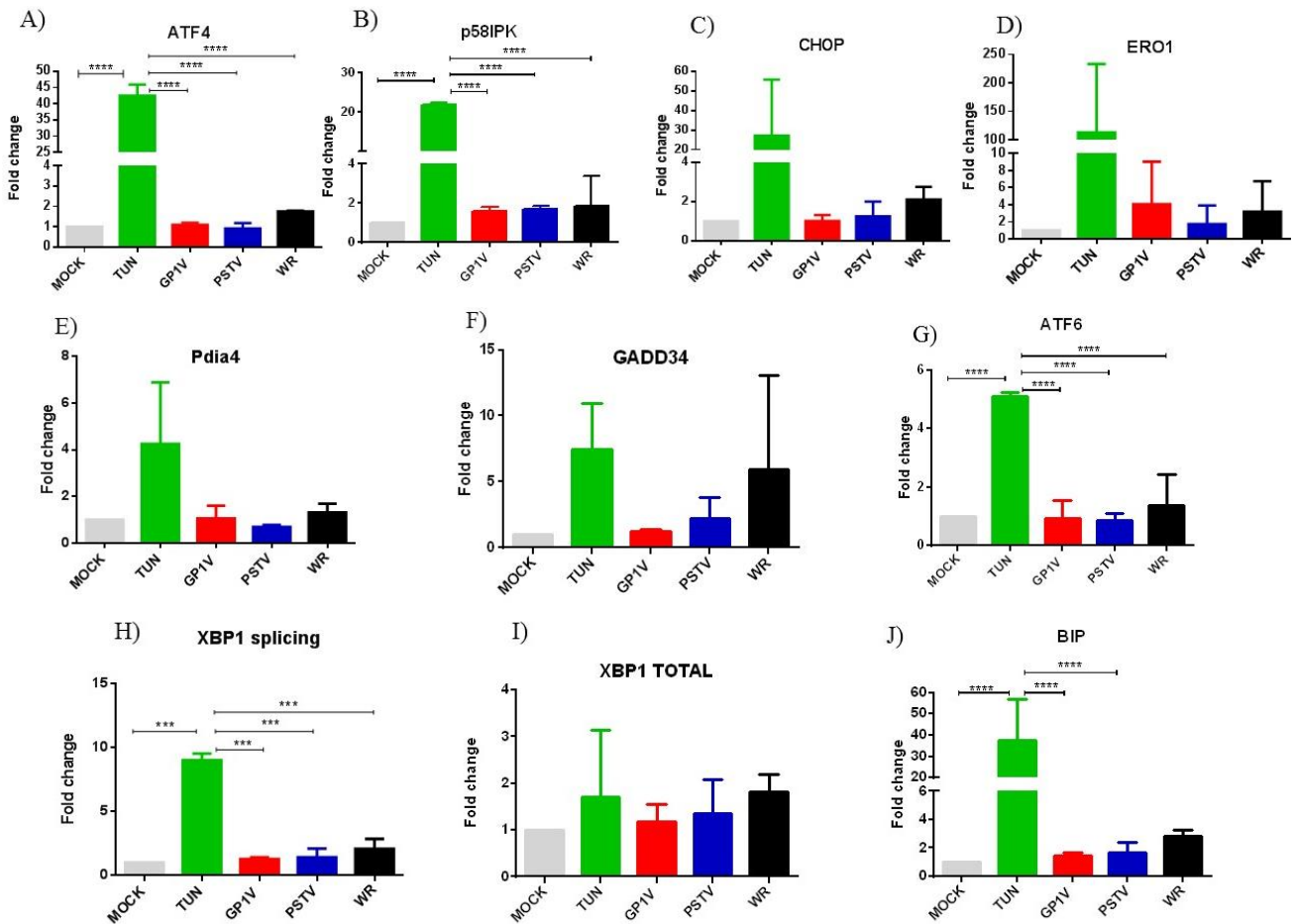


Figure 8 - Graphical representation of UPR gene expression in virus-infected MEFS A31 GP1V, PSTV, and WR assessed by quantitative PCR assays (qPCR). QRT-PCR assay performed on a total extract of uninfected (mock) or GP1V, PSTV and WR virus A31 cells for 24 hours. The assays were performed in biological duplicate, with MOI of 10 and stress control, tunicamycin. With primers specific for (A) *ATF4*, (B) *p58IPK*, (C) *CHOP*, (D) *ERO1*, (E) *Pdia4*, (F) *GADD34*, (G) *ATF6*, (H) *Xbp1 splicing*, (I) *Total Xbp1* (J) *Bip*. The $2^{-\Delta\Delta Ct}$ values are represented by bars and demonstrate the number of times the gene of interest is expressed after normalization with the reference constitutive genes, *RPL32*, *Beta-actin*. Statistical analyses were performed using the ORDINARY ONE-WAY ANOVA Tukey's multiple comparisons test: * P < 0.05 ** P < 0.01 *** P < 0.001 **** P < 0.0001

DISCUSSION

The multiplication of poxviruses is closely related to the endoplasmic reticulum. Viral factories produced during poxvirus replication are surrounded by RE membranes, this conformation is necessary for efficient viral DNA replication (TOLONEN *et al.*, 2001; MOSS;

2013). *Poxvirus* replicative success is dependent on its ability to block, evade or subvert essential elements of the immune response and cellular. Poxvirus multiplication is connected to the endoplasmic reticulum (ER) and their membranes envelop the viral factories produced during replication (SMITH & KOTWAL, 2002; JOHNSTON & MCFADDEN, 2003; SEET *et al.*, 2003).

The ATF6 transcription factor is often activated during viral infections, and this mechanism may favor viral replication. Several studies have shown that ATF6 activation is beneficial for viral yield, leading to expression of XBP1 mRNA, an important action that may lead to activation of chaperones or to act by preventing PERK activation and thus global protein attenuation (GALINDO, HERNÁEZ, *et al.*, 2012; AMBROSE & MACKENZIE, 2013; SONG, CHI, *et al.*, 2019). In the one-step growth and multi-step growth curves, it was not possible to observe significant differences in the productivity of GP1V, PSTV and WR viruses in ATF6-WT cells compared to ATF6-KO cells. However, in the VACV-Br plaque phenotype assays, it is possible to observe smaller lysis plaques in ATF6-KO cells compared to lysis plaques formed in the ATF6-WT cell monolayer. Activation of the ATF6 axis of the UPR pathway results from its translocation to the cell nucleus where it presents transcriptional activity. ATF6 translocation to the nucleus was observed by fluorescence microscopy (EVOS FL image system) in A31 cells transfected and infected with GP1V, PSTV, and WR viruses. The mock control, unlike infected cells, does not present fluorescence in the cell nucleus, demonstrating that ATF6 translocation did not occur. Analysis of the transcriptional activity of ATF6 showed, compared to the positive control tunicamycin, activation of ATF6 by all VACV-Br. GP1V infection has higher transcriptional activity than the positive control, PSTV infection also has ATF6 transcriptional activity, presenting a lower profile than GP1V. The WR virus, in turn, has a profile similar to GP1V. Quantification of ATF6-GFP positive nuclei showed us a profile similar to the evaluation of ATF6 transcriptional activity. The cells transfected and infected with GP1V and WR have a higher percentage of positive nuclei when compared to the tunicamycin control, PSTV has a similar profile to the positive tunicamycin control.

Inositol-dependent kinase protein is the most studied UPR pathway axis and several viruses can modulate this axis in different ways. IRE1 has a kinase domain and an endonuclease that removes 26 nucleotides from XBP1 mRNA. XBP1 mRNA processing was observed during WNVKUN and CMV virus infection, it was reported that this activation would be advantageous to viral infection by stimulating chaperones that can give viral proteins the correct conformation (ISLER, SKALET & ALWINE, 2005; AMBROSE & MACKENZIE, 2013). On the other hand, many viruses such as HCV, HSV-1, HRV, and ASFV modulate XBP1 processing to block for example degradation by ERAD and ER-degradation enhancing-a-mannosidase-like protein 1 (TARDIF), MORI, *et al.*, 2004; GALINDO, HERNÁEZ, *et al.*, 2012; SU, WANG, *et al.*, 2017; SONG, CHI, *et al.*, 2019). We verified the levels of processed XBP1 after GP1V, PSTV and WR

virus infection by PCR-RFLP and densitometry. Processed XBP1 levels reach almost 100% in tunicamycin treated cells. In contrast, levels of XBP1 in cells infected with VACV-Br are not significantly altered, suggesting that infection by these viruses negatively modulates XBP1 processing. XBP1 processing plays a role in immunity mechanisms, being important for macrophage cytokine production (MARTINON, CHEN, *et al.*, 2010; LEÃO & DA FONSECA, 2014). Also, VACVs interfere with signaling of toll-like receptors (TLR) which in turn can activate XBP1. Data from the research group showed that VACV negatively modulates macrophage production (SILVA GOMES *et al.*, 2011; CHINALIA; 2012). To determine the effect of IRE1 Rnase and kinase activity, we used 4μ8C and KIRA6 inhibitors on A31 cells infected with GP1V, PSTV, and WR viruses. Both IRE1 domains were handled differently in HSV-1 virus infection, this herpes virus was able to inactivate the Rnase domain and activate kinase to increase viral replication and avoid the negative consequences of XBP1 (SU) activation. *et al.*, 2017). Treatment with the drug 4u8C showed no difference in the size of GP1V, PSTV and WR virus lysis plate when compared to untreated control. Surprisingly it was observed that treatment with the kinase domain inhibitor drug KIRA6 reduced the size of the lysis plate when compared to untreated cells. Demonstrating the importance of the kinase domain for the VACV-Br and the irrelevance of the IRE1 protein RNase domain.

When activated PERK oligomerizes and is activated via trans-autophosphorylation, activated it can recognize and activate eIF2α. EIF2α phosphorylation leads to overall protein attenuation which may disadvantage some viruses. Transmissible gastroenteritis virus (TGEV) PERK activation negatively regulates TGVE replication by inhibiting IκBα over NF-Kb. WNVKUN virus infection inhibits PERK signaling through activation of ATF6 / IRE1, thus preventing global attenuation of proteins (AMBROSE & MACKENZIE, 2013; XUE, FU, *et al.*, 2018). The infectivity assays performed on MEF-WT and PERK-KO cells show an increase in GP1V virus productivity of approximately 1log in MEF-WT cells when compared to PERK-KO within 6 hours. For PSTV viruses, it is also possible to observe an increase in viral productivity in MEF-WT cells compared to PERK-KO also at 6 hours. In the other time intervals, we did not observe differences in viral productivity for all viruses analyzed. The plaque phenotype demonstrated differently from the one-step curve that in PERK-KO cells the yield of GP1V, PSTV and WR viruses is higher than in MEF-WT cells. It was possible to observe by microscopy images that the MEF-WT cell monolayer is attached to the plate. Unlike MEF-WT cells, the PERK-KO cell monolayer is loose within this time. Apparently, infection by these viruses causes greater cell death in PERK-KO.

Chaperone BiP plays an important role in monitoring the UPR path by turning off or on the IRE1, ATF6 and PERK sensors. Also Bip can prevent cell death by interfering with CHOP expression (LYOO, PARK, *et al.*, 2015). We verified the influence of BiP on the productivity of GP1V, PSTV and WR viruses by infectivity assays in the presence of BiP inhibitor (HA15). One-

step curves in the presence of the HA15 inhibitor showed that the multiplication of these viruses appears unaffected by the lack of BiP. Given this result, we decided to observe the phenotype of VACV-Br lysis plates in the presence of HA15. Interestingly, the plaque phenotype showed a reduction in lysis plate size of the three viruses when cells were treated with HA15 inhibitor. Showing in this experiment the importance of BiP for infection of the evaluated VACV.

Expression analysis of ER stress-responsive genes compared to transcripts using the delta Ct method showed that expression levels of transcription factor 4 (ATF4) do not increase in cells infected with GP1V, PSTV and WR virus when compared to uninfected or tunicamycin-treated cells. Co-chaperone p58IPK is up-regulated by the transcription factor ATF6 and by IRE1-XBP1. P58IPK expression levels did not increase in infected cells when compared to uninfected control. The CHOP transcription factor can be induced by ATF6 and PERK when these UPR path axes are activated. We did not observe a significant increase in CHOP mRNA expression in cells infected with all three viruses compared to cell control. CHOP in turn induces the expression of RE oxidoreductase, ERO1a, which can lead to protein folding or even make the RE lumen a highly oxidized environment by activating pro-apoptotic pathways. There was no significant increase in expression of ERO1 levels in cells infected with all three viruses compared to cell control. Expression levels of protein disulfide isomerase, responsible for aiding protein folding, did not increase in cells infected with GP1V, PSTV and WR viruses when compared to cell control. GADD34 protein expression, which acts in the restoration of protein synthesis and cellular homeostasis, was analyzed. Cells infected with WR virus show increased expression of GADD34 protein, however this was not observed in GP1V and PSTV virus infection. Surprisingly, ATF6 transcription factor expression levels did not increase in cells infected with GP1V, PSTV, and WR viruses as compared to cell control. In line with PCR-RFLP assays, expression levels of processed XBP1 do not increase relative to uninfected cell control. Tunicamycin-treated cells were significant compared to cells infected with GP1V, PSTV and WR viruses. Total XBP1 expression levels in cells infected with different viruses showed no significant increase about cell control and positive control. Chaperone BiP is responsible for activating the axes of the UPR path when it is dissociated from them. We observed no increase in expression levels of this chaperone in cells infected with all three viruses relative to cell control.

In summary, we have shown that the ATF6 sensor appears to be important for VACV replication. The kinase domain of the XBP1 sensor, play an important role in the productivity of GP1V, PSTV and WR, in contrast to the RNase domain showed no relevance for productivity. GP1V, PSTV and WR viruses multiplied efficiently in cells deficient for the PERK sensor.

MATERIALS AND METHODS

Cells, viruses and infection conditions

Cells BSC40 (ATCC CRL-2761), BALB/3T3 clone A31 (ATCC CCL-163), PERK-WT (ATCC CRL-2977), PERK-KO-DR (ATCC CRL-2976), immortalized ATF6 knockout mouse embryonic fibroblasts (MEFs) and ATF6-WT cell control, (a kind gift of Randall Kaufman – LEE at al. 2002), were grown under standard conditions in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 2mM L-glutamine, 0.1 mM Non-Essential Amino Acids (NEAA), 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 100 units/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin in a humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37°C.

The VACV PSTV isolate was obtained in 2003 in the city of Passa Tempo, Minas Gérias, during an outbreak of zoonotic infection by Leite *et al.* (2005). The isolate GP1V was obtained from Trindade and collaborators (2006) in 2001 in the city of Guarani, Minas Gerais, Brazil. From then on, the samples are routinely cultivated, purified and titrated at the Virus Laboratory of the Federal University of Minas Gerais, Department of Microbiology, Institute of Biological Sciences (ICB), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil and were kindly provided by Prof^a. Dr. Erna Geessien Kroon. VACV-WR was kindly provided by Dr. Bernard Moss (NIAID / NIH, Bethesda, USA) and applied as a standard sample in the experiments.

All VACV infections in MEF cells were performed at the MOI (multiplicity of infection) 10, 0,01 ou PFU in the absence of FBS for 1 h and cultured in DMEM 2,5% FBS after unabsorbed virus was removed.

Characterization of reporter gene expression

The day before transfection, A31 cells were seeded in 24-well plates (1 x 10⁵ cells/well) in 10% FBS DMEM. Cells were co-transfected with 200 ng of p5xATF6-GL3 (a generous gift from Dr. Ron Prywes, Department of Molecular Genetics, Kumamoto University, Japan) (WANG, Y. *et al.* 2000) and 50 ng of pRL-TK (Promega), using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the protocol provided by the manufacturer. Transfected cells were infected with GP1V, PSTV and WR virus at MOI 10 or treated with 2.5 µM Tunicamycin (Sigma). After indicated hours post-infection (h.p.i) the growth medium was removed, the cells were rinsed with PBS 1x and were lysed by shaking for 15 min on ice with 100 µl of Passive Lysis Reagent (Promega, Madison, WI). Twenty microliters of each cell lysate were assayed for firefly and renilla luciferase activities using a LumiCount Microplate Reader Luminometer (Packard BioSciences) and Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) according to the protocol

provided by the manufacturer. The results were expressed as the ratio of the activities of firefly luciferase/renilla luciferase (RLA, Relative Luciferase Activity).

Characterization of nuclear translocation of reporter gene

The day before transfection, A31 cells were seeded in 24-well plates. Cells were transfected with 600 ng of pShortCMV-ATF6-GFP, a kind gift from Kazutoshi Mori (Kyoto University, Japan) (NADANAKA, S. *et al.* 2004), as previously described. Cells were, then, infected GP1V, PSTV and WR virus with or treated with tunicamycin for 24 h and reporter gene expression and localization was assessed by fluorescent microscopy using EVOS FL cell imaging system (Life Technologies). To quantify nuclear translocation of reporter gene, we isolated the nucleus from transfected and infected cells in ice-cold nuclear isolation buffer (320mM sucrose, 5mM MgCl₂, 10mM HEPES and Triton X-100 pH 7,4). We further verified nuclear integrity by trypan stain and then count GFP positive nuclei by flow cytometry in BD FACScan cytometer.

RNA Extraction and cDNA Synthesis

Total RNA was extracted from cells using TRI Reagent (Sigma) according to the manufacturer's instructions and treated with DNase I (MACHEREY-NAGEL) before reverse transcription to remove residual genomic DNA contamination. Extracted RNA was dissolved in diethylpyrocarbonate (DEPC)-treated water, and the RNA concentration and purity were estimated on NanoVue Plus Spectrophotometer (GE Healthcare Life Sciences). Aliquots of RNA samples were subjected to electrophoresis in a 1 % denaturing agarose gel containing ethidium-bromide staining to verify their integrity. The cDNA was synthesized from 1 µg RNA in a final reaction volume of 20 µl, using Moloney murine leukemia virus (MMLV) reverse transcriptase and random primers (Promega) according to the manufacturer's protocol. The reverse transcription product was stored at -20 °C.

Measurement of XBP1 splicing by agarose gel electrophoresis

One-tenth of cDNAs volume was used per reaction for PCR in a 25-µl reaction volume using GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega) according to the manufacturer's instructions. The cycling conditions were 94°C for 4 min, followed by 30 cycles of 94°C for 30 s, 68°C for 30 s, and 72°C for 30 s. For detection of XBP1 isoforms (spliced and unspliced), the sense primer mXBP1.3S (5'-AAACAGAGTAGCAGCGCAGACTGC-3') and the antisense primer mXBP1.2AS: (5'-GGATCTCTAAACTAGAGGCTTGGTG-3') were used to amplify a 600-bp cDNA product encompassing the IRE1 cleavage sites (CALFON *et al.* 2002). This fragment was further

digested by PstI (Promega) to reveal a restriction site that is lost after IRE1-mediated splicing of the mRNA. The amplicon fragments were resolved on a 1,4% agarose gel containing ethidium-bromide (Life Technologies). The gels were imaged using a UVP MultiDoc-It Imaging System. Bands were quantified using ImageJ (NIH). Percent splicing was calculated as the amount of XBP1s as a percentage of total XBP1.

Quantitative Real-time PCR

cDNA was used to determine the levels of ATF4, ATF6, GADD34, p58IPK, ERO1, Pdia4, Bip, Chop, Xbp1 processed and total mRNA by quantitative PCR, SYBR Green Master Mix (Applied Biosystem) and water in 10 μ L final volume reactions. Reactions were performed in the StepOnePlus instrument (Applied Biosystem). All primers used in this study are listed in Table 1. Relative gene expression analyses were performed using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (LIVAK, 2001) and normalized to the expression of RPL32, B-actin, and mRNA (VANDESOMPELE, J. *et al.*, 2002). The primers used for the qPCR were as follows:

<i>BIP/GRP78 - F</i>	TGGTATTCTCCGAGTGACAGC
<i>BIP/GRP78 - R</i>	AGTCTTCAATGTCCGCATCC
<i>Pdia4 - F</i>	TCCCATTGCTGTAGCGAAGAT
<i>Pdia4 - R</i>	GGGGTAGCCACTCACATCAAAT
<i>p58^{ipk} - F</i>	GGCGCTGAGTGTGGAGTAAAT
<i>p58^{ipk} - R</i>	GCGTGAAACTGTGATAAGGCG
<i>Xbp1 total - F</i>	AAGAACACGCTTGGGAATGG
<i>Xbp1 total - R</i>	ACTCCCCTTGGCCTCCAC
<i>XBPI spliced - F</i>	GAGTCCGCAGCAGGTG
<i>XBPI spliced - R</i>	GTGTCAGAGTCCATGGGA
<i>ATF4 - F</i>	ATGGCCGGCTATGGATGAT
<i>ATF4 - R</i>	CGAAGTCAAACCTTTTCAGATCCATT
<i>ATF6 - F</i>	ACTGACTGACTGACTGACTGACTG
<i>ATF6 - R</i>	ACTGACTGACTGACTGACTGACTG
<i>GADD34 - F</i>	ACCATGACTCAGTGCTGTGAC
<i>GADD34 - R</i>	CGCAGCTTCTATCTGATCTGC
<i>ERO1 - F</i>	ACCCTGAGCTTCTCTCAAGT
<i>ERO1 - R</i>	AAAGGACATGGTCGTTTCAGATT
<i>CHOP - F</i>	TGCAGTCATGGCAGCTGAGTC
<i>CHOP - R</i>	TAGAACTCTGACTGGAATCTG
<i>RPL32 - F</i>	GCTGCCATCTGTTTTACGG
<i>RPL32 - R</i>	TGACTGGTGCCTGATGAACT
<i>BETA-ACTINA - F</i>	GGCTGTATCCCCCTCCATCG
<i>BETA-ACTINA - R</i>	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT

Viral infectivity assays

ATF6 knockout, ATF6-WT, PERK-KO e MEF-WT cells and the respective wild type control cell were grown to a density of 5×10^5 cells (one step grown) ou 3×10^5 cells (multi step grown) per well on a 6-well culture dish and then infected with GP1V, PSTV or WR. Infections were carried out at a MOI of 10 for 3, 6, 12, 24 and 48 h (one step grown) or for 24, 48, 72 and 96 (multi step grown). The infected monolayers were then harvested and titrated in BSC-40 cells. GP1V, PSTV or WR plaque phenotype assays were carried out in parallel, in ATF6 knockout, ATF6-WT, PERK-KO e MEF-WT cells at 50 PFU and incubated for 48 h.

REFERENCES

AMBROSE, L.; MACKENZIE, J. M. ATF6 Signaling Is Required for Efficient West Nile Virus Replication by Promoting Cell Survival and Inhibition of Innate Immune Responses. *Journal of Virology*, Melbourne, v. 87, p. 2206–2214, February 2013.

CHINALIA, L.. Caracterização e comparação da resposta imune de camundongos Balb/c durante a infecção aguda pelos isolados zoonóticos Vaccinia vírus Guarani P1 (GP1) e Passatempo (PST). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, p. 1-114, March 2013

GALINDO, *et al.* The ATF6 branch of unfolded protein response and apoptosis are activated to promote African swine fever virus infection. *Cell Death and Disease*, Madri, n. 341, p. 1-10, July 2012.

HUSSAIN, S. G.; RAMAIAH, K. V. A. Endoplasmic reticulum: Stress, signalling and apoptosis. *CURRENT SCIENCE*, v. 93, p. 1684-1696, 2007.

ISLER, A.; SKALET, H.; ALWINE, C. Human Cytomegalovirus Infection Activates and Regulates the Unfolded Protein Response. *JOURNAL OF VIROLOGY*, Filadélfia, v. 79, p. 6890-6899, June 2005

JOHNSTON, J. B.; GRANT MCFADDEN. Poxvirus Immunomodulatory Strategies: Current Perspectives. *Journal of virology*, v. 77, p. 6093–6100, June 2003.

LEÃO, T.; DA FONSECA, G. Subversion of cellular stress responses by poxviruses. *World Journal of Clinical Infectious Diseases*, Belo Horizonte, p. 27-40, November, 2014.

LEITE, A. *et al.* Passatempo Virus, a Vaccinia Virus Strain, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, v. 11, p. 1935-1938, 2005.

LI, J. *et al.* The unfolded protein response regulator GRP78/BiP is required for endoplasmic reticulum integrity and stress-induced autophagy in mammalian cells. *Cell Death Differ*, p. 1460–1471, September, 2008.

LYOO, *et al.* Constant up-regulation of BiP/GRP78 expression prevents virus-induced apoptosis in BHK-21 cells with Japanese encephalitis virus persistent infection. *Virology Journal*, Seoul, p. 1-8, 2015

MARCINIAK, S. J.; DAVID RON. Endoplasmic reticulum stress signaling in disease. *Physiol Rev.*, v. 86, p. 1133-49. October, 2006.

MARTINON, F. *et al.* Toll-like receptor activation of XBP1 regulates innate immune responses in macrophages. *Nat Immunol*, Boston, p. 1-20, May 2010.

MOSS, B. Poxvirus DNA Replication. *Cold Spring Harbor Perspectives Biology*, p.1-12, September 2013.

NADANAKA S, YOSHIDA H, KANO F, MURATA M, MORI K. Activation of mammalian unfolded protein response is compatible with the quality control system operating in the endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell*. 2004.

RUTKOWSKI, D. T.; KAUFMAN, R. J. A trip to the ER: coping with stress. *Trends Cell Biol*, v. 14, p. 20-28, 2004.

SCHMIDT, I.; BLECK, C. K. E.; MERCER,. Poxvirus host cell entry. Elsevier, p. 20–27, 2012.

SEET, B. T. *et al.* POXVIRUSES AND IMMUNE EVASION. *Annu. Rev. Immunol*, p. 377–423, January 2003.

SILVA GOMES, J.A; *et al.* Immune modulation in primary vaccinia virus zoonotic human infections. *Clin Dev Immunol* 2011, 2012

SONG, J. *et al.* Non-Structural Protein 2B of Human Rhinovirus 16 Activates Both PERK and ATF6 Rather Than IRE1 to Trigger ER Stress. *Viruses*, Beijing, v. 11, n. 133, p. 1-17, January 2019.

SU, A. *et al.* Opposite Roles of RNase and Kinase Activities of Inositol-Requiring Enzyme 1 (IRE1) on HSV-1 Replication. *Viruses*, Nanjing, v. 9, p. 1-17, August 2017.

TARDIF, D. *et al.* Hepatitis C Virus Suppresses the IRE1-XBP1 Pathway of the Unfolded Protein Response. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, Denver, v. 279, p. 17158–17164, February 2004.

TOLONEN, *et al.* Vaccinia Virus DNA Replication Occurs in Endoplasmic Reticulum-enclosed Cytoplasmic Mini-Nuclei. *Molecular Biology of the Cell*, p. 2031–2046, July, 2001.

TRINDADE, *et al.* Isolation of two *Vaccinia virus* strains from a single bovine vaccinia outbreak in rural area from Brasil: Implications on the emergence of zoonotic orthopoxviruses. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, p. 486– 490, 2006

XUE, M. *et al.* The PERK Arm of the Unfolded Protein Response Negatively Regulates Transmissible Gastroenteritis Virus Replication by Suppressing Protein Translation and Promoting Type I Interferon Production. *Journal of Virology*, Harbin, v. 92, p. 1-21, August 2018.

XU, R. *et al.* Cellular and Humoral Immunity against Vaccinia Virus Infection of Mice. *The Journal of Immunology*, p. 6265-6271. March, 2004.

VANDESOMPELE, J. *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology, Ghent*, v. 3, June 2002.