

Anna Carolina Toledo da Cunha Pereira

“Aspectos da interação entre *Vaccinia virus* e célula hospedeira: significado funcional desempenhado pelas MAPKs JNK e ERK na biologia viral.”

Orientador: Cláudio Antônio Bonjardim

Belo Horizonte, Fevereiro de 2007.

Anna Carolina Toledo da Cunha Pereira

“Aspectos da interação entre *Vaccinia virus* e célula hospedeira: significado funcional desempenhado pelas MAPKs JNK e ERK na biologia viral.”

Orientador: Cláudio Antônio Bonjardim

Tese de doutorado apresentada ao curso de Pós-Graduação do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Microbiologia.

Trabalho realizado no Laboratório de Vírus – Grupo de Transdução de Sinal – ICB - UFMG

Belo Horizonte, Fevereiro de 2007

**“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa,
nunca tem medo e nunca se arrepende.”**

Leonardo da Vinci

Agradecimentos

Ao Dr. Cláudio Bonjardim agradeço por todos estes anos de convívio, pela enorme contribuição no meu crescimento profissional me ensinando a desenvolver a visão crítica da ciência. Por ter estado sempre aberto para ouvir as minhas opiniões, com respeito, mesmo quando não concordávamos. Por me animar naqueles frustrantes dias que nada dava certo. Por toda a animação que transparecia a cada resultado positivo. Obrigada pela sua orientação! Agradeço também ao “tio Claudin” pela confiança, pelo carinho e pela amizade. Muito obrigada!

À Dra. Erna Geessien Kroon e Dr. Paulo César Peregrino Ferreira pelo apoio sempre que precisei do auxílio de vocês, pela amizade e agradável convivência de todos estes anos.

À querida Flávia, pessoa linda, ou como ela mesmo diz: “lindinha”. Obrigada Flavinha por ser colaboradora deste trabalho, por toda ajuda, mas principalmente pela sua amizade, que é um presente especial que recebi nestes últimos anos. Você é um sucesso e vai longe. Te adoro! Obrigada.

Ao Bruno Brasil, o “Brunin”, pela colaboração neste trabalho, pelas várias sugestões e discussões. Muito obrigada pelo carinho e atenção todos estes anos.

Ao Prof. Mauro Martins Teixeira pela disponibilidade do seu laboratório para a realização dos experimentos de ELISA e pela discussão e sugestões. Especialmente ao Rafael pela sua enorme disponibilidade e paciência em me auxiliar. Muito obrigada.

À Dra. Catherine Ropert e ao Dr. Flávio G. Fonseca pelas sugestões e críticas no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Anderson A Andrade, que quando conheci era um aluno de mestrado me ensinando os primeiros passos no laboratório. Hoje tenho a honra em tê-lo na minha banca. Muito obrigada por tudo que me ensinou e pela sua amizade.

Ao Dr. José Carlos, ou melhor, ao Zezinho, que também muito me ensinou nos primeiros anos de laboratório. Querido amigo, obrigada por tudo, em especial pela revisão deste trabalho.

Ao João Marques por sua amizade que mesmo à distância sempre esteve presente.

Ao João Rodrigues, John do coração, por ser tão fofo, amigo, divertido, prestativo e muito mais coisas boas. É impossível ficar triste ao seu lado, John porque você sempre faz a gente sorrir. Obrigada!

À Tia Ângela, por sua ajuda fundamental, calma e paciência em resolver as pendengas do laboratório.

À Ildinha, fofa, e à Andrezza, que fazem o trabalho delas com todo carinho para que tudo dê certo no nosso.

À Bernadete querida, no bom lugar que está, por ter me ensinado a pegar na pipeta para repicar aquela primeira garrafinha de VERO, mas principalmente pelas lições de vida que me deixou.

Ao Douglas, e antes dele, à Maria Cristina, pela atenção e presteza dispensadas junto à Secretaria de Pós-Graduação em Microbiologia.

Aos GTS, em geral, que formam um verdadeiro grupo de trabalho, onde todos se ajudam. Pela agradável convivência, pela ajuda, discussões, pelas comemorações. Desejo sucesso a todos. Muito obrigada!

À Ana Paula, pela amizade e convivência alegre nestes anos. Muito sucesso no seu caminho. À Jamária "Crazy girl", por me divertir e por sua amizade e ajuda. À Lu Garcia, tão meiga, sempre disponível. Obrigada Xuxu! Ao Marcelo, Leonardo, Alice, Débora, pela amizade e agradável companhia.

A Dra. Patrícia, querida Patty, pela ajuda, carinho e amizade em todos momentos.

À Dr. Lirlândia, que me deu muita força, me ajudou muito, por sua amizade, atenção e conselhos. Valeu demais Landica!

À Leandra, fofura, por seu carinho e amizade. Você é muito especial.

A cada colega do laboratório de vírus, aos que aqui estão e aos que já se foram. Gostaria de contar cada momento que recordo com cada um de vocês, desde discussões científicas a brincadeiras e momentos de descontração. Seriam necessárias muitas páginas para dizer a cada um o quanto são especiais e o quanto

sou grata por todos estes momentos. Muito obrigada a vocês: Jaqueline G., Betânia, Giliane, Leandra, Marieta, Graciela, Alessandra, Jaqueline M., Isabel, Geraldo, Cíntia, Kátia, Gisele, Ana Paula, Lu Bessa, Ana Celi, Jônatas, Carla, Cristiane, Leoneide, Leonardo. Aos meninos do lab. 4, ou 4ª série B (afinal vocês passaram de ano!), que apesar de toda a bagunça, alegam e divertem o ambiente: Bruno Quelé, Bruno Brasil, Gabriel, Marcelo, Daniel, Danilo, Tiago, Bráulio e Ruiz.

Aos meus queridos amigos, Felipe e Daniela – os pais da fofa Ana Clara, pela especial amizade que cultivamos e que continua forte e viva mesmo à distância. Valeu pela força queridos!

Ao meus amigos do coração. Breno, com quem compartilho estes dias estressantes. Por sua amizade sincera, auxílio, seu carinho e atenção. À querida Juju, por sua amizade verdadeira, agora um pouco mais distante mas com a mesma fidelidade e carinho de sempre. Adoro vocês.

À minha querida turma, os “bioufmg2000”, que estão sempre perto mesmo estando longe. A amizade que construímos supera distâncias e barreiras e todas as vezes que estamos juntos é como se tivéssemos nos visto ontem. Obrigada a todos pela torcida e pela força. Beijos especiais para Kinha, Gi e Nana.

À minha família maravilhosa que está sempre me apoiando. Obrigada aos meus tios e primos. Em especial à minha madrinha, tia São, tia Marilda, tio Márcio e Fernando que sempre acompanham e torcem com carinho. Muito obrigada lindos!

Aos meus sogrinhos do coração, Mimi e Dedé, que mesmo de longe torcem tanto por mim e me fazem sentir tão querida. Muito obrigada!

Por chegar até aqui, pelas pessoas na minha, agradeço a Deus. Obrigada por tudo, Pai!

Gustavo, meu amor, não tenho palavras suficientes para expressar a minha gratidão a você. Porque você não é simplesmente o meu noivo. Você é muito mais que isto, é um
companheiro inigualável.

Dividiu comigo todos estes dias, literalmente, de segunda a segunda, durante estes quatro anos. Os momentos bons, as etapas vencidas, juntos comemoramos. Mas foi você quem esteve ao meu lado nos momentos difíceis. Quando eu estava desanimada, aflita e triste, você me dava força e ânimo para continuar. É por isto e muito mais que dedico, com muito carinho, este trabalho a você.

Eu te amo bife!

Muito obrigada por tudo.

Mãe, sei que sempre foi difícil entender o que tanto esta sua filha faz neste laboratório. Pra você sempre foi muito tempo estudando, muita célula, muito vírus, muitos finais de semana perdidos. E sei que você, mesmo sem entender nada, torce, sofre e reza pra dar tudo certo. Agora mãe, este ciclo se fecha para abrir-se a outros e sei que estará, como sempre, torcendo por mim.

Obrigada mãe por acolher e realizar este sonho junto comigo.

Este trabalho, dedico a você.

Eu amo você linda!

Pai, sei que mesmo de longe você sempre torce por mim. Obrigada pelo seu carinho e pelo seu conselho, que eu sempre recordo e faço de tudo para seguir. Te amo pai.

À minha **irmã, Anna Cristina**, pelo carinho e pela torcida. Por me ajudar a exercer o dom da paciência. Como todo irmão, a gente briga mas o que mais marca a nossa convivência é o grande amor que temos uma pela outra. Te amo querida. Obrigada pela força.

Ao meu “**irmão**” **Hilton**, por ser tudo de bom que é! Por ser o melhor irmão que o destino poderia ter me dado. Muito obrigada pela sua torcida, pelo carinho pela nossa “rimandade”. Te amo!

À **vovó** mais linda do mundo, a minha **D. Lia**, que tanto reza e faz novena por esta neta. Vovó, obrigada por todo este amor que você me dá todos os dia.
Te amo fofa!

ÍNDICE

ABREVIATURAS.....	x
TABELAS E FIGURAS.....	xii
RESUMO.....	xiv
ABSTRACT.. ..	xvi
1 - - JUSTIFICATIVA.....	1
2- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
2.1 - - Família Poxviridae	6
2.2 -- O Vaccinia virus.....	8
2.2.1 - – Morfologia	8
2.2.2 - Genoma	9
2.2.3 - Ciclo de multiplicação dos poxvírus	12
2.3 - Interação Vaccinia virus-hospedeiro.....	19
2.4 - Proteínas Quinases Ativadas por Mitógeno (MAPK)	24
2.4.1 - Map Quinase c-Jun Terminal (JNK/SAPK)	27
2.4.2 - Quinase Regulada por Sinal Extracelular – ERK	33
2.5 - Fator de transcrição c-Jun.....	37
2.6 - Papel das MAPKs na Infecção viral.....	38
3 - OBJETIVOS	41
3.1 – Objetivo geral.....	42
3.2 – Objetivos específicos	42
4 - MATERIAIS E MÉTODOS	43
4.1 - Células.....	44
4.1.1 - Células VERO	44
4.1.2 - BSC-40	44
4.1.3 - Células A31	44
4.1.4 - Células MEF WT, MEF JNK ^{-/-} , MEF MKK4 ^{-/-} , MEF MKK7 ^{-/-} e MEF MKK4/7 ^{-/-}	45
4.2 - Vaccinia virus	45
4.3 - Multiplicação e purificação do Vaccinia virus.....	46
4.4 - Titulação dos Vaccinia virus	47
4.5 - Plasmídios	47
4.6 - Anticorpos e drogas.....	47

4.7 - Transferência de “Western”	48
4.8 - Extratos protéicos nucleares	49
4.9 - Análise das interações DNA/Proteínas.....	50
Ensaio do retardamento da mobilidade eletroforética.....	50
4.10 - Extração do RNA celular total.....	51
4.11 - Fracionamento eletroforético dos RNAs - (Sambrook et al, 1989)	51
4.12 - Transferência de “Northern” (Sambrook et al., 1989)	52
4.13 - Oligonucleotídeos AP-1, NF- κ B e CRE	52
4.14 - Pareamento e marcação dos oligonucleotídeos sintéticos	53
4.15 - Quantificação do DNA viral – Ensaio de “dot blot”	54
4.16 - Isolamento do DNA viral (Esposito & Knight, 1985)	55
4.17 - Curva de Multiplicação do Vaccinia virus	55
4.18 - Extração de DNA plasmidial	56
4.19 - Ensaio de Fenótipo de Placa de Lise Viral	56
4.20 – Ensaio de titulação das formas virais EEVs.....	57
4.21 – ELISA.....	57
5 - RESULTADOS.....	59
6 - DISCUSSÃO	106
7 – CONCLUSÕES	122
8 – PERSPECTIVAS.....	125
9 – BIBLIOGRAFIA	127

Abreviaturas

µg: microgramas

µl: microlitros

AP-1: Proteína ativadora transcricional-1

Ara C: Citosina Arabinosídeo

ATF: Fator de ativação transcricional

BSA: Albumina bovina sérica

CEV: Vírus envelopado associado à célula

CPXV: *Cowpox virus*

CRE: Elemento de resposta ao cAMP

CREB: Proteína de ligação ao CRE

DMEM: Meio mínimo essencial de Eagle modificado por Dulbecco

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DTT: Ditioneitol

EDTA: Ácido etilenodiaminotetracético

EEV: Vírus envelopado extracelular

EGF: Fator de crescimento epidérmico

EGR: Gene de resposta precoce ao crescimento celular

EMSA: Ensaio de retardamento da mobilidade eletroforética

ERK: Proteína quinase ativada por estímulo extracelular

GTP: Guanosina trifosfato

HIV: Vírus da imunodeficiência humana

hpi: Horas pós-infecção

HSV: Vírus herpes simples

IEV: Vírus envelopado intracelular

IFN: Interferon

IL: Interleucina

IMV: Vírus maduro intracelular

IRF: Fator regulador de interferon

ITR: Terminações invertidas e repetidas

IV: Partícula viral imatura

JNK: Proteína quinase que fosforila a porção N terminal da proteína JUN

kDa: Quilodalton

M: molar

MAPK: Proteína quinase ativada por mitógeno

MKP: Proteína fosfatase de MAPK

ml: mililitros

mM: milimolar

MNK: MAP quinase de interação com proteína quinase

MOI: Multiplicidade de infecção
MOPS: ácido morfolino propano sulfônico
mRNA: RNA mensageiro
NKT: Células Natural Killer T
nm: nanômetros
OMS: Organização Mundial de Saúde
PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida
pb: Pares de bases
PBS: Solução salina tamponada com fosfato
PFU: Unidade viral formadora de placa
PKC: Proteína quinase C
PMA: Éster de forbol
PMSF: Fenilmetilsulfonilfluoreto
RNA: ácido ribonucleico
SAPK: Proteína quinase ativada por estresse
SDS: Duodecil sulfato de sódio
SFB: Soro fetal bovino
TBP: Elemento de ligação ao TATA
TE: Tris-EDTA
TGF: Fator de crescimento transformante
TK: Timidina Kinase
TLR: “Toll like receptor” – Receptor do tipo Toll
TNF: Fator de necrose tumoral
TRE: Elemento de resposta ao TPA
UFP: Unidade formadora de placa
UV: Ultra violeta
VGf: Fator de crescimento do *Vaccinia virus*
VACV: Vírus vaccínia
WR: Western reserve
YY1: fator de transcrição Yin Yang1

TABELAS E FIGURAS

Tabela 1: Classificação da família Poxviridae (Fonte: ICTV/2002).....	7
Figura 1: Micrografia eletrônica e representação esquemática da partícula do <i>Vaccinia virus</i>	10
Figura 2: Ciclo de multiplicação dos Poxvírus	13
Figura 3: Via de morfogênese e saída do VACV.....	23
Figura 4: A formação dos filamentos de actina abaixo das partículas CEV.	25
Figura 5: Vias de sinalização das MAPKS	28
Figura 6: Cascata de Sinalização de JNK1/2/3	30
Figura 7: Cascata de Sinalização desencadeada por ERK1/2.....	35
Figura 8: Análise da participação do fator de crescimento do <i>Vaccinia virus</i> na fosforilação de JNK1/2 durante a infecção utilizando diferentes MOIs.....	62
Figura 9: A infecção pelo <i>Vaccinia virus</i> induz a fosforilação da SAPKK JNK1/2	64
Figura 10 : A infecção pelo <i>Vaccinia virus</i> induz a fosforilação da MAPK ERK1/2.....	66
Figura 11 : A Infecção pelo <i>Vaccinia virus</i> induz a fosforilação do fator de transcrição c-Jun.	68
Figura 12: A inibição da via de MEK/ERK1/2 por PD98059 abole a fosforilação de c-Jun em período precoce de infecção.	71
Figura 13: A inibição de JNK1/2 por SP600125 abole a fosforilação de c-Jun em período tardio de infecção.	72
Figura 14: A infecção pelo <i>Vaccinia virus</i> induz a formação de complexo AP-1- proteínas de forma dependente de ERK1/2.	76
Figura 15: A infecção pelo <i>Vaccinia virus</i> induz a formação de complexo CRE- proteínas de forma dependente de JNK1/2.....	77
Figura 16: Fosforilação de JNK1/2 em células nocautes para MKK4.....	80
Figura 17: Fosforilação de JNK1/2 em células nocautes para MKK7.....	81
Figura 18: JNK1/2 não é fosforilado em células nocautes para MKK4/7 ^{-/-}	82
Figura 19: A fosforilação de JNK1/2 durante a infecção viral não depende da expressão dos genes tardios virais.	84
Figura 20: Fosforilação de JNK em células infectadas com VACV B1R termo sensível.	86

Figura 21: O inibidor farmacológico SP600125 reduz sensivelmente a acumulação do RNA mensageiro precoce viral TK.	88
Figura 22: O uso do inibidor SP600125 diminui a replicação do DNA viral.	89
Figura 23: O inibidor farmacológico SP600125 reduz sensivelmente a tradução da proteína viral H3L	90
Figura 24: SP600125 inibe a multiplicação do VACV.....	92
Figura 25: A multiplicação do VACV não é afetada por JNK1/2.....	94
Figura 26: Efeito de SP600125 é exercido sobre outra via/proteína além de JNK1/2.	96
Figura 27: Fosforilação de c-Jun em células MEF WT.....	98
Figura 28: Fosforilação de c-Jun em células MEF JNK ^{-/-}	99
Figura 29: O fenótipo de placa de lise viral é menor quando a multiplicação é realizada em células JNK ^{-/-}	101
Figura 30: As células JNK ^{-/-} liberam mais formas infectivas EEV que as células selvagens.	103
Figura 31: JNK tem papel na indução de IL-6 durante a infecção viral.	105
Figura 32: Representação da ativação das MAPKs durante o ciclo de multiplicação do VACV.....	121

RESUMO

Os eventos de sinalização intracelular representam um papel fundamental na multiplicação viral. Nos últimos trabalhos, o grupo de transdução de sinal do laboratório de vírus mostrou que a ativação da proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) (ERK1/2) e seus substratos são essenciais para a multiplicação do *Vaccinia virus* (VACV) (Magalhães et al, 2001, Andrade et al, 2004, Silva et al, 2006). Neste trabalho nós analisamos a cinética de ativação das MAPKs ERK1/2, JNK1/2 durante a infecção pelo VACV, assim como a atuação destas quinases sobre fatores de transcrição alvos. Nossos resultados demonstram que ERK1/2 e JNK1/2 regulam temporalmente a ativação do fator de transcrição c-Jun. A atuação destas quinases sobre c-Jun leva à formação de complexos DNA-proteínas das seqüências AP-1 e CRE em momentos distintos da infecção viral. Neste trabalho, também caracterizamos a ativação de JNK1/2 durante a infecção viral. Observamos que a ativação de JNK1/2 é mediada pelas MAPKKs MKK4 e MKK7 e ainda que o fator de crescimento do VACV (VGF), embora envolvido, não é essencial para a ativação JNK1/2. Ainda, observamos que a proteína quinase viral B1R não é responsável pela ativação de JNK1/2 durante a infecção. Além disso, com intuito de determinar o papel de JNK1/2, utilizamos o inibidor SP600125, e observamos um profundo reflexo na expressão do gene viral da timidina quinase, na replicação do DNA viral, na expressão de proteína viral e na multiplicação do VACV. No entanto, este drástico efeito na multiplicação viral não pode ser atribuído à ativação de JNK1/2 pois estes dados não corroboram com experimentos realizados com células nocautes para estas quinases. Observamos então, que SP600125, além de JNK1/2, inibe inespecificamente outra(s) proteína(s)/via(s) importante(s) na multiplicação viral. Apesar de JNK1/2 não apresentar um papel sobre a multiplicação viral, em experimentos de fenótipo de placa, as células nocautes para estas quinases apresentaram um tamanho reduzido em relação às células selvagens. Além disto, a liberação da forma EEV demonstrou um aumento na ausência de JNK1/2. Juntamente com dados da literatura sugerimos que JNK1/2 pode ter seu papel relacionado ao controle da liberação das formas CEV e EEV da célula hospedeira. Além disto, JNK1/2 parece ter um papel relacionado à resposta celular antiviral através da indução

da citocina IL-6. A modulação das vias sinalizadoras envolvendo MEK/ERK e MKK/JNK durante o curso da infecção pelo VACV se correlaciona com as necessidades temporais virais, sendo a primeira relacionada à multiplicação, enquanto que MKK/JNK está envolvida principalmente com a saída das formas virais CEV e EEV da célula infectada.

ABSTRACT

Intracellular signaling events represent an essential role on virus biology. In recent publications, the Grupo de Transdução de Sinal of Laboratório de Vírus demonstrated that the activation of the protein kinase activated by mitogens (MAPK) (ERK1/2) and their substrates are essential to *Vaccinia virus* (VACV) multiplication (Magalhães et al, 2001, Andrade et al, 2004, Silva et al, 2006). At this work we analyze the kinetic of activation of MAPKs ERK1/2 and JNK1/2 and their transcript factors during VACV infection. Our results showed that ERK1/2 and JNK1/2 regulate temporally transcript factor c-Jun activation. This interaction MAPKs–c-Jun leads to the formation of DNA-proteins complexes of the sequences AP-1 and CRE in distinct moments of viral infection. We also observed that JNK1/2 activation is mediated by MAPKKs MKK4 and MKK7 and that the VACV growth factor (VGF) participates but it is not essential to this process. Moreover, the viral kinase protein B1R does not participate in activation JNK1/2. To determine the JNK1/2 role in the VACV multiplication, we used the inhibitor SP600125 and it was observed a significant decrease at the viral gene kinase timidin expression, DNA replication, viral protein expression and VACV titles. Despite of these observations, we can not attribute them to JNK1/2 activation because we had different results when utilized knockout cells to these kinases. So we concluded that SP600125 inhibits non-specifically other signaling pathways than that of JNK1/2 which are also important to viral biology. However JNK1/2 does not have a role at viral multiplication, knockout cells to these kinases presented a reduced viral plaque size when compared to wild cells. In JNK1/2 absent we observed an increased EEV release. This fact together with literature relates, allow us to hypothesis that JNK1/2 may have a role on the CEV and EEV release. And also JNK1/2 seems to have a role on the host antiviral response through of IL-6 cytokine induction. Modulation of the signaling pathways MEK/ERK and MKK/JNK during VACV infection correlates with the VACV temporal needing. While MEK/ERK is involved with viral multiplication, MKK/JNK is related with the egress of both viral forms CEV and EEV of the infected cell.

1 - JUSTIFICATIVA

O mais conhecido dos poxvírus até os dias de hoje é o vírus da varíola que causa a doença de mesmo nome. A varíola é considerada a mais devastadora doença da humanidade. A campanha mundial de vacinação foi intensificada na década de 60 pela Organização Mundial de Saúde (OMS) sendo extremamente bem sucedida e a varíola teve sua erradicação em 1977. Neste ano, o último caso de varíola foi notificado em um indivíduo infectado naturalmente na Somália (Inglesby et al, 1999). Em 1980, a OMS recomendou que a vacinação em todos os países fosse interrompida sendo declarada a erradicação do vírus da varíola (Henderson et al, 1999).

Com a erradicação da varíola e a interrupção da vacinação, há mais de vinte anos atrás, foi gerada uma população susceptível à infecção por este vírus. No entanto, uma epidemia em escala mundial somente ocorreria em casos drásticos de bioterrorismo. Mais recentemente o Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos começou a planejar um programa de vacinação contra a varíola. A vacina utilizada na erradicação da varíola constituiu-se do *Vaccinia virus* (VACV), um poxvírus não patogênico para seres humanos imunocompetentes. O uso do VACV nesta possível nova vacinação está sendo avaliado, o debate acerca de como as pessoas seriam vacinadas está centrado na segurança da vacina viva e na transmissibilidade do VACV de pessoas recentemente vacinadas para hospedeiros susceptíveis (Sepkowitz, 2003).

Até pouco tempo acreditava-se que o vírus não poderia ser encontrado na natureza, no entanto, nos últimos anos têm sido identificados alguns vírus infectando animais e humanos que podem ser derivados de amostras vacinais (Condit & Niles, 2002). No Brasil, existem alguns relatos do isolamento de poxvírus na natureza. A partir da caracterização parcial pôde se sustentar a hipótese de que estes vírus poderiam estar relacionados à amostra vacinal utilizada no Brasil que se manteve na natureza voltando a infectar animais e/ou seres humanos (Fonseca et al, 1998, Damaso et al, 2000, de Souza Trindade et al, 2003, Leite et al, 2005). Em 2003, 37 laboratórios confirmaram casos de doenças em humanos relatados nos Estados Unidos devido à importação de roedores africanos infectados com *Monkeypoxvirus*. Em 2004, Mahalingam e

colaboradores comentam que devido a este e outros fatos, se faz necessário uma contínua vigilância e treinamento de pessoal capacitado para estudar e responder prontamente aos casos de Orthopoxvirus. Assim, a OMS tem estimulado a caracterização dos poxvírus isolados da natureza a fim de evitar possíveis epidemias por poxvírus desconhecidos.

Nos últimos anos, os poxvírus também têm recebido atenção pelo uso seguro e eficiente de vacinas. Atualmente, o foco das pesquisas nos poxvirus está relacionado ao interesse de desenvolvimentos de drogas antivirais e vacinas seguras (McFadden, 2005). Sendo assim, estudos nestes aspectos que visam compreender a relação vírus-hospedeiro são de suma importância, tanto para o uso seguro como vacinas quanto, para compreender e, portanto, saber evitar e remediar possíveis infecções e até epidemias.

Nos últimos anos, o Grupo de Transdução de Sinal do Laboratório de Vírus, trabalha com o intuito de compreender um pouco mais a relação dos poxvírus com o hospedeiro. Dentre várias vias de sinalização celular, concentramos em avaliar a participação das MAPKs e fatores de transcrição ativados por estas durante o ciclo de multiplicação dos poxvírus. Assim, através dos trabalhos de Magalhães e colaboradores, 2001; Andrade e colaboradores, 2004 e Silva e colaboradores, 2006; foi elucidado o papel biológico da sinalização da via MEK/ERK e dos fatores de transcrição relacionados a esta na multiplicação do *Vaccinia virus*.

Muitos trabalhos têm sido desenvolvidos ao longo dos últimos anos relacionando a ativação das MAPKs e atuação destas na biologia viral de diversas famílias de vírus. Estes estudos variam desde a simples detecção da ativação destas quinases, até estudos que demonstram como estas têm papel crucial na biologia viral, seja como uma resposta celular na tentativa de conter a replicação viral ou, até mesmo, como uma indução por parte do vírus devido à ativação destas quinases ser um fenômeno essencial para produção de suas progênes.

A partir de todos os dados gerados nos últimos anos pelo nosso grupo de trabalho, podemos perceber o quanto a sinalização celular decorrente dos eventos intracelulares advindos das etapas de infecção viral é crucial para o desenvolvimento da infecção. A complexa interação dos vírus com seus hospedeiros, são decisivas para a determinação do resultado da infecção e sendo assim, seu estudo de grande relevância para compreender como vírus e célula se relacionam e quais etapas e vias são fundamentais para a produção viral ou defesa do hospedeiro.

Neste trabalho realizado agora, pretendemos analisar a participação de outros componentes celulares durante a infecção pelo *Vaccinia virus*. De forma particular, visamos estudar outra via das MAPKs, a via de JNK1/2, assim como avaliar a participação de ERK1/2 em tempos tardios da infecção bem como o fator de transcrição Jun que é alvo comum das duas vias. A via de JNK1/2 vem sendo descrita na literatura como importante efetora em etapas de multiplicação de diversas famílias virais. Desta forma, ao elucidar a relação desta via no ciclo de multiplicação do *Vaccinia virus*, esperamos contribuir para aumentar o entendimento da interação entre o vírus e a célula hospedeira.

2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 - Família Poxviridae

Os poxvírus são caracterizados por serem grandes vírus que contêm uma forma ovóide ou de tijolo, possuem enzimas e fatores para a síntese do RNA mensageiro viral e um genoma de fita dupla de DNA de aproximadamente 200Kb cujas extremidades estão covalentemente ligadas. Outra característica marcante da família *Poxviridae*, além da morfologia complexa, é a capacidade de desenvolver o seu ciclo replicativo inteiramente no citoplasma da célula hospedeira (Moss, 2001; revisto em Condit et al, 2006).

A família *Poxviridae* é dividida em duas subfamílias baseadas no espectro de hospedeiro; *Entomopoxvirinae* (poxvírus de insetos) e *Chordopoxvirinae* (poxvírus de vertebrados). Geralmente, os membros da mesma família têm morfologia similar e apresentam reação e proteção cruzada em animais de laboratório (Fenner, 1998, Moss 2001).

Dentro da família *Chordopoxvirinae*, onde o *Vaccinia virus* (VACV) se encontra, existem oito gêneros e doze espécies de poxvírus. O VACV é o membro protótipo do gênero dos Orthopoxvirus e permanece até os dias de hoje como o membro mais extensivamente estudado. Os vírus protótipos de cada gênero estão listados na tabela 1.

Além do vírus da Varíola, existem outros poxvírus que podem infectar humanos. São eles, o vírus do *Molluscum Contagiosum* do gênero Molluscipoxvírus que causa doença grave em humanos e os Orthopoxvirus *Monkeypoxvirus*, *Cowpox virus* (CPXV) e o *Vaccinia virus*.

O *Monkeypoxvirus* é de ocorrência comum na África, mas em 2003, ocorreram infecções em humanos por este vírus no meio oeste dos EUA por uma importação de roedores da África. O CPXV também é um vírus encontrado em roedores, mas acidentalmente pode infectar outros animais como vacas e também humanos (revisado em MacFadden, 2005).

TABELA 1: CLASSIFICAÇÃO DA FAMÍLIA POXVIRIDAE (Fonte: ICTV/2002)

Subfamília	Gênero	Vírus Protótipo
Chordopoxvirinae	<u>Orthopoxvirus</u>	<u>Vaccinia virus</u>
	<u>Parapoxvirus</u>	<u>Orf virus</u>
	<u>Avipoxvirus</u>	<u>Fowlpox virus</u>
	<u>Capripoxvirus</u>	<u>Sheeppox virus</u>
	<u>Leporipoxvirus</u>	<u>Myxoma virus</u>
	<u>Suipoxvirus</u>	<u>Swinepox virus</u>
	<u>Molluscipoxvirus</u>	<u>Molluscum contagiosum virus</u>
	<u>Yatapoxvirus</u>	<u>Yaba monkey tumor virus</u>
Entomopoxvirinae	<u>Entomopoxvirus A</u>	<u>Melolontha melolontha entomopoxvirus</u>

2.2 – O Vaccinia virus

2.2.1 – Morfologia

Uma das mais marcantes características do VACV é que este possui várias formas diferentes de partículas infecciosas. O vírus maduro intracelular (IMV) representa a maioria da progênie infecciosa (~90%) e permanece no citoplasma da célula infectada até a lise celular (Appleyard, Hapel & Bouter, 1971; Ichihashi, Matsumoto & Dales, 1971), tem uma forma ovóide ou aproximadamente como um tijolo, contendo duas membranas e medindo aproximadamente 300 x 250nm. A forma IMV é muito estável e medeia a disseminação entre os hospedeiros.

Relativo ao IMV, outras duas partículas infecciosas, o vírus envelopado extracelular (EEV), e o vírus envelopado extracelular associado à célula (CEV); têm uma membrana adicional, que é chamada então de envelope (Sodeik & Krijnse-Locker, 2002). Esta membrana ou envelope adicional, derivada do complexo de Golgi ou endossomos, contém proteínas celulares e cerca de cinco polipeptídios codificados pelo VACV que são ausentes na partícula IMV (Smith, Vanderplasschen & Law, 2002).

Embora o EEV e o CEV sejam somente uma pequena porção da progênie viral (~5%), estes têm como importância biológica a disseminação viral dentro do hospedeiro infectado. O EEV é liberado da célula antes da morte celular. A presença desta membrana lipídica extra com as proteínas associadas, faz o EEV estruturalmente e biologicamente distinto do IMV. Além disto, existe uma maior ativação da imunidade às proteínas do EEV do que às IMV, embora a imunidade ao IMV também possa ser útil (Law, Putz & Smith, 2005).

Em 2005, o Dr. Bernard Moss propôs uma nova nomenclatura para as diversas formas virais apresentadas pelo VACV. Assim as formas IMV e IEV passariam a ser denominadas MV (**M**ature **V**irion) e WV (**W**rapped **V**irion), respectivamente. As formas EEV e CEV seriam ambas denominadas de EV (**E**nveloped **V**irus). Neste trabalho, optamos por utilizar a nomenclatura antiga

de forma a diferenciar e facilitar a discussão a respeito das formas virais envelopadas CEV e EEV.

Através de imagens obtidas a partir da microscopia eletrônica, o VACV se mostra com quatro elementos estruturais: o core ou cerne, os corpos laterais, membrana externa e envelope, este último que se apresenta somente no EEV (figura 1). O cerne, que é a estrutura mais interna do vírus, se encontra como uma estrutura ovalada parecendo um disco bicôncavo e abriga o material genético associado a proteínas e enzimas virais. Envolvendo o cerne, existe uma camada ou membrana de origem protéica em forma de pequenas subunidades cilíndricas denominada paliçada (Jensen et al, 1996, Sodeik & Krijnse-Locker, 2002).

Uma membrana externa, composta tanto por proteínas como lipídios, circunda o cerne e os corpos laterais que estão localizados em ambos os lados do cerne, nas concavidades. Esta membrana externa frequentemente exhibe uma superfície composta por formas irregulares como túbulos em microscopia eletrônica de coloração negativa convencional (Wilton et al, 1995). Utilizando-se microscopia crio-eletrônica, o vírus maduro intracelular demonstrou ter uma superfície lisa e parecer estar incluso por duas membranas. Como os túbulos de superfície, os corpos laterais foram melhor visualizados em amostras onde os virions foram quimicamente fixados e sofreram desidratação antes do congelamento, assim, Dubochet e colaboradores em 1994 sugeriram que estes corpos laterais poderiam ser artefatos da técnica de fixação para microscopia eletrônica. No entanto, uma recente análise estrutural tem modificado a idéia que os corpos laterais sejam artefatos de técnica, contudo a função ainda permanece desconhecida (Griffiths et al, 2001).

2.2 2 - Genoma

Como mencionado anteriormente, o genoma dos poxvírus consiste de uma molécula de DNA fita dupla linear que se apresenta complexado com proteínas

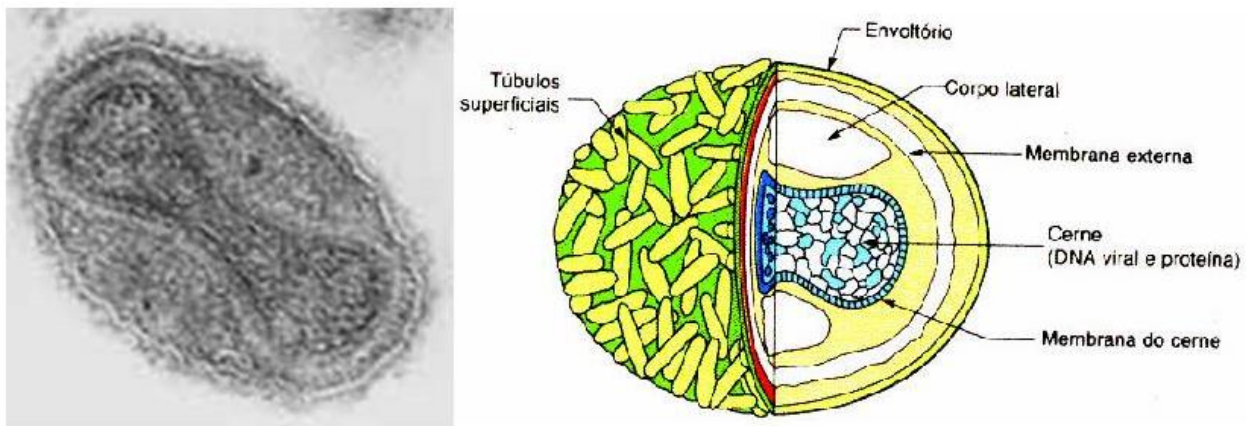


Figura 1: Micrografia eletrônica e representação esquemática da partícula do *Vaccinia virus*

A figura mostra os elementos estruturais principais: membrana externa, corpúsculos laterais, cerne e envelope. O cerne é a estrutura mais interna, onde está contido o material genético. A membrana externa é uma bicamada lipoprotéica de origem celular. Os corpúsculos laterais são estruturas ovóides, dispostas nas duas concavidades do cerne. O envelope, também de natureza lipoprotéica, é o componente mais externo do vírus.

Fonte: Moss, 2001 e <http://cdphe.embanet.com/>

virais. O tamanho do genoma das diferentes espécies de poxvírus é bastante variável (130-260Kb) (Lefkowitz et al, 2006; Condit et al, 2006). O genoma completo do VACV (linhagem Copenhagem) compreende 191.636 pb, com 66,6% de A + T, que codifica para 263 proteínas potenciais. O genoma dos poxvírus possui em suas extremidades uma seqüência terminal repetida e invertida (ITRs) de 12 Kb que inclui múltiplos pequenos elementos repetidos. Cada porção terminal é composta de uma seqüência não pareada de 101 nucleotídeos em forma de grampo (Goebel, 1990).

Embora os poxvírus codifiquem mais de 150 genes, somente 49 destes estão presentes em todos os poxvírus seqüenciados até hoje. Existem, no entanto, aproximadamente 90 genes que são comuns a todos os Chordopoxvirus, estes genes estão envolvidos em funções primordiais como a replicação, transcrição e montagem da partícula (Upton et al, 2003; revisto em Lefkowitz et al, 2006). Uma análise do genoma entre os poxvírus seqüenciados, demonstra uma organização comum deste genoma, no entanto, os genes que codificam proteínas relacionadas à interação vírus-hospedeiro e mecanismos de patogênese como apoptose, reconhecimento e apresentação de antígeno, processos de sinalização imune, funções dos interferons, entre outros, estão alocados nas ITRs, que não se apresentam como regiões tão conservadas entre os poxvírus e são comumente chamados de genes de virulência (Barry et al 2004, revisto em Lefkowitz et al, 2006). Estes genes não conservados e não essenciais na replicação viral ditam as características individuais do vírus em relação ao espectro do hospedeiro (Condit et al, 2006).

A região central do genoma, por sua vez, que se mantém extremamente conservada entre os poxvírus, codifica principalmente para proteínas envolvidas na replicação viral, tais como enzimas e proteínas estruturais e são comumente chamados de genes essenciais (Kotwal, 2000).

Nos Orthopoxvirus, as fases abertas de leitura (ORF) são denominadas de acordo com sua localização no genoma baseada no perfil de restrição obtido utilizando-se a enzima HindIII. Assim, cada ORF é denominada pela letra do fragmento de restrição no qual se localiza, seguida do número da mesma e

pela letra L ou R, indicando esquerda ou direita, como sentido de leitura do gene (Johnson et al, 1993, Moss, 2001). Examinando as atividades atribuídas aos produtos gênicos do VACV, observa-se que estes estão, em sua maioria, envolvidos com biossíntese e metabolismo do ácido nucléico. Isto inclui atividades relativas ao metabolismo de DNA e RNA, propriedades estruturais e síntese dos ácidos nucléicos. Assim, além das proteínas estruturais o genoma do vírus codifica para várias enzimas, tais como: DNA e RNA polimerases, enzima de cap do mRNA, DNA ligase, topoisomerase, helicase, timidina quinase, ribonucleotídeo reductase e possivelmente dUTPase (Johnson et al, 1993; da Fonseca e Moss, 2003).

Dentro de cada uma das ITRs do genoma do VACV é codificado o fator de crescimento do Vaccinia virus (VGF), que, após ser secretado, tem sido demonstrado ser capaz de induzir proliferação em células não infectadas, ou seja, células adjacentes à infectada (Kotwal et al, 2000).

2.2.3 - Ciclo de multiplicação dos poxvírus

2.2.3.1 - Adsorção e penetração

O ciclo de multiplicação dos poxvírus inicia-se com a adsorção da partícula viral a célula hospedeira (figura 2). No entanto, o estudo da entrada do VACV tem sido complicado pelo fato, como já comentado, do vírus possuir múltiplas partículas infecciosas que diferem entre si pela membrana externa, o IMV e o EEV. Desta forma, o mecanismo de entrada das diferentes formas infecciosas permanece não completamente elucidado devido à existência de várias versões para o mesmo fenômeno e ainda por não ter sido identificado um receptor específico. Contudo, apesar do mecanismo controverso, ambas as formas, após a etapa de desnudamento, liberam o cerne viral no citoplasma (Vanderplasschen et al, 1998).

Inúmeros estudos foram realizados ao longo dos últimos anos para desvendar a entrada dos poxvírus na célula hospedeira. Muitos problemas em se chegar a

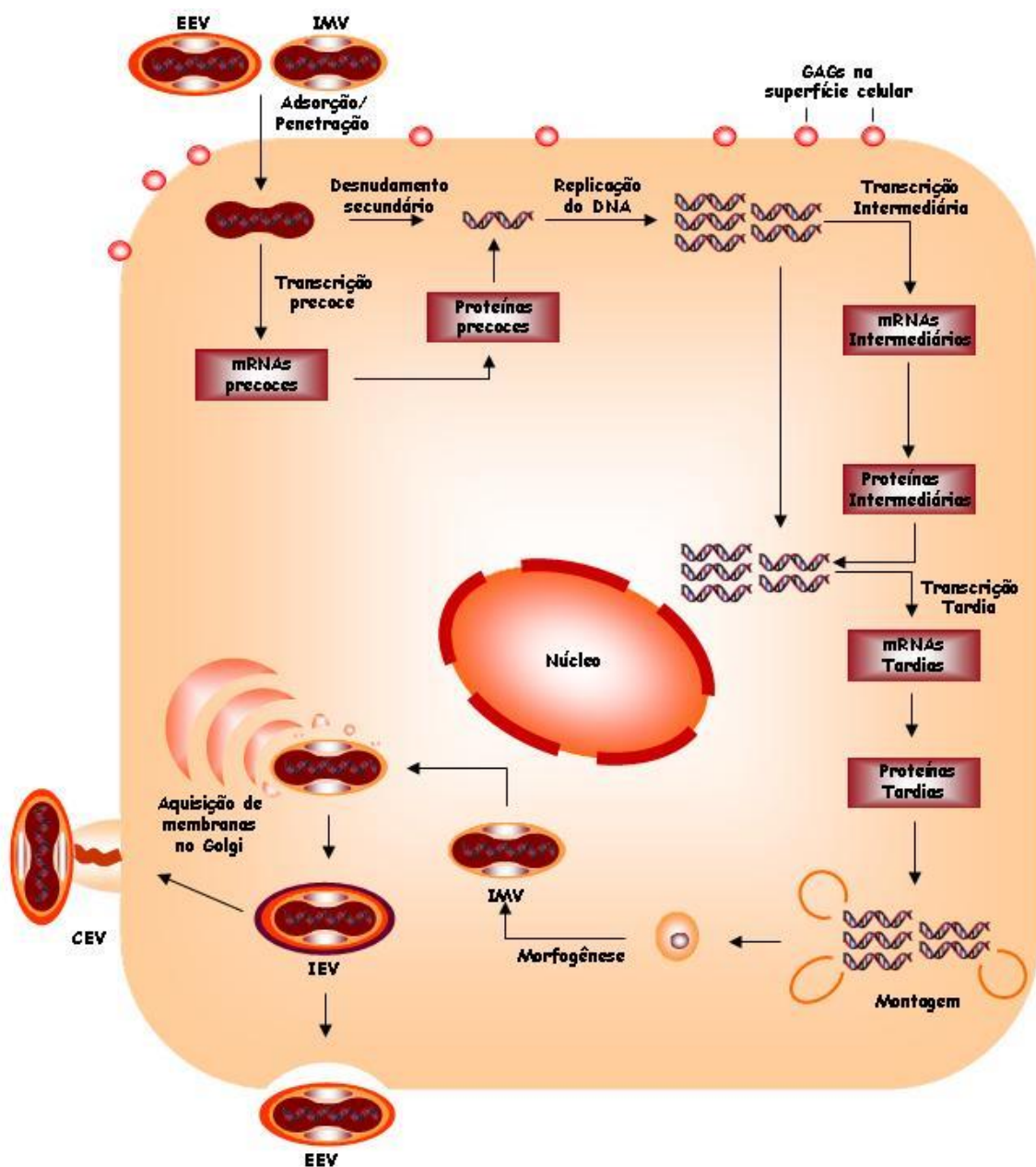


Figura 2: Ciclo de multiplicação dos Poxvírus

As duas formas infectivas dos poxvírus, o vírus envelopado extracelular (EEV) e o vírus maduro intracelular (IMV) iniciam o seu ciclo ao se ligarem e penetrarem na célula, ocorrendo o desnudamento primário. Ainda no cerne, ocorre a transcrição de genes imediatamente precoces e após a síntese de proteínas precoces, ocorre o desnudamento secundário e conseqüente liberação do DNA no citoplasma. Enzimas sintetizadas na etapa inicial da infecção atuam, então, na replicação do DNA viral. Durante e após a replicação deste DNA, ocorre a transcrição dos genes intermediários e tardios. Finalmente, tem-se a montagem do vírus e este é liberado no meio extracelular na forma de EEV ou permanece associado à célula na forma de CEV. **Fonte:** Adaptado de McFadden, 2005.

um consenso é a utilização de linhagens virais e tipos celulares diferentes. Desta forma, muito já foi discutido, desde que o IMV entraria por um mecanismo dependente de actina (Payne & Norby, 1978); ou por um mecanismo dependente de vesícula endossomais (Dales, 1963). De fato, o que pode se considerar como mais aceito atualmente, ou pelo menos em um maior consenso, é o fato de vários destes trabalhos e a maioria dos autores concordarem com a hipótese que o IMV entra na célula por fusão com a membrana plasmática. Vanderplassche e colaboradores em 1998 propuseram um modelo de entrada do IMV através de fusão com a membrana plasmática de maneira pH dependente. No entanto, Carter e colaboradores em 2005, realizaram um estudo em que mostram que a entrada do IMV ocorre por fusão com a membrana plasmática podendo interagir com glicosaminoglicanas e ainda afirmando, que o IMV possui apenas uma membrana simples. Já Heuser, 2005, contradiz a hipótese de uma membrana única e seus estudos indicam um modelo onde o IMV possui mais do que uma simples camada.

Para a entrada do EEV, muito também tem sido estudado. Estudos usando EEV purificado sugerem que este entra por fusão com a membrana plasmática. Este mecanismo, no entanto, liberaria uma forma IMV no citoplasma, um fenômeno que nunca foi observado (Vanderplasschen et al, 1998; Sodeik & Krijnse-Locker, 2002).

Acreditava - se então, que o IMV, entraria por fusão com a membrana plasmática, enquanto que o EEV entraria por endocitose ou fagocitose. O baixo pH do endossomo atuaria na destruição do envelope do EEV que através de fusão com a membrana do endossomo liberaria o cerne livre no citoplasma (Vanderplasschen et al, 1998).

No entanto, recentemente, Law e colaboradores, em 2006, demonstram que o EEV se liga em um ponto de contato com a célula e entra através do rompimento de sua membrana externa liberando uma partícula IMV, a qual se liga à membrana celular e penetra por fusão conforme demonstrado pelo mesmo grupo anteriormente. Esta ligação do EEV demonstra ser dependente

de proteínas virais B5 e A34 e compostos polianiônicos, tais como glicosaminoglicanas, na membrana plasmática.

A despeito destes dados, vários trabalhos foram publicados recentemente demonstrando o papel essencial de proteínas de membrana do IMV na penetração e disseminação célula-a-célula do VACV. Nestes estudos mostrou-se que vírus mutantes para as proteínas A21 (Townesley et al, 2005), A28 (Senkevich et al, 2004), H2 (Senkevich et al, 2005) e L5 (Townesley et al, 2005) são morfologicamente normais, se ligam à célula hospedeira mas não podem penetrar no citoplasma, ou seja, não são infecciosos. Ainda, recentemente, Senkevich e colaboradores em 2005, mostraram que estas proteínas citadas e ainda as proteínas de membrana A16, G3, G9 e J5 formam um complexo multiproteico com função primordial para entrada e fusão.

2.2.3.2 - Desnudamento

A entrada no citoplasma quando o vírus perde o envelope é denominada desnudamento primário. Nesta etapa o cerne viral é liberado no citoplasma. Na próxima etapa, o desnudamento secundário, ocorre a degradação das nucleoproteínas que constituem o cerne e o DNA viral é liberado no citoplasma da célula hospedeira. Este processo pode ser inibido pelo uso de inibidores da transcrição ou tradução, indicando que esta etapa é dependente de síntese de RNA e proteínas virais (Moss, 2001).

2.2.3.3 - Expressão dos genes virais

A expressão de genes durante a infecção pelo VACV é regulada primariamente em nível da transcrição. Os genes são transcritos em três classes temporais; precoce, intermediária e tardia. Cada classe de gene é caracterizada funcionalmente por distintos promotores e fatores de transcrição cognatos, a maioria destes sintetizada pelo vírus. Os fatores necessários para o início da transcrição de cada classe de genes são codificados pela classe de genes que o precede, e desta forma a regulação pode ser descrita como uma cascata

(Condit e Niles, 2002). Os genes precoces são aqueles cujos produtos são sintetizados antes da replicação do DNA viral e os genes tardios têm seus produtos sintetizados durante ou após a replicação do DNA viral (Moss, 2001). Atualmente, alguns trabalhos sugerem a participação de proteínas celulares, especialmente fatores de transcrição da célula, durante o processo de transcrição viral (Oh & Broyles, 2005; Knutson et al, 2006; Silva et al, 2006, Brasil & Bonjardim, comunicação pessoal). Este ponto será explorado no tópico interação vírus-hospedeiro.

O sistema de transcrição dos genes precoces é “empacotado” juntamente com o cerne das partículas infecciosas fornecendo assim, um mecanismo para a síntese do mRNA viral no citoplasma. A transcrição dos genes imediatamente precoces não requer a síntese de proteínas “de novo”, sendo realizada exclusivamente por enzimas contidas no próprio virion como a RNA polimerase dependente de DNA, enzimas responsáveis pela metilação e poliadenilação dos mRNAs recém-sintetizados e fatores de transcrição precoces responsáveis pela ativação dos genes precoces (Moss, 2001, Condit et al, 2006).

Os mRNA precoces podem ser detectados 20 minutos após o início da infecção e codificam proteínas precoces envolvidas na replicação do DNA, expressão dos genes intermediários, proteínas de interação com o hospedeiro e fatores de crescimento (Moss, 2001, Condit et al, 2006).

Existem também os genes intermediários que são expressos após a replicação do DNA e os mRNAs podem ser detectados por volta de 100 minutos de infecção. As proteínas expressas por estes genes constituem principalmente de transativadores da expressão de genes tardios (Moss, 2001, Condit et al, 2006).

Os genes tardios são transcritos e os mRNAs tardios podem ser detectados de 140 minutos a 48 horas de infecção. Estes codificam principalmente proteínas estruturais, enzimas e fatores de transcrição precoces que irão fazer parte do virion (Moss, 2001, Condit et al, 2006).

2.2.3.4 - Replicação do DNA

A exclusiva localização citoplasmática para replicação do DNA, tem sido descrita somente para os poxvírus e para o vírus Africano da febre suína (família *Asfviridae*) (Moss, 2001).

Após a liberação do genoma viral no citoplasma, inicia-se a ação de enzimas envolvidas na replicação do DNA, que em sua maioria são sintetizadas nos estágios precoces da infecção. Também no estágio precoce, a estrutura em forma de grampo presente em cada extremidade do DNA viral, é clivada. Após isto, a replicação do DNA se inicia. O modelo de replicação dos poxvírus envolve a formação de concatâmeros formando a elongação da cadeia de DNA pela polimerase viral a partir da extremidade 3' OH dentro da alça terminal, a qual serve como iniciadora da replicação (Beaud, 1995). A formação de intermediários concataméricos ocorre devido à ligação covalente das extremidades do genoma através de alças formadas por repetições invertidas, resultando em uma cadeia contínua de polinucleotídeos (Goebel et al, 1990).

Estes concatâmeros são então resolvidos em moléculas maduras de DNA que serão incorporadas nas partículas virais nos estágios tardios da infecção (Beaud, 1995).

Através de análises de VACV mutantes temperatura-sensíveis (ts) descobriu-se uma série de proteínas virais essenciais para a replicação do DNA. Dentre estas, destaca-se a proteína viral B1R, uma serina-treonina quinase de 34 kDa que é sintetizada nos momentos precoces da infecção. Através do vírus mutante termo-sensível para B1R, pôde-se observar que a ausência desta quinase resulta em um bloqueio da replicação do DNA viral (Traktman et al, 1989; Rempel e Traktman, 1992).

2.2.3.5 - Montagem e liberação

A montagem e morfogênese viral não são completamente entendidas porque muitos dos componentes ainda não têm sua exata função definida (Ward,

2005). Todo o processo de montagem das partículas virais ocorre em regiões do citoplasma granulares e eletrodensas denominadas “fábricas virais” (Moss, 2001). A montagem do VACV pode ser dividida em duas fases. A primeira começa com a formação das formas crescentes membranosas; que são simples bicamadas composta, predominantemente, pela proteína viral D13; nas áreas das fábricas virais e culmina com a produção do IMV. A maior parte da progênie viral encerra sua morfogênese neste ponto, outra pequena parte segue para a próxima etapa. A segunda fase começa com o “envelopamento” das partículas IMV por membranas para formar o vírus envelopado intracelular (IEV). Estas etapas são dependentes das proteínas virais A27 (Sanderson et al, 2000), F13 (Rottger et al, 1999) e B5R (Wolffe et al, 1993) para a movimentação e envelopamento. Estudos demonstraram que as membranas que envolvem os virions são derivadas de cisternas de um compartimento intermediário entre o retículo endoplasmático e o complexo de Golgi ou endossomos (Sodeik et al, 1993; Schmelz et al, 1994). Assim, a fração dos IMV que permanece envelopada por uma dupla membrana, os IEV, são propelidos através de microtúbulos (Ward & Moss, 2001 e Hollinshead et al, 2001) para a periferia, onde através de fusão de sua membrana mais externa com a membrana plasmática, libera o vírus envelopado extracelular (EEV) da célula. A maioria das linhagens de VACV permanece com as formas EEV presas à superfície celular e recebem desta forma o termo de vírus envelopado associado à célula, que é a forma viral responsável pela disseminação célula-a-célula (CEV) e que ocorre através da formação de caudas de actina que propõem o vírus entre as células (revisto em Ward, 2005)

Foram realizados vários estudos visando compreender as etapas da morfogênese e quais proteínas estariam envolvidas na formação do virion. Nestes trabalhos foram utilizados vírus mutados para algumas destas proteínas. A proteína quinase F10L, por exemplo, é necessária nos estágios iniciais da morfogênese viral (Traktman et al, 1995). Da mesma forma para as proteínas A14L (Traktman et al, 2000), A17L (Wolffe et al, 1996), A11R (Resch et al, 2005) e J1R (Chiu et al, 2005), dentre várias outras, que têm seu papel na formação da membrana do vírus ou etapas da morfogênese. Também um outro aspecto relevante é a interação de proteínas virais com o sistema de transporte

intracelular para a movimentação dos componentes que irão formar o virion, bem como das formas virais IMV para a formação do IEV e deste para a formação de EEV ou CEV (Revisto em Ward, 2005 e Münter et al, 2006) os quais serão enfocados mais adiante.

2.3 - *Interação Vaccinia virus-hospedeiro*

A infecção viral provoca drásticas mudanças na função celular, morfologia e metabolismo. Todas as mudanças são advindas da estreita relação dos vírus com seus hospedeiros durante a infecção e são reflexos da dependência que estes organismos têm da célula para a produção de sua progênie.

Durante a infecção o VACV causa efeitos visíveis na célula hospedeira que incluem: arredondamento celular e separação das células vizinhas, alteração no citoesqueleto de actina, microtúbulos e permeabilidade de membrana (Bablanian et al, 1978; Cudmore et al, 1995; revistos em Haga e Bowie, 2005 e em Ward, 2005). Estes efeitos citopáticos induzidos por VACV foram determinados como uma gradual degeneração da função celular, morfologia e viabilidade. Alguns aspectos do efeito citopático são uma consequência direta da ação de genes virais e podem constituir uma manipulação de mecanismo celular com o intuito de promover a replicação viral.

A síntese de DNA, mRNA e proteínas do hospedeiro são inibidas durante a infecção viral. Concomitante com a expressão de proteínas do VACV, a síntese de proteínas celulares decresce gradualmente após a infecção e chega ao mínimo com cerca de 6 horas pós-infecção. Somando a isto, a transcrição dos mRNAs celulares é reduzida progressivamente, sendo substituídos pelos mRNAs virais (Haga e Bowie, 2005).

A despeito da inibição sobre as funções celulares, o VACV possui estratégias representativas para evadir-se da resposta imune do hospedeiro e estabelecer a infecção. Estas estratégias constam de proteínas virais que são codificadas para contrapor as defesas do hospedeiro. Exemplos destas, são as proteínas codificadas pelos genes A53R, B15R e B8R que codificam para análogos de

receptores de TNF, IL-1 e IFN- γ , respectivamente. Os produtos destes genes se ligam a estas citocinas com alta afinidade e neutralizam suas atividades (Smith, 2000, revisto em Haga e Bowie, 2005).

Outro fenômeno considerado uma resposta inata à infecção viral é a apoptose que pode ser um efetivo mecanismo antiviral, particularmente, se ocorre nos momentos precoces da infecção. Inibir a apoptose é crucial para muitos vírus, como no caso do VACV que codifica proteínas anti-apoptóticas. Os produtos dos genes E3L e K3L, por exemplo, que previnem a ativação de PKR dependente de RNA λ e, conseqüentemente, a inibição da tradução induzida por interferon (revisto em Haga e Bowie, 2005 e MacFadden, 2005). Também a proteína do grupo das serpinas, SPI-2, produto do gene B13R do VACV, bloqueia a atuação da caspase-8 que está envolvida na progressão da apoptose (Zhou et al, 1997 revisto em Haga e Bowie, 2005) e a atividade pro-apoptótica de TNF- α (Barry e MacFadden, 2000, revisto em Haga e Bowie, 2005).

Outra estratégia utilizada pelo VACV é o bloqueio da sinalização mediada por TLRs que são proteínas fundamentais na imunidade inata e inflamação. O VACV codifica duas proteínas, A46 e A52 que bloqueiam a ativação de NF- κ B mediada por IL-1 e TLR através da similaridade com os domínios TIR presentes nos receptores TLR (Bowie et al, 2000).

Até aqui, podemos verificar que o vírus se relaciona com o hospedeiro utilizando de estratégias para burlar as defesas imunes inatas existentes e que não permitiriam ao vírus estabelecer uma infecção produtiva. No entanto, a relação dos vírus com os hospedeiros baseia-se, também, e primordialmente, na usurpação da habilidade celular em virtude de produzir sua progênie. Assim, os vírus se utilizam da sinalização intracelular para transformar o ambiente hostil em um local favorável para a produção de todos os componentes necessários para a progressão da infecção. O sucesso da infecção viral depende absolutamente, em todos os estágios, da bem sucedida relação com a célula hospedeira.

Desde a adsorção, a entrada viral é geralmente facilitada pela interação das proteínas virais com proteínas específicas da superfície celular, isto determina o tropismo em um primeiro momento do contato vírus-célula. Embora nenhum receptor específico tenha sido identificado para os poxvírus, Chung e colaboradores em 2005 sugerem um papel das rafts lipídicas na membrana celular, desde que a depleção destas inibe a entrada do IMV. Além disto, desde a entrada, o vírus estimula sinalização celular (Magalhães et al, 2001), dinâmica de actina e fosforilação de tirosina e PKC (Locker, 2000). Durante e após a entrada, estes fenômenos de sinalização celular iniciais podem ou não favorecer o sucesso da replicação viral. Os Chordopoxvirus VACV e *Myxoma virus*, por exemplo, ambos, ao infectar fibroblastos murinos estimulam a sinalização celular da via MEK/ERK1/2. Esta via que é importante para o sucesso replicativo no caso do VACV (Andrade et al, 2004), no entanto, ao ser estimulada nas células infectadas pelo *Myxoma virus*, leva à fosforilação do fator regulador de interferon 3 (IRF-3), que migra para o núcleo e regula a transcrição de IFN- β . A resposta via interferon tipo I aborta a infecção do *Myxoma virus* o que faz do fibroblasto murino uma célula não permissiva a este vírus (Wang et al, 2004). Em contrapartida, a utilização de inibidores da via MEK/ERK1/2, rende ao *Myxoma virus* uma infecção produtiva, enquanto inibe a replicação do VACV (revisto em McFadden, 2005).

Além da participação de vias de sinalização, alguns trabalhos têm explorado também a participação de fatores de transcrição celulares na transcrição ou na replicação do genoma viral. Até recentemente, o conceito consistia que o VACV codificava todas as suas proteínas necessárias para a síntese de mRNA e a replicação do DNA. Assim, algumas proteínas ativadoras da transcrição viral foram identificadas e suas funções relacionadas com a transativação dos promotores virais. Tais como as proteínas E4L e VITF-3, que são necessárias para iniciação da transcrição de genes intermediários, assim como as proteínas codificadas pelos genes A1L, A2L e G8R que são essenciais para a transcrição dos genes tardios (Condit e Niles, 2002). No entanto, em 1999, Broyles e colaboradores realizaram um estudo onde verificaram o fator celular YY1 (Yin Yang 1) co-localizado com complexos de replicação viral no citoplasma de células infectadas e ainda a ligação deste à região promotora do gene

intermediário I1L. No entanto, Knutson e colaboradores em 2006, citam como resultados não publicados que YY1, ao contrário do que se acreditava, reprime o promotor de I1L.

Oh e Broyles em 2005, mostram que seis proteínas nucleares diferentes com funções distintas, se localizam no citoplasma de células infectadas pelo VACV sugerindo um possível papel destas proteínas nos complexos de replicação viral, sem, no entanto apontar uma função específica para as mesmas. Mais recentemente, Knutson e colaboradores, 2006 relatam que a proteína ligante ao TATA, TBP, que é um componente importante nos complexos de transcrição, se liga aos promotores virais intermediário e tardio.

Além disso, o nosso grupo de trabalho, vem estudando o papel do fator de transcrição Egr-1. No trabalho de Silva e colaboradores, 2006, foi demonstrado que este fator tem uma grande importância na multiplicação viral. Também resultados de Brasil e Bonjardim, do nosso grupo de trabalho, (resultados não publicados) corroboram com o trabalho anterior, visto que a multiplicação do VACV em células nocautes para este fator tem um significativo decréscimo. Egr-1, durante a infecção, se co-localiza com as fábricas virais, sugerindo um possível papel deste fator direta ou indiretamente na transativação de genes virais.

Também durante a morfogênese, o vírus depende da interação de proteínas do vírus com fatores do hospedeiro, particularmente o sistema de transporte de celular via microtúbulos, para assegurar a montagem das diferentes formas virais e a movimentação e liberação destas da célula infectada (figura 3). Assim, a proteína viral A27 é necessária para o transporte do IMV das fábricas virais para o sítio de envelopamento, mas esta somente executa sua função devido à interação com microtúbulos (Sanderson, 2000). Também a proteína F12 movimenta o IEV recém formado até a superfície da célula e para isto também interage com os microtúbulos (van Eijl et al, 2002). Esta movimentação ao longo dos microtúbulos em direção à membrana plasmática utiliza a proteína celular motora quinesina-1 (Ward e Moss, 2004). A proteína A36

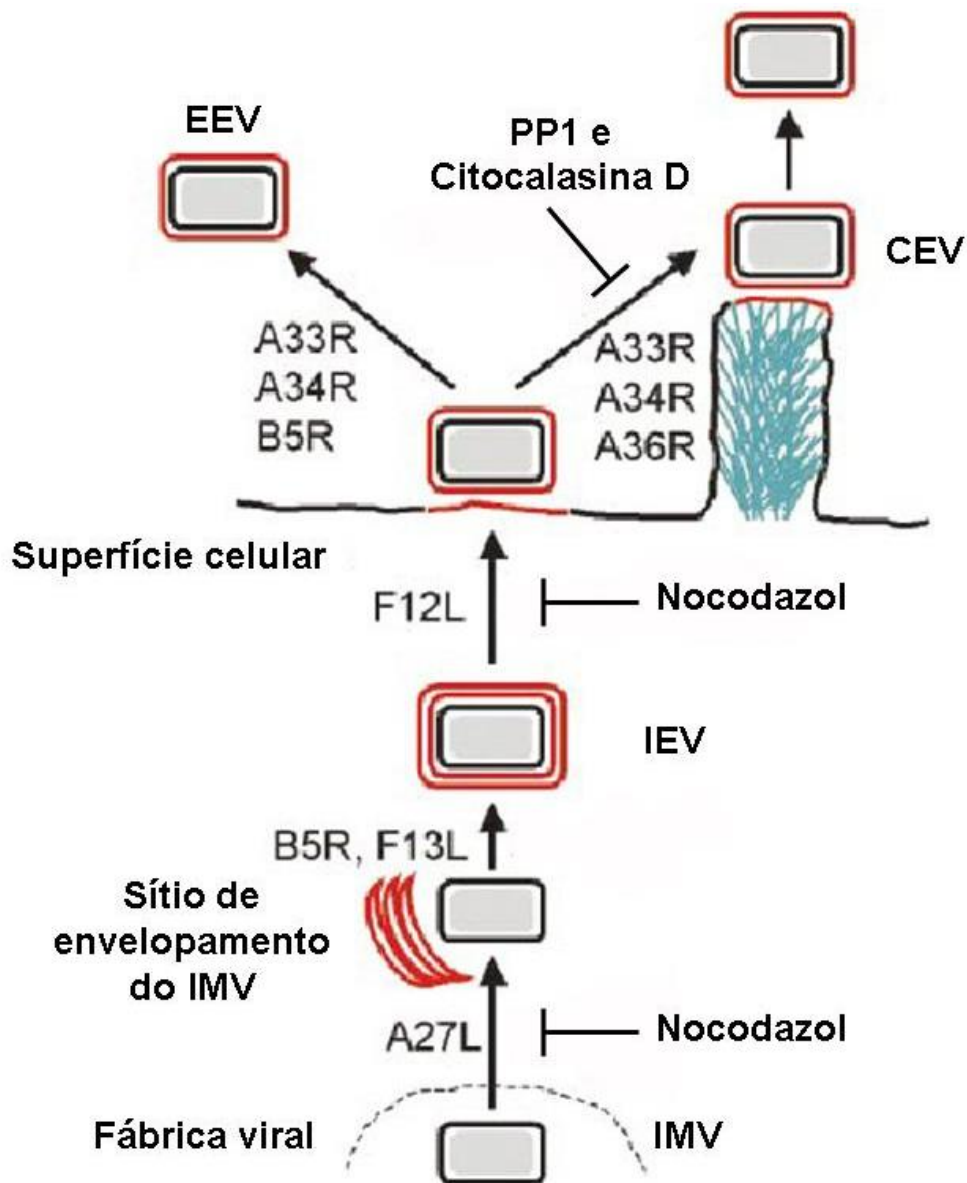


Figura 3: Via de morfogênese e saída do VACV.

Diversos estágios de montagem e saída do VACV bem como sua interação com proteínas do hospedeiro podem ser definidos com o uso de inibidores. Inibidor de polimerização da actina (citocalasina D), de microtúbulos (nocodazol), e da família de proteínas quinases Src (PP1). A proteína A27L e os microtúbulos são necessários para a movimentação do IMV das fábricas virais para o sítio de envelopamento. As proteínas B5R e F13L são necessárias para o envelopamento do IMV para formação do IEV. A movimentação do IEV até a superfície celular necessita de F12 e microtúbulos. Para a formação das fibras de actina são necessárias as proteína A33R, A34R e A36R. a fosforilação de A36R pode ser inibida por PP1 (inibidor das Src). A liberação de CEV e formação de EEV são afetadas por A33R, A34R e B5R.

Modificado de Smith et al, 2002.

presente na partícula IEV é a proteína chave na formação das caudas de actina que facilitam a disseminação célula-a-célula. Quando a membrana externa do IEV se funde com a membrana plasmática, na periferia da célula, a proteína viral B5 gera a ativação da proteína quinase celular Src. Esta, por sua vez, fosforila A36R em resíduos de tirosinas liberando a ligação desta com a quinesina (Newsome et al, 2004). Após a fosforilação, A36R interage com Nck levando ao recrutamento da proteína da síndrome de Wiskott-Aldrich (N-WASP) e da proteína de ligação a WASP (WIP) para o sítio de polimerização da actina que vai propeler o vírus para a célula vizinha (figura 4). Para que isto ocorra, também são necessárias proteínas celulares que forma o complexo Arp2/3, responsáveis pelo processo de nucleação da actina para formação dos filamentos (revisto em Smith, 2003; revisto em Münter et al, 2006)).

A ausência das proteínas virais A34R e A33R é de sua importância para a fosforilação de A36R no resíduo *Tyr -112*, desde que este evento foi reduzido ou inibido em vírus mutantes para estas proteínas (Wolffe et al, 2001). Os filamentos de actina não são necessários para a formação da partícula CEV, mas são fundamentais para propeler eficientemente a partícula CEV para a célula vizinha (revisto em Münter et al, 2006).

Com tudo descrito até agora, podemos destacar a importância da interação vírus-hospedeiro, especificamente para o VACV, que se utiliza de várias estratégias na interação com a célula visando assegurar o seu sucesso replicativo.

2.4 - Proteínas Quinases Ativadas por Mitógeno (MAPK)

As células respondem a mudanças físicas e químicas no ambiente. Estes estímulos externos, sejam fatores químicos ou físicos, têm papel principal na regulação de complexos processos intracelulares atuando em muitos aspectos da função celular, incluindo: expressão gênica, migração, proliferação, diferenciação, sobrevivência e morte (Barr & Bogoyevitch, 2001).

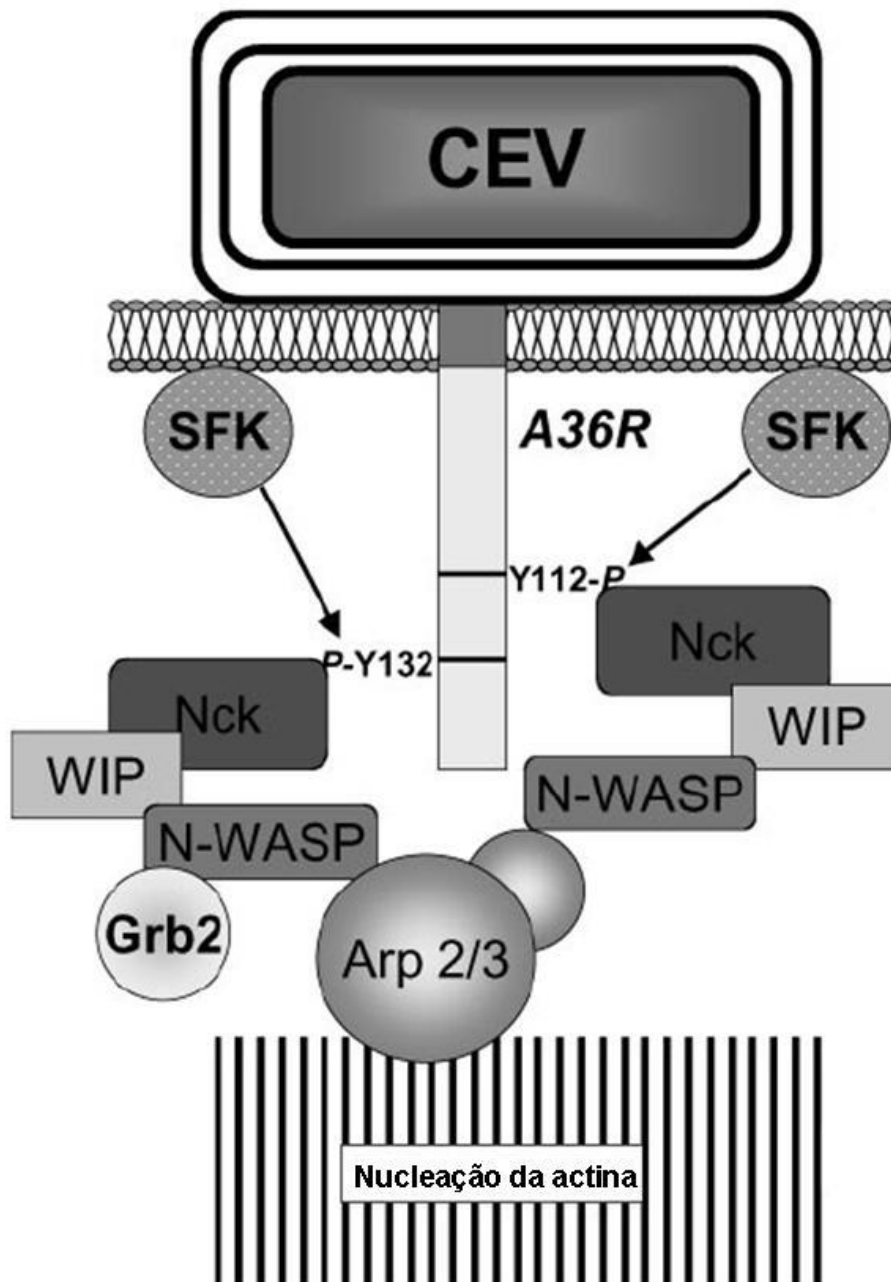


Figura 4: A formação dos filamentos de actina abaixo das partículas CEV.

VACV causa a nucleação da actina para propeler CEV da célula infectada para a célula vizinha. A cascata inicia-se com a fosforilação no lado citoplasmático de A36R por quinases da família Src (SFK). Através do subsequente recrutamento de Nck, WIP e N-WASP seguida pela formação do complexo Arp2/3, ocorre a nucleação da actina.

(modificado de Smith et al, 2003)

As proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), compreendem um grupo de enzimas intracelulares transdutoras de sinais que permitem à célula responder a determinados estímulos. As MAPKs são ativadas por estes diferentes estímulos que agem sobre diversas famílias de receptores. Estes estímulos incluem hormônios e fatores de crescimento, que agem sobre receptores com atividade tirosina quinase ou receptores de citocinas; peptídeos vasoativos, que atuam sobre receptores transmembrana acoplados à proteína G; polipeptídios relacionados ao fator de crescimento transformante beta (TGF- β), que atuam sobre receptores com atividade serina-treonina quinase; citocinas inflamatórias da família do fator de necrose tumoral (TNF); além das alterações na quantidade de nutrientes, injúria isquêmica, estresses ambientais ou estimulação química mediada por osmolaridade, calor, pH, radiação ionizante e estresse mecânico (Kyriakis & Avruch, 2001; Barr & Bogoyevitch, 2001; e Ono & Han, 2000).

Esta superfamília de proteínas serina/treonina quinases tem sido foco de atenção e estudos nos últimos anos. Especialmente, em nível bioquímico, as vias sinalizadoras das MAPKs têm demonstrado modular a expressão de genes através de sua ação de catalisar, pela fosforilação, a ativação de um grande número de fatores de transcrição. O papel das MAPKs tem sido estudado e confirmado em uma variedade de pesquisas bioquímicas e genéticas em um espectro amplo de organismos que incluem leveduras, insetos, plantas, invertebrados e vertebrados (Barr & Bogoyevitch, 2001).

Quatro grupos distintos dentro da família de MAPKs têm sido descrito. Estes incluem as quinases reguladas por sinal extracelular – ERK1 e ERK2, as isoformas ERK3, ERK4 e ERK5 ou grande MAP quinase 1; e as proteínas quinase ativadas por estresse (SAPKs) que são representadas por JNK (quinase Jun N-terminal) e o grupo de proteínas quinases p38 (Ono & Ham, 2000).

A via de ativação das MAPKs consiste de um módulo de três quinases citoplasmáticas: uma proteína ativada por mitógeno (MAP) quinase quinase (MAPKKK), uma MAP quinase quinase (MAPKK) e então uma MAP

quinase (MAPK) (Figura 5). As MAPKKK são serina-treonina que recebem o sinal de um receptor localizado na membrana e transmitem este sinal ativando seu substrato, uma MAPKK. Esta última, é uma quinase de dupla especificidade com potencial para fosforilar resíduos críticos de treonina e tirosina em seu substrato, as MAPK. Estas, por sua vez, representam uma família de quinases serina-treonina com potencial para fosforilar outras proteínas citoplasmáticas e translocarem-se do citoplasma para o núcleo, podendo regular diretamente a atividade de fatores de transcrição e assim controlar a expressão gênica (Hagemann & Blank, 2001).

A via de sinalização de MAPKs, que foi inicialmente reconhecida através de estudos com eucariotos simples como a levedura *Saccharomyces cerevisiae*, foram também identificadas em organismos superiores (Kyriakis & Avruch, 2001). Em mamíferos, três principais grupos de MAPKs têm sido estudadas e serão consideradas neste trabalho, são eles: ERK, JNK e p38.

2.4.1 - Map Quinase c-Jun Terminal (JNK/SAPK)

Estudos bioquímicos levaram à identificação e purificação de JNK como uma “proteína quinase de 54 KDa associada a microtúbulos”, que foi ativada por cicloheximida (Kyriakis et al, 1991). Em estudos paralelos, JNK foi encontrada associada ao domínio de ativação NH₂- terminal de c-Jun fosforilando este fator de transcrição na Ser-63 e Ser-73 em resposta à exposição de células a radiação ultravioleta (UV). As JNKs são uma família de serina/treonina quinases, que possuem entre 46 e 54 KDa, são ativadas pela exposição a muitas formas de estresse (estresse osmótico, térmico, radiação gama, UV), sendo por isso, também denominadas de proteínas quinases associadas ao estresse (SAPK) (Bogoyevitch e Kobe, 2006; Bogoyevitch et al, 2004). No entanto, são também atualmente reconhecidas por serem ativadas pela exposição a uma variedade de citocinas e fatores de crescimento. Sendo assim, as JNKs podem servir como mediadoras críticas de uma diversidade de estímulos extracelulares (Bogoyevitch et al , 2004).

Cascata de Sinalização das MAPKS

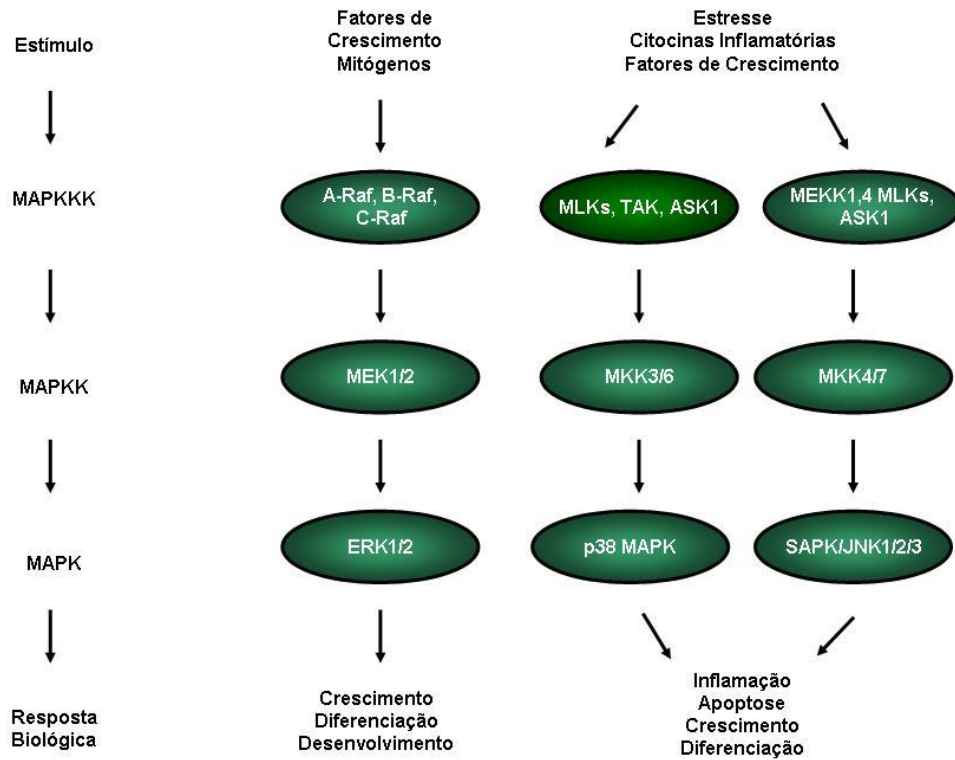


Figura 5: Vias de sinalização das MAPKS

As MAPKs são uma família de proteínas serina/treonina quinases que estão envolvidas em muitos processos celulares. A cascata das MAPKs está organizada hierarquicamente dentro de um módulo contendo três proteínas. As MAPKs são fosforiladas e ativadas pelas MAPKK quinases (MAPKKs), e estas por sua vez são fosforiladas e ativadas pelas MAPKKK quinases (MAPKKKs). As MAPKKKs são, geralmente, ativadas por interação com uma família de pequenas GTPases e/ou outras proteínas quinases que conectam o módulo das MAPKs com o receptor de superfície celular ou estímulo externo.

(Fonte: Adaptado de www.cellsignal.com)

As proteínas quinases JNK são codificadas por três genes. Os genes Jnk1 e Jnk2 são expressos ubiquamente. Em contraste, o gene Jnk3 é mais limitado e sua expressão está restrita ao cérebro, coração e testículos. Estes genes podem sofrer processamento alternativo gerando dez isoformas diferentes de JNK (Gupta et al, 1996, Bogoyevitch et al, 2004, revisado em Bogoyevitch e Kobe, 2006).

2.4.1.1 - Ativação de JNK

A seqüência de eventos que ocorre na ativação de JNK inicia-se com ativação de receptor, levando ao recrutamento de moléculas adaptadoras e ativação de pequenas moléculas ligadoras de GTP (membros da família Ras, como Rac, CDC42 e Rho). O sinal é passado para uma série de três ou quatro proteínas quinases (figura 6). Um grande número de MAPKKK tem sido relacionado na ativação da via de sinalização de JNK. Estas incluem membros do grupo MEKK (MEKK1, talvez MEKK4), proteínas quinases de linhagem mista (MLK1, MLK2, MLK3, DLK e LZK), o grupo ASK (ASK1 e ASK2), TAK1 e TPL2. Uma série de evidências indicam que a família Rho GTPases medeiam a ativação de JNK por alguns estímulos. Vias de transdução de sinal que ativam proteínas Rho incluem tirosina quinase, podendo então, estas proteínas da família Rho mediar a ativação de JNK causada por receptores tirosina quinase (Davis, 2000, revisado em Bogoyevitch e Kobe, 2006).

As proteínas quinases JNKs são ativadas por fosforilação no resíduo de treonina e tirosina pelas MAPKK MKK4 e MKK7. A proteína quinase MKK7 é primariamente ativada por citocina e MKK4 é primariamente ativada por estresse ambiental. Embora MKK4 e MKK7 possuam dupla especificidade para fosforilar JNK em ambos resíduos de treonina e tirosina, MKK4 e MKK7 parecem preferencialmente fosforilar JNK em tirosina e treonina, respectivamente. A localização nuclear de MKK4 e MKK7 difere da localização citoplasmática dos ativadores de ERK, MEK1 e MEK2. Desta forma, JNK pode ser ativado no núcleo e no citoplasma (Davis, 2000).

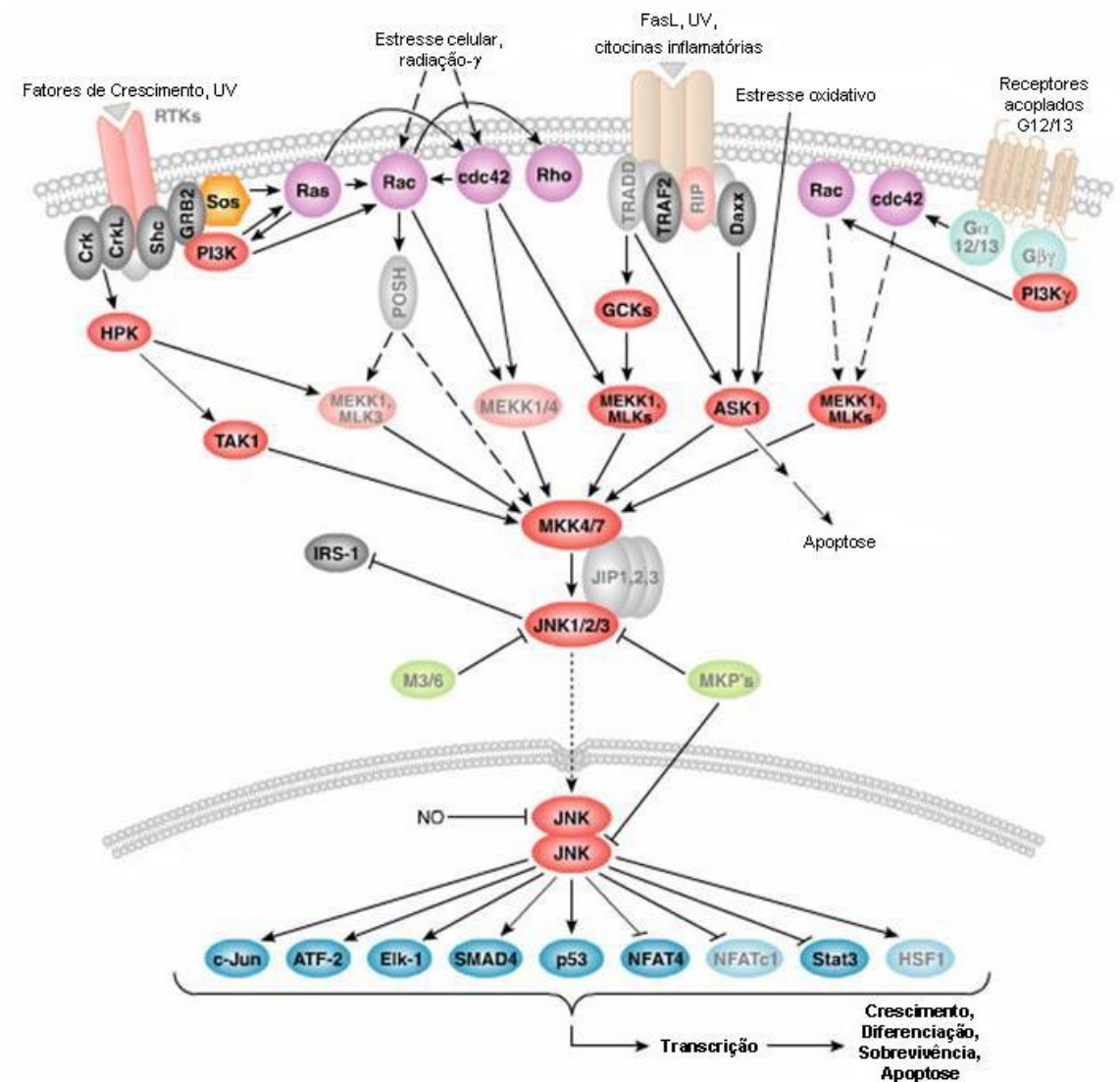


Figura 6: Cascata de Sinalização de JNK1/2/3

A cascata de sinalização JNK inicia na membrana celular através de uma diversidade de receptores que incluem os componentes da família de GTPases Rho. Estas repassam o sinal para uma variedade de proteínas quinases, em especial a MAPKKK ASK1. O sinal é então mais uma vez repassado para as MAPKKs MKK4 e MKK7 que fosforilam as JNK em resíduos específicos de tirosina e treonina. Ativas, JNK1/2/3 podem translocar-se até o núcleo e fosforilar seus diversos fatores de transcrição alvo.

(Fonte: www.cellsignal.com)

2.4.1.2 - Substratos de JNK

Observou-se que a fosforilação de c-Jun por JNK causa aumento na sua atividade transcricional. Contudo, JNK também fosforila outras proteínas que fazem parte do complexo AP-1, incluindo, JunB, JunD, e ATF-2 (figura 6). Vários estudos têm demonstrado o papel importante desempenhado por JNK na regulação da atividade transcricional de AP-1, embora o mecanismo desta regulação permaneça pouco esclarecido, tem sido proposto um possível papel do coativador CBP/p300. Além disto, outros processos adicionais dependentes de

JNK podem contribuir para regulação da atividade de AP-1. Assim, JNK pode regular a atividade intrínseca de acetilase de histona de ATF-2 e pode regular a degradação mediada por ubiquitina das proteínas AP-1 (Davis, 2000, revisado em Bogoyevitch e Kobe, 2006).

AP-1 é um importante transativador de vários genes responsivos a estresse incluindo os genes para IL-1 e -2, CD40, CD30, TNF e c-Jun. AP-1 participa da indução transcricional de proteases e proteínas envolvidas na adesão celular (Karin et al, 1997). Um papel crítico desempenhado por JNK parece ser a regulação da atividade transcricional de AP-1. Esta conclusão foi baseada em análises genéticas de Jun e JNK em *Drosophila* e pela análise da atividade de transcrição de AP-1 em células murinas. O papel preciso de AP-1 em resposta a ativação de JNK pode ser modificado pela atividade de outros fatores de transcrição que interagem com AP-1 em promotores de genes alvos (Kyriakis e Avruch, 2001).

2.4.1.3 - JNK – Papel em apoptose, sobrevivência e motilidade.

A via de JNK é ativada pela exposição das células ao estresse. No entanto, o papel de JNK na resposta ao estresse não é clara. É possível que JNK possa mediar alguns dos efeitos do estresse na célula. Alternativamente, a ativação de JNK pode representar uma resposta protetora que é iniciada pela exposição ao estresse. O papel específico de JNK pode, desta forma, depender do

contexto celular. Assim, a via de JNK tem sido associada tanto com apoptose, quanto com sinalização de sobrevivência (Ip & Davis, 1998).

Alguns estudos demonstram que a via de sinalização de JNK é necessária para resposta de alguns, mas não todos, os estímulos que levam a apoptose. Estas conclusões foram confirmadas por análises genéticas de apoptose dependente de JNK em *Drosophilla* (Adachi-Yamada et al, 1999) e também por observações que a deficiência de JNK causa defeitos em apoptose de timócitos (Rincon et al, 1998 e Sabapathy, 1999).

A observação que JNK, em resposta a estímulos de estresse, é necessário na liberação do citocromo c mitocondrial, fornece uma explicação para estudos prévios realizados sobre o papel de JNK na sinalização da apoptose. JNK não é necessário para sinalização pelo receptor de morte mediada por caspase 8, mas é necessário para a apoptose mediada por estresse através da via mitocondrial/caspase-9 (Davis, 2000). A apoptose também pode ser mediada através de p53. JNK não fosforilado se complexa com p53 causando a ubiquitinação seguida pela degradação de p53. Já a fosforilação de JNK por MKK4/7 medeia a dissociação de p53 e estabilização desta (Fuchs et al, 1998 revisado em Sumbayev e Yasinska, 2006).

Embora esteja estabelecido que JNK contribui em algumas respostas apoptóticas, não está claro que a apoptose represente a única consequência funcional da ativação de JNK. Isto é obvio quando consideramos que muitos estímulos que ativam JNK não causam apoptose. Alguns estudos *in vivo* indicam que a ativação de JNK, sobre certas circunstâncias, pode promover sobrevivência e prevenir a apoptose (Xia e Karin, 2004). Isto ocorre, em parte, devido à via de sinalização apoptótica dependente de JNK poder ser bloqueada pela ativação de vias de sobrevivência. Exemplos destas vias de sobrevivência incluem NFkB, Akt/PKB e ERK. Desta forma, as funções da via de JNK estão dentro de um contexto do estado de ativação de outras vias de sinalização. A ausência de uma resposta apoptótica pela ativação de JNK também parece estar relacionada com o tempo em curso desta ativação, ou seja, se a ativação é sustentada ou transiente (Davis, 2000). As células podem interpretar a

ativação de JNK como um sinal de sobrevivência devido ao estado de ativação de outras vias de sinalização dentro da célula. Uma forte evidência em favor desta hipótese deriva de estudos em embriões mutantes *jnk1*^{-/-} e *jnk2*^{-/-} que exibem aumento na apoptose durante o desenvolvimento do pro-encéfalo (Kuan et al, 1999). Além disso, tem sido reportado que sinais de sobrevivência associados às integrinas podem ser mediados pela ativação de JNK (Davis, 2000).

Outro papel importante de JNK1/2, demonstrado através de recentes estudos, inclui a regulação da migração e motilidade celular. JNK e proteínas da via como MEKK1 e MKK4, tem sido correlacionada com um aumento na migração celular em uma série de tipos celulares (revisado em Huang et al, 2004).

Como as alterações associadas à reorganização do citoesqueleto dependente de actina (fibras de estresse, lamelipódio e filopódio) são reguladas pelas GTPases da família Rho (Rho, Rac e CDC42) (Hall et al, 1998; Burridge e Wennerberg, 2004), e os sinais mediados por Rac e CDC42 são transmitidos para JNK, o envolvimento da MAPK com a organização do citoesqueleto tem sido objeto de vários estudos. Por exemplo, no controle de proteínas reguladoras do citoesqueleto como profilina e cortatina (Jasper et al, 2001); na fosforilação de proteínas que interagem com microtúbulos (MAPs) e envolvidas na reorganização da actina (p150-spir) (revisado em Huang et al, 2004).

Outro mecanismo possível do envolvimento de JNK1/2 com a migração e motilidade é através da regulação da atividade de Jun. Isto devido ao fato que um grande número de genes que codificam reguladores do citoesqueleto e moléculas de adesão celular podem ser regulados por JNK (revisado em Xia e Karin, 2004).

2.4.2 - Quinase Regulada por Sinal Extracelular – ERK

As MAPKs ERK1 e 2 são proteínas de 44 e 42 KDa, respectivamente, que constituem o principal módulo de sinalização conservado através da evolução. As ERKs são as MAPKs mais extensamente caracterizadas e foram descobertas em estudos realizados para elucidar qual seria a quinase efetora

que medeia a fosforilação da proteína ribossomal S6 em resposta à estimulação com insulina (Robinson & Cobb, 1997).

O papel específico das duas formas de ERK não está bem definido. Primeiro, devido a ambas as formas serem ubiquamente expressas; segundo, por estas possuírem alta similaridade entre si (75% de identidade em aminoácidos) e em terceiro, ambas isoformas, in vitro, apresentam a mesma especificidade para o substrato (Pouysségur et al, 2002).

A ativação de ERK é essencial na proliferação celular e fornece uma resposta integrada: com aumento da síntese de nucleotídeos, ativação da transcrição de muitos genes através da fosforilação de fatores de transcrição, estimulação da síntese de proteínas via MNK1, e finalmente facilita a formação de um complexo ativo ciclinaD-CDK4, o qual é razão limitante para a célula em proliferação (Pouysségur et al, 2002).

2.4.2.1 - Ativação de ERK

Em células de mamíferos, as ERKs são ativadas via estimulação de receptor tirosina quinase, receptor acoplado à proteína G e integrinas. A estimulação através dos receptores tirosina quinase por ligantes apropriados, resulta em aumento da atividade catalítica e subsequente autofosforilação nos resíduos de tirosina (Widmann et al, 1999).

A fosforilação destes receptores resulta na formação de complexos multiprotéicos cuja organização favorece os eventos de sinalização seguintes (figura 7). Estes sinais na superfície celular convergem para a ativação da Ras ligada à GTP. Esta recruta a MAPKKK serina/treonina quinase Raf para a membrana onde a mesma será ativada por um mecanismo de fosforilação. O sinal é amplificado pela fosforilação por Raf das MAPKKs, MEK1 e MEK2, que são duplamente fosforiladas em dois resíduos de serina. Estas por sua vez, vão repassar o sinal pela dupla fosforilação das ERKs 1 e 2 em resíduos de

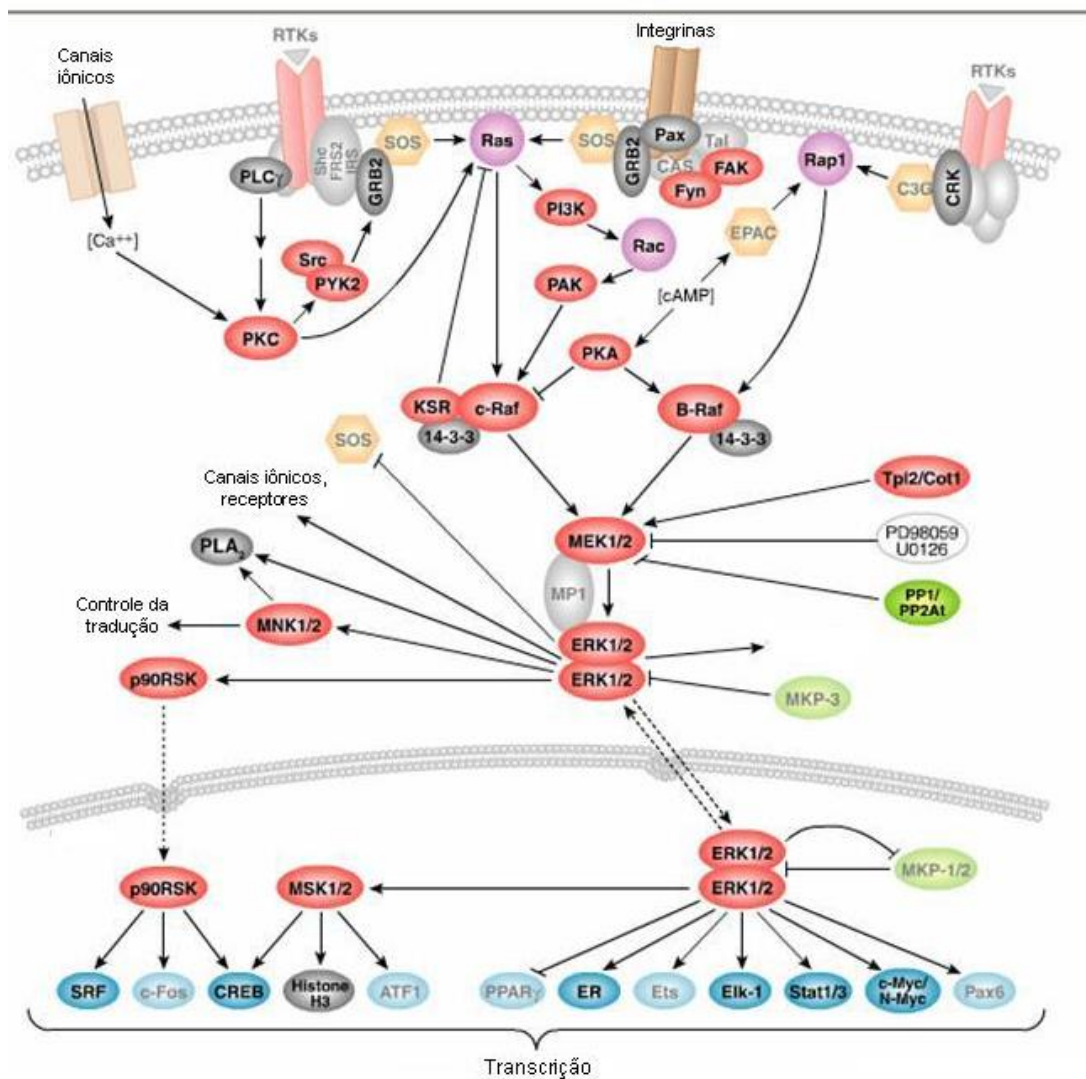


Figura 7: Cascata de Sinalização desencadeada por ERK1/2.

A cascata de sinalização das ERKs é ativada por uma variedade de receptores, incluindo receptor tirosina quinase, integrinas e canais iônicos. Os componentes específicos da cascata variam muito de acordo com os diferentes estímulos mas a arquitetura da via, usualmente, inclui moléculas adaptadoras ligando o receptor a um fator trocador de nucleotídeos guanina transduzindo o sinal para pequenas GTPases, como Ras, que, então, ativa o componente seguinte da cascata, uma MAPKKK (Raf). Esta repassa o sinal para a MAPKK (MEK1/2) chegando a MAPK (ERK). As ERKs ativas podem regular seus alvos no citosol e também translocar-se para o núcleo onde fosforilam uma variedade de fatores de transcrição que regulam a expressão gênica.

(Fonte: www.cellsignal.com)

tirosina e treonina. A amplificação do sinal através desta via é eficiente de tal maneira que estima-se que somente 5% das moléculas de Ras seriam suficientes para induzir uma ativação acentuada de ERK (Pouysségur et al, 2002, Hallberg et al, 1994).

2.4.2.2 - Substratos de ERK

ERK1 e 2 têm como substrato proteínas de membrana, proteínas citoplasmáticas e do citoesqueleto, além de outras quinases e fatores de transcrição (figura 7). As proteínas quinases formam um conjunto de alvos de ERK1 e 2. Estas incluem RSK1, RSK2, RSK3, MAPKAP quinase-2, MAPK que interage com quinase (Mnk) 1 e 2. Após serem fosforiladas por ERK e então ativadas, as RSKs fosforilam alvos envolvidos na ativação transcricional, como o elemento de resposta ao AMP cíclico (CREB), o coativador CBP, c-Fos, o fator de resposta ao soro e o receptor de estrógeno (Pearson et al, 2001). Outros substratos de ERK, já comentados anteriormente, são as MNKs que são ativadas por estímulos mitogênicos através de ERK e estímulos de estresse através de p38. Também as MAPKAP quinase 2 e 3 e MSK são substratos comuns entre ERK e p38. A fosfolipase A2 citossólica é outro substrato fisiológico de ERK. Assim como, MNKs, PLA2 também é objeto de regulação comum por ERK e p38 (Hazan-Halevy et al, 2000).

Assim como as outras MAPKs, as ERKs são capazes de modular a expressão gênica diretamente pela fosforilação de fatores de transcrição ou por outras proteínas quinases (RSKs, MNKs). Os membros da família AP-1 fosforilados por ERK incluem c-Jun, c-Fos, e ATF-2. A proteína que se liga ao domínio ETS, Elk-1; e outras proteínas que formam o complexo ternário como SAP-1 e -2, também são fosforiladas por ERK (Pearson et al, 2001).

2.4.4 - Inativação das MAPKs

A duração e amplitude da ativação das MAPKs representa um balanço entre os mecanismos de ativação e inativação. A remoção de um ou ambos os fosfatos

dos grupos de tirosina, serina/treonina por fosfatases de dupla especificidade reduz a atividade das MAPKs.

Um número substancial de fosfatases de dupla especificidade conhecidas como fosfatases de MAPKs (MKPs) são funcionais na inativação das MAPKs em tempos apropriados e localização celular. As MKPs estão divididas em dois grupos: as que são codificadas por genes indutíveis por fator de crescimento ou estresse e são localizadas primariamente no núcleo, ou as que não são intensamente reguladas pela transcrição e são localizadas no citoplasma. As diferenças na localização e indução implicam em diferenças temporais e espaciais na inativação que estas podem produzir. Especificidade de diferentes MKPs para diferentes membros da família de MAPKs tem sido sugerida em estudos *in vitro* e em células que muitas vezes têm resultados diferentes (Pearson et al, 2001).

2.5 - Fator de transcrição c-Jun

c-Jun foi originalmente identificado como o correspondente celular da oncoproteína viral v-Jun codificada pelo vírus do sarcoma aviário. A proteína de 39 kDa é o protótipo de um grande grupo de proteínas que contêm zíper de leucina e formam complexos homo- e heterodímeros capazes de reconhecer e se ligar à seqüências de DNA do elemento de resposta ao TPA (TRE). Estes dímeros podem ser formados por Jun, Fos, ATF/CREB e família Maf, e coletivamente estes complexos formados por estes fatores de transcrição são chamados proteína ativadora transcricional-1 (AP-1). Embora o repertório de complexos AP-1 varie entre diferentes tipos celulares, c-Jun é um componente dominante em muitas células (revisto em Dunn et al, 2002).

Estudos identificaram as serinas 63 e 73 como os principais sítios de fosforilação de Jun, embora as treoninas 91 e 93 também podem ser fosforiladas sobre certas circunstâncias. As serinas 63 e 73 são um potencial substrato para a fosforilação por MAPKs. Inicialmente, foi demonstrado a MAPK ERK como ativadora de Jun. No entanto, pouco depois foi demonstrado

que c-Jun é um alvo específico das JNKs, sendo que *in vitro* estas MAPKs demonstram fosforilar avidamente c-Jun, enquanto ERK não (Dunn et al, 2002).

A via JNKs/c-Jun tem sido implicada em importantes funções como proliferação celular, tumorigênese, apoptose e morfogênese do embrião. O papel de Jun tem se mostrado essencial na proliferação desde que fibroblastos de camundongos deficientes em Jun exibem uma profunda senescência em cultura de células (Schreiber et al, 1999). Além disto, inativação de c-Jun em embriões demonstram a importante função deste fator no desenvolvimento do crescimento e regeneração do fígado (revisado em Weiss & Bohmann, 2004).

Também tem sido associado à c-Jun, um papel relacionado à tumorigênese. Assim, c-Jun contribui com a formação de tumores de fígado e pele . Uma explicação deste efeito pode ser devido à c-Jun antagonizar a função anti-proliferativa do supressor de tumor p53. A interação genética de c-Jun e p53, aparentemente, também controla o desenvolvimento, regeneração e formação de tumor em fígado de camundongos (Eferl et al, 2003).

Paradoxalmente, existem vários estudos relacionando a ativação da via JNK/c-Jun também à apoptose em células neuronais em resposta à estresse. Muitos destes estudos têm relacionado FasL como o efetor da apoptose sendo que a participação de JNK/ c-Jun se faz através da ligação de AP-1 aos elementos TRE no promotor de FasL (revisado em Dunn et al, 2002).

Como já discutido no tópico sobre JNK, muitos autores discutem que a sinalização de JNK/c-Jun, em respostas biológicas complexas e antagônicas como proliferação e apoptose, deve ser avaliada levando em consideração que esta sinalização é altamente dependente do contexto celular.

2.6 - Papel das MAPKs na Infecção viral

Nos últimos anos aumentou abruptamente o número de trabalhos que relacionam as MAPKs à infecções por patógenos. Isto não é totalmente surpreendente, principalmente no caso de infecções virais, visto que os vírus

são dependentes da célula hospedeira, enquanto que as funções primordiais desta, têm as MAPKs como proteínas moduladoras. Portanto, a ativação ou inibição destas vias durante a infecção pode ser uma estratégia viral pra assegurar o sucesso replicativo, como também, algumas vezes observa-se como uma resposta celular no intuito de conter a infecção.

Sendo assim, diversos vírus de variadas famílias estão descritos na literatura como moduladores das MAPKs. Vários exemplos podem ser citados onde a infecção viral induz a sinalização de uma ou mais quinases. Um deste é o picornavírus Coxsackievirus B3 que é objeto de estudo desde 2002 quando Luo e colaboradores caracterizaram a ativação das MAPKs ERK1/2 através da sinalização de Ras-Raf-MEK e a inibição desta via através de inibidores farmacológicos resultam em uma redução significativa da progênie viral. Este mesmo grupo, no trabalho de Si e colaboradores 2005, demonstram que além da via de ERK1/2, a infecção viral leva à ativação das vias de JNK1/2 e p38 e do fator de transcrição ATF-2 e da proteína “heat-shock” 27. Ainda, através do uso de inibidores, foi detectado que a inibição de JNK1/2 não tem impacto relevante na replicação viral, mas resulta em uma significativa redução da liberação da progênie viral da célula infectada.

Também a relação do vírus Herpes Simples Tipo 1 (HSV-1) com as MAPKs tem sido estudada desde 1999, quando Zachos e colaboradores descrevem a estimulação de p38 e JNK durante a infecção e diretamente relacionado a esta a ativação do complexo transcricional AP-1. Logo depois, McLean e Bachenheimer, 1999, demonstram que a já descrita indução de JNK acentua a replicação viral e sua inibição causa um decréscimo de 70% nesta. Posteriormente, Hargett e colaboradores em 2005, determinaram o gene viral necessário para a ativação de JNK e p38.

A ativação de MAPKs durante infecção viral também pode ser uma resposta antiviral inata. No caso do *Influenza virus*, durante a infecção ocorre a indução da via de JNK e como consequência desta a formação do complexo transcricional AP-1 formado pelos fatores c-Jun, c-Fos, e ATF-2. No entanto, esta sinalização constitui numa resposta antiviral à infecção, visto que a

inibição leva a um aumento da multiplicação viral, devido à via JNK ser crítica para ativação do promotor de IFN- β (Ludwig et al, 2001).

Desta forma, a indução de vias sinalizadoras pela infecção viral deve ser um fenômeno analisado cuidadosamente para verificar se a natureza da indução ocorre devido à uma estratégia viral que beneficia a sua replicação em algum estágio, ou se trata de uma resposta imune inata antiviral do hospedeiro com intuito de conter o espalhamento da infecção. Ainda, deve se levar em consideração que, de modo algum, vírus pertencentes à mesma família ou gênero ao induzir determinada via de sinalização irá culminar com a mesma resposta biológica. Exemplos já citados como no caso do *Myxoma virus* e VACV que induzem a via de MEK/ER1/2 cuja ativação é abortiva para o primeiro e vital para o segundo (Wang et al, 2004, Andrade et al, 2004). Também, em trabalho realizado por Silva e colaboradores, 2006, demonstra que os Orthopoxvirus, VACV e CPXV induzem a via MEK/ERK1/2/EGR-1. Esta é de suma importância para o VACV, mas não demonstra relevância no que diz respeito à multiplicação, para o CPXV, pois sua inibição não altera a geração da sua progênie

3 - OBJETIVOS

3.1 – Objetivo geral

Analisar a estimulação das MAPKs JNK1/2 e ERK1/2 durante o ciclo replicativo do Orthopoxvírus *Vaccinia* e estabelecer o(s) significado(s) funcional(is) para sua biologia.

3.2 – Objetivos específicos

Verificar a cinética de ativação da MAPK JNK1/2 durante todo o ciclo infeccioso do VACV (3-36 hpi)

Caracterizar a via de sinalização que leva à ativação de JNK1/2 durante o ciclo infeccioso do VACV (3-36 hpi)

Verificar a cinética de ativação da MAPK ERK1/2 durante todo o ciclo infeccioso do VACV.

Verificar se a ativação das MAPKs JNK1/2 e ERK1/2 durante a infecção viral, leva à fosforilação do fator de transcrição c-Jun.

Verificar o papel desempenhado por JNK1/2 durante o ciclo infeccioso do VACV.

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

4.1.1 - Células VERO

As células VERO, as quais são fibroblastos de linhagem contínua, derivadas de rim de macaco verde (*Cercopithecus aethiops*), foram obtidas originalmente da “American Type Culture Collection” (ATCC), Maryland, USA, na passagem de nº 126, sendo cultivadas por um desconhecido número de vezes em nosso laboratório. Estas células foram utilizadas para a multiplicação e titulação do VACV e VACV deletado para VGF (VACV VGF⁻). Foram cultivadas em meio mínimo de Eagle autoclavável (Auto pow) ou filtrado, suplementado de 5% de soro fetal bovino (SFB), e com os antibióticos fungizona (5µg/mL), penicilina (200U/mL) e gentamicina (20µg/mL) e mantidas a 37 °C em ambiente de 5% de CO₂.

4.1.2 - BSC-40

As células BSC-40 são células tipo epiteliais derivadas de rim de macaco verde (*Cercopithecus aethiops*). Foram gentilmente cedidas pelo Dr. Bernard Moss, NIH, USA. São cultivadas em meio MEM autoclavável ou filtrado, suplementado de 5% de soro fetal bovino e os mesmos antibióticos utilizados para células VERO (veja item anterior). Estas células foram utilizadas para a produção do *Vaccinia virus* termo-sensível para o gene B1R.

4.1.3 - Células A31

As células A31, derivadas de fibroblasto de camundongo Balb/c 3T3, foram cultivadas em meio DMEM, suplementado de 7% de SFB e os mesmos antibióticos utilizados para as células VERO. Estas células foram gentilmente cedidas pelo Dr. Hugo A. Armelin / Dra. Maria Sogayar, ambos do Departamento de Bioquímica da USP.

4.1.4 - Células MEF WT, MEF JNK^{-/-}, MEF MKK4^{-/-}, MEF MKK7^{-/-} e MEF MKK4/7^{-/-}

As células, derivadas de fibroblasto de camundongos embrionários, MEF WT e as respectivas nocautes para os genes codificadores para as proteínas da via de JNK: MEF JNK^{-/-}, MEF MKK4^{-/-}, MEF MKK7^{-/-} e MEF MKK4/7^{-/-}, foram cultivadas em meio DMEM, suplementado de 5% de SFB e os antibióticos penicilina (200U/mL) e gentamicina (20µg/mL) sendo mantidas a 37° em uma atmosfera de 5% de CO₂. Estas células foram gentilmente cedidas pelo Dr. Roger Davis da Universidade de Massachussetts, EUA.

Para a análise da ativação de proteínas quinases ou fatores de transcrição, multiplicação viral, extração de RNA ou DNA total, fenótipo de placa, as células A31, MEF WT, MEF JNK^{-/-}, MEF MKK4^{-/-}, MEF MKK7^{-/-} e MEF MKK4/7^{-/-} foram carenciadas utilizando-se 1% de SFB por 12 horas. A etapa seguinte, na maioria dos experimentos, envolveu a adsorção/infecção das células quiescentes com o vírus VACV WR (selvagem) ou deletado para o gene VGF (VACV-VGF⁻) ou vírus mutante termo-sensível B1R. Nos experimentos onde drogas foram utilizadas, as células eram pré-tratadas por 30 minutos, sendo posteriormente infectadas.

4.2 - Vaccinia virus

O *Vaccinia virus* WR (Western Reserve) foi cedido pelo Dr. C. Jungwirth (Universität Würzburg, Germany). O VACV deficiente em VGF (vSC20) e o vírus mutante B1R temperatura-sensível foram gentilmente cedidos pelo Dr. B. Moss, NIH, USA e Dr. Richard Condit, Universidade da Florida, USA, respectivamente. O vírus B1R termo-sensível (B1Rts) contém uma mutação cuja proteína é não funcional a temperatura de 39°C. Os vírus foram multiplicados em células VERO (VACV WR e VACV deletado para VGF) ou BSC-40 (para VACV termo-sensível B1R), sendo que para os experimentos o estoque de vírus trabalho foi primeiramente purificado em colchão e gradiente de sacarose conforme método descrito por Joklik, 1962.

4.3 - Multiplicação e purificação do Vaccinia virus

Os estoques de VACV selvagem e mutantes foram obtidos após infecção e propagação em células VERO ou BSC-40, crescidas em garrafas redondas, mantidas a 37 °C ou 32 °C (VACV B1Rts) em tambor rolante em meio MEM acrescido de todos os antibióticos já relacionados. Monocamadas de células recém-confluídas foram infectadas com os VACV, utilizando-se a multiplicidade de infecção (MOI) de 0,01 unidade formadora de placa (UFP) por célula em meio sem SFB. Após uma hora de adsorção, o inóculo de vírus foi removido e substituído por meio contendo 1% de SFB e antibióticos. A seguir, as células foram mantidas a 37 °C (ou 32°C para VACV B1Rts), e monitoradas ao microscópio óptico até o aparecimento de 90% de efeito citopático (cerca de 48 horas após a infecção), quando, então, foram lavadas em PBS 1x, coletadas (raspadas) e congeladas para a posterior purificação.

A purificação, resumidamente, envolveu as seguintes etapas: após aparecimento de 90% do ECP, as culturas foram lavadas duas vezes com PBS1x, desprendidas das garrafas com o auxílio de um bastão de borracha, e centrifugadas a 2000 rpm por 10 minutos a 4 °C (rotor A384-Sorvall RT6000 B). Em seguida, foram lisadas mecânica e quimicamente, utilizando-se um macerador (“Douncer”), e o tampão de lise (1mM de MgCl₂; 10mM de Tris-HCl pH7.0; 10mM de KCl), e centrifugadas a 2500 rpm por 15 minutos. O sobrenadante (suspensão viral e restos celulares) foi coletado e centrifugado a 14000 rpm por 2 horas a 4 °C em colchão de sacarose a 36% (rotor AH 629 Sorvall). O sedimento foi ressuspendido em tampão Tris- HCl 10 mM, pH 8.0, e submetido à sonicação por 2 ciclos de 30 segundos (Sonic Desmembrator-50, Fisher Scientific-USA). A seguir, a suspensão viral foi centrifugada em gradiente de sacarose variando de 25 a 40% a 12000 rpm por 45 minutos a 4 °C (rotor AH 629 Sorvall). A banda inferior, correspondente aos vírions (partículas virais completas e infectivas), foi coletada e centrifugada em tampão Tris- HCl 10 mM, pH 8.0 a 20000 rpm por 1 hora a 4 °C (rotor AH 629 Sorvall), para a remoção da sacarose. O sedimento foi coletado, ressuspendido no

mesmo tampão, aliquotado e congelado a -70 °C, para posterior titulação e uso nos diferentes experimentos.

4.4 - Titulação dos Vaccinia virus

As titulações dos estoques obtidos de vírus foram realizadas de acordo com o método descrito por Campos & Kroon, 1993. Foram utilizadas células VERO cultivadas em placas de seis câmaras. Resumidamente, as células VERO foram crescidas por 18 horas em meio MEM 5% SFB, sendo $1,5 \times 10^6$ células/câmara. Duzentos µl de uma série de diferentes diluições, realizadas na razão de 10, da suspensão contendo vírus a ser titulado, foram inoculadas às culturas recém confluídas, sendo uma mantida como controle. Após 1 hora de adsorção, o meio de inóculo foi removido e meio MEM contendo 1% de SFB foi adicionado. A revelação foi feita 48 horas pós-infecção através da fixação das culturas com formaldeído a 10% em PBS 1x e coloração com solução 0,3% (p/v) de cristal violeta em álcool 20%. As diluições contendo entre 30 e 300 placas de lise foram contadas, tiveram a diluição corrigida e utilizadas para determinação do número de unidades formadoras de placas virais (UFP) por mL de estoque.

4.5 - Plasmídios

Os plasmídios pcDNA3-JNK1DN, pcDNA3-JNK2DN (expressando dominâncias negativas para JNK1 e JNK2), pcDNA3-JNK1WT e pcDNA3-JNK2WT (expressando os genes selvagens de JNK1 e JNK2) foram gentilmente cedidos pelo Dr. Roger Davis (Universidade de Massachussetts, EUA).

4.6 - Anticorpos e drogas

Os anticorpos anti fosfo-p44/42 MAPK (Thr 202/Tyr 204), fosfo-JNK/SAPK, fosfo-c-jun e anti-IgG de coelho conjugado a peroxidase foram adquiridos da Cell Signaling Technology – Beverly, MA, USA. O anticorpo anti-H3L foi gentilmente cedido Pelo Dr. Bernard Moss (NIH-USA). Os inibidores farmacológicos de MEK, PD98059 e UO126 foram, respectivamente, adquiridos da Calbiochem, La Jolla, USA e Cell Signalling Technology -

Beverly, MA, USA. O inibidor farmacológico de JNK1/2, SP600125 foi adquirido da Calbiochem, La Jolla, USA. A droga Citosina Arabinosídeo (inibidor da replicação do DNA) foi adquirida da Sigma-Aldrich Co, São Paulo.

4.7 - Transferência de “Western”

Para analisar as possíveis proteínas quinases ou fatores de transcrição ativados durante a infecção pelo VACV, as células foram cultivadas até 90% de confluência e carenciadas conforme descrito acima e infectadas, utilizando-se a multiplicidade de infecção (MOI) 10,0 pelos tempos indicados. Quando apropriado, as células foram previamente tratadas com os inibidores farmacológicos: PD98059, UO126, SP600125, 30 minutos antes da infecção, os quais foram mantidos durante a mesma. A seguir, as células foram coletadas e processadas para obtenção de um lisado de proteínas totais. Para isso, as células foram lavadas duas vezes em PBS 1x em gelo e adicionadas (200 µL/placa) do tampão de lise: [20mM de Tris acetato, pH 7.0, 0.27M de sacarose, 1mM de EDTA, 1mM de EGTA, 1% de Triton X-100, 10mM de β-glicerofosfato, 50mM de NaF, 5mM de pirofosfato de sódio, 4µg/ml de leupeptina, 1mM de orthovanadato de sódio, 1mM de benzamidina, 0.1% (v/v) de 2-mercaptoetanol]. As células foram deixadas em repouso sobre o gelo por 30 minutos, quando as monocamadas foram raspadas com o auxílio de um bastão de borracha e coletadas em tubos eppendorf. O lisado foi clarificado dos restos celulares através de centrifugação a 13000 rpm por 10 minutos a 4 °C em uma centrífuga Eppendorf modelo 5417R. O sobrenadante foi coletado, e a concentração das proteínas totais foi determinada por espectrofotometria através do “Kit Bio-Rad Assay” (Bio-Rad Laboratories USA). As proteínas foram aliqüotadas e mantidas a –70 °C até o momento do uso.

Quarenta µg das proteínas totais foram fracionadas em gel de poliacrilamida/SDS (PAGE) a 10% a 100 V por 1,5 h e transferidas para membrana de nitrocelulose, com recomendações do “Kit Bio-Rad Transference” (Bio-Rad Laboratories USA). As membranas foram bloqueadas por 1 hora à temperatura ambiente, utilizando-se PBS 1X, contendo 5% de leite em pó desnatado. A seguir, as membranas foram lavadas 3 vezes em PBS, contendo

0,1% de Tween-20 e incubadas com anticorpos primários por 18 a 20 h, nas diluições recomendadas pelos fabricantes e padronizadas em laboratório, em PBS contendo 5% (p/v) de albumina sérica bovina BSA e 0.1% de Tween-20. As membranas foram novamente lavadas 3 vezes em PBS, contendo 0,1% de Tween-20 e incubadas por 1 hora com o anticorpo secundário conjugado com peroxidase, na diluição recomendada pelo fabricante e padronizada em laboratório, em PBS 1X, contendo 5% de leite em pó desnatado. Após, nova e última seção de lavagens em PBS/Tween 20, as membranas foram incubadas com solução reveladora "ECL-Plus" (GE Healthcare), e expostas contra filme de raio X (Hyperfilm ECL, GE Healthcare), e revelados utilizando-se revelador e fixador (Kodak), de acordo com indicações do fabricante.

4.8 - Extratos protéicos nucleares

Em alguns experimentos foram utilizados extratos de proteínas nucleares que foram preparados de acordo com o método descrito por Dignam *et al.* (1983). Resumidamente, após a lavagem das células com PBS 1X o sobrenadante foi completamente descartado. Em seguida, adicionou-se 1,5 ml de PBS 1X sendo as células raspadas mecanicamente, transferidas para um tubo de microcentrífuga de 1,5 ml e centrifugadas a 3.500 rpm por 5 minutos a 4°C (microcentrífuga Eppendorf 5417R). O sobrenadante foi completamente descartado, sendo o centrifugado adicionado de 900µl do tampão RSB1X (Tris 10mM PH 7,4, NaCl 10mM, MgCl₂ 3mM, NaN₃ 0,002%, PMSF 1mM, EGTA 0,1mM, Aprotinina 10µM, Leupeptina 20µM, DTT 0,5mM) e deixado no gelo por 20 min. A seguir, foram adicionados 100 µl de NP-40 a 5%, sendo a mistura invertida por várias vezes e deixada em banho de gelo por 5 minutos quando foi centrifugada a 6000 rpm por 5 min a 4°C. Novamente o sobrenadante foi descartado, sendo os núcleos celulares (sedimento) lavados com RSB 1X e centrifugados 900 rpm por 5 min a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi totalmente removido, sendo os núcleos celulares ressuspensos em 60 µl do tampão C a 4°C (HEPES 20mM PH 7,4, NaCl 0,42M, MgCl₂ 1,5mM, NaN₃ 0,01%, EDTA 0,2mM, Glicerol 25%, PMSF 1mM, Aprotinina 10µM, Leupeptina 20µM, DTT 0,5mM), e deixados no gelo por 30 – 40 min. Os tubos foram agora

centrifugados 12000 rpm 10min a 4°C, sendo o sobrenadante removido transferido para um novo tubo e adicionado de igual volume de tampão D (HEPES 20mM pH 7,4, KCl 50mM, NaN₃ 0,01%, EDTA 0,2mM, Glicerol 20% v/v, PMSF 1mM, Aprotinina 10µM, Leupeptina 20µM, DTT 0,5mM), homogeneizados, aliquotados e estocados a -70°C até o momento de uso. A concentração das proteínas foi determinada por espectrofotometria através do “Kit Bio-Rad Assay” (Bio-Rad laboratories, USA).

4.9 - Análise das interações DNA/Proteínas

Ensaio do retardamento da mobilidade eletroforética

As células A31 cultivadas e carenciadas conforme descrito anteriormente foram infectadas, utilizando-se a MOI de 10,0 e coletadas nos tempos indicados. Quando apropriado, as células foram previamente tratadas com inibidor farmacológico por 30 minutos antes da infecção, os quais foram mantidos durante a infecção. O extrato proteico foi processado conforme descrito anteriormente. Para realizar a análise do retardamento da mobilidade eletroforética (EMSA) utilizando extratos de proteínas celulares totais ou nucleares, 10 µg de proteínas foram pré-incubadas com 1,2 µL de poly dI-dC, (Pharmacia, São Paulo, Brasil) (5.4 mg/mL) à temperatura ambiente por 10 minutos, seguido da adição de 1.25 µg de BSA, 0.125 µg de DNA de *E. coli*, 0.25 µg de tRNA de levedura, 2% de Ficoll 400 e 0.32 ng (4-10 x 10⁴ cpm/amostra) das sondas CRE, AP-1 ou NFκB marcadas na extremidade conforme descrito em tópico abaixo. As reações foram incubadas à temperatura ambiente por 15 minutos e então submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) a 6% por 2 horas a 150 V. A seguir, o gel foi recolhido com o auxílio de papel de filtro, desidratado em secador *DRYGEL Sr Slab Gel Dryer* (Hoefler Scientific Instruments San Francisco) e exposto contra filme de raio X Kodak GBX 6493050 (Kodak, USA), sendo revelados utilizando-se revelador e fixador Kodak, conforme indicação do fabricante.

4.10 - Extração do RNA celular total

Para a extração do RNA total, as células foram coletadas e processadas de acordo com o método de Chomczynski & Sacchi, 1987, com algumas

modificações. Resumidamente, as culturas foram lavadas três vezes em PBS e adicionadas de 1,2 ml/placa de solução de RNAzol (isotiocianato de guanidina 4M e fenol v/v). As culturas foram deixadas em repouso no banho de gelo por 40 minutos e homogeneizadas em seguida, utilizando-se pipetas de Pasteur autoclavadas, sendo os fluidos transferidos para tubos de microcentrifuga, previamente adicionados de 10% v/v de clorofórmio (MERCK). A mistura foi então homogeneizada vigorosamente por 30 segundos em vortex, seguida de incubação por 15 minutos em banho de gelo. A seguir, o material foi centrifugado a 13500 rpm em microcentrifuga (Eppendorf 5417R) por 15 minutos a 4°C. A fase aquosa foi coletada e transferida para outro tubo de microcentrifuga. O RNA foi precipitado através da adição de igual volume de isopropanol, seguido de incubação a -20°C por um período de 16 horas, e centrifugação a 13500 rpm por 30 minutos a 4°C. O sedimento (RNA) obtido foi lavado 2 vezes em etanol 75%, seco à temperatura ambiente e ressolubilizado em H₂O Depec (H₂O deionizada tratada com 0,05% de dietil pirocarbonato por 12 horas, a 4°C e autoclavado por 45 minutos). O RNA foi quantificado por espectrofotometria a 260nm (espectrofotômetro Graphicord-Shimadzu), onde cada DO equivale a 40 µg/mL, e estocado a -70°C. A avaliação do nível de contaminação do RNA por proteínas ou fenol foi feita dividindo-se o valor de A_{260nm} pelo valor de A_{280nm}. Os valores desta relação variam de 1,8 a 2,0 nas preparações puras de RNA (Sambrook *et al.*, 1989).

4.11 - *Fracionamento eletroforético dos RNAs* - (Sambrook et al, 1989)

Para a análise da expressão gênica, 20 µg de RNA celular total de cada amostra foram submetidos ao fracionamento eletroforético em gel desnaturante contendo 1,2 % (p/v) de agarose (BRL), 2.2 M de formaldeído a 37% (Merck) em tampão MOPS (Sigma) [40 mM de ácido morfolino-propano-sulfônico (MOPS), 10 mM de acetato de sódio e 1mM de EDTA, pH 7.0]. Imediatamente antes da corrida, as amostras foram desnaturadas pela adição de 50% (p/v) de formamida (BRL), 15% (v/v) de formaldeído e 10% do tampão MOPS 10X, em volume final de 20 µl e incubadas a 56°C por 15 minutos. Em seguida, a cada amostra foram adicionados 2µl de tampão de amostra 10 vezes concentrado o

qual consiste de 50% de glicerol, 1mM de EDTA, 0.4% (p/v) de azul de bromofenol e 0.4% (p/v) de xilenocianol. As amostras foram aplicadas no gel e a corrida efetuada em tampão MOPS 1X a 90 mA durante 2 a 3 horas com circulação do tampão. A seguir, o gel contendo o RNA foi corado em solução aquosa de brometo de etídio (0.5 µg/ml) por 10 minutos e observado sob iluminação ultravioleta (320 nm). Constatada a integridade do RNA, o excesso de formaldeído do gel foi removido através da incubação, sob agitação, deste gel por 40 minutos em água estéril.

4.12 - Transferência de "Northern" (Sambrook et al., 1989)

Logo após o fracionamento eletroforético dos RNAs em gel de agarose, foi feita a transferência por capilaridade dos RNAs para membrana de nylon (Hybond N, GE Healthcare). O gel foi colocado em uma cuba eletroforética sobre uma ponte feita com papel Whatman 3M entre os dois reservatórios contendo SSC 10X [SSC 20X: 3M NaCl (Merk), 0,3M Citrato de sódio (Merk)]. Sobre o gel foram colocadas sucessivamente a membrana de nylon e 2 folhas de papel Whatman 3M, todos umedecidos em água. Sobre esta montagem foram colocadas pilhas de papel toalha e uma placa de vidro com um peso de 500 gramas para garantir a eficiência da transferência, a qual foi realizada à temperatura ambiente por um período de 18 a 20h. Após a transferência, as posições dos RNAs ribossomais 28S e 18S foram marcadas na membrana de nylon. As membranas foram umedecidas em SSC 1X e a fixação dos RNAs à membrana de nylon foi feita pela exposição à luz UV (320 nm) por 5 minutos. As membranas foram envolvidas em filme de PVC, seladas dentro de saco plástico e guardadas a 4°C até o momento da hibridização.

4.13 - Oligonucleotídeos AP-1, NF-κB e CRE

Os oligonucleotídeos sintéticos correspondentes às sequências regulatórias consenso de AP-1 e CRE e NF-κB, localizados na região 5' de vários genes, foram utilizados em experimentos de retardamento da mobilidade eletroforética (EMSA) em gel de poliacrilamida, podendo assim verificar eventuais ligações protéicas a estas sequências de DNA após infecção viral. Os oligonucleotídeos

correspondentes ao DNA dos elementos regulatórios AP-1 (5' AAGCATGACTCACTCAGG 3'), CRE (5'-TGAGCCCGTGACGTTTAC-3') e NF- κ B consenso (5'-GTTGAGGGGACTTTCCCAGGC-3') e suas sequências complementares foram sintetizados pela Invitrogen, BR.

4.14 - Pareamento e marcação dos oligonucleotídeos sintéticos

Os oligonucleotídeos AP-1, NF- κ B e CRE foram primeiramente pareados, e então marcado isotopicamente. Resumindo, 5 μ g do oligonucleotídeo em cada uma das orientações (5' – 3' e 3' – 5') foram acrescidos de 10 μ L do tampão de pareamento 10X (100mM de Tris-HCl pH7,5; 1mM de EDTA pH 8,0; 1M de NaCl). O volume foi acertado com água deionizada para 100 μ L, de forma que a concentração final de DNA seria de 100ng/ μ L. utilizando-se termociclador (Perkin Elmer Cetus 4800), a reação foi submetida a 88°C por 2 minutos, 65°C por 10 minutos, 37°C por 10 minutos e, por fim, 5 minutos à temperatura ambiente. Após o pareamento os oligonucleotídeos foram estocados a 4°C (Sambrook et al, 1989).

A marcação isotópica foi realizada utilizando-se como nucleotídeo radioativo [γ 32 P] ATP 3000 Ci/mmol (Amersham Bioscience, UK). Resumidamente, em um tubo de microcentrífuga de 1500 μ L adicionaram-se 2 μ L de oligonucleotídeo pareado (200ng), 1 μ L de polionucleotídeo quinase do fago T4 PNK 10u/ μ L (Promega, USA); 2 μ L de Tampão PNK 10X (Promega, USA) e 5 μ L de [γ 32 P] ATP. O volume da reação foi completado para 20 μ L com água deionizada, procedendo-se incubação a 37°C por 60 minutos. Após, o volume foi acrescido de 60 μ L de água e a sonda foi purificada através de cromatografia de filtração em coluna Sephadex G-50 (GE Healthcare) e eluída em água deionizada (adaptado de Sambrook et al, 1989).

As sondas para o mensageiro precoce viral TK e para o DNA viral foram marcadas radioativamente com o Kit Rediprime Random Primer Labelling (GE Healthcare), utilizando-se [α 32 P] dCTP (GE Healthcare) como radioisótopo, com atividade específica de 3000 Ci/mmol. Brevemente, 2,5 a 25 ng de DNA foi

diluído em 45 µl de tampão TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM) pH 8,0 e, posteriormente, aquecido a 95°C por 5 minutos, para desnaturação das fitas de DNA. O DNA foi então adicionado ao conteúdo do tubo (kit Rediprime) sendo a mistura incubada por 20 min a 37°C. Após este tempo, a reação foi interrompida com EDTA 0,2M e a sonda marcada foi purificada através de cromatografia em coluna Sephadex G-50 (GE Healthcare).

4.15 - Quantificação do DNA viral – Ensaio de “dot blot”

As células A31 (10^6 células) foram cultivadas e carenciadas como descrito anteriormente e, então, infectadas com o VACV a MOI de 10,0 por 5, 7, 9 e 12 horas na presença ou ausência de SP600125 (40µM). Após a infecção, as células foram lavadas com PBS 1X, raspadas das placas, coletadas, centrifugadas a 3500 rpm a 4°C por 5 min (centrífuga Eppendorf 5417R) e preparadas como descrito por Rempel et al, 1990. Brevemente, após a centrifugação, as células foram ressuspensas em 0,3 ml de tampão de aplicação (SSC 10X e acetato de amônio 1M). Então, estas células foram congeladas e descongeladas por 3 vezes, seguido pela adição de 0,45 ml de tampão de aplicação. Vinte e cinco µl de cada amostra foram aplicados, sob vácuo, em uma membrana de nylon (Hybond-N – GE Healthcare) usando o aparato HYBRI-DOT Manifold (BRL – Life Technology). A membrana, depois de seca, foi incubada por 30 min com solução de desnaturação (NaOH 0,5M, NaCl 1M). Após, foi lavada 2 vezes por 10 min com SSC 10X [SSC 10X: NaCl 0,15M, citrato de sódio (pH 7,0) 0,015M]. O DNA foi fixado à membrana de nylon pela exposição desta à luz UV (320 nm) por 5 minutos. As condições de hibridização foram as mesmas já descritas para o ensaio de “Northern blot”.

4.16 - Isolamento do DNA viral (Esposito & Knight, 1985)

A extração do DNA foi feita a partir do estoque de vírus purificado. Suspensões contendo vírus em concentrações de 50 DO foram acrescidas de Tris 10 mM pH 8,0 até o volume de 500µl por tubo de microcentrífuga. Em seguida, foram acrescentados 35µl de tripsina (12,5 mg/ml) às amostras e estas foram incubadas durante 45 min a 37°C. As amostras foram, então, centrifugadas a 13500 rpm em microcentrífuga (Eppendorf 5417R) por 15 minutos a 4°C. O

sedimento obtido após centrifugação, foi homogeneizado em 300µl de água esterilizada e a esta solução foi acrescentado igual volume de tampão de lise 2X. As amostras foram incubadas durante 150 min a 37⁰C e submetidas a 3 ciclos de extração com fenol (v/v). Após cada ciclo de extração com fenol, as amostras foram homogeneizadas durante 2 min, centrifugadas em microcentrífuga (Eppendorf 5415C) durante 3 min e só então o sobrenadante foi coletado. Em seguida, cada amostra foi submetida a um ciclo de extração com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (v/v) e a dois ciclos de extração com clorofórmio (v/v). Ao sobrenadante obtido foi adicionado NaCl até a concentração de 150 mM e em seguida 2,5 volumes de etanol gelado. O DNA foi precipitado a -20⁰C durante a noite e depois centrifugado a 13500 rpm (Eppendorf 5417R) por 15 min a 4⁰C. O sedimento obtido foi lavado duas vezes com etanol 70%, seco a temperatura ambiente e ressuspenso em 50µl de água esterilizada e estocado a -20⁰C.

4.17 - Curva de Multiplicação do Vaccinia virus

As células A31, MEF WT e MEF JNK^{-/-} foram contadas, implantadas em placa de 6 poços. As células foram carenciadas por 12 horas em DMEM acrescido de antibióticos e 1% de SFB. Após este período, as células foram infectadas com MOI de 10,0 durante o tempo de 3, 6, 12, 24, 36 e 48 horas. Nos tempos determinados, o meio foi descartado e as células lavadas duas vezes com PBS1X. Após o excesso de PBS ser descartado, acrescentou-se mais um 1mL e as células foram congeladas. Estas sofreram 3 congelamentos e descongelamentos sucessivos e logo após, o lisado celular recuperado foi centrifugado a 2500 rpm por 3 minutos a 4⁰C. Em seguida, o sobrenadante foi titulado em células VERO.

4.18 - Extração de DNA plasmidial

Todos os plasmídios deste trabalho foram multiplicados em bactérias *E. coli* DH5α após transformações das mesmas. Com a transformação, três colônias foram recolhidas ao acaso e crescidas em 10 mL de meio LB 1X a 37⁰C por 14 horas, quando o DNA plasmidial foi extraído utilizando o kit "Wizard plus

minipreps DNA purification system” da Promega – USA. Após a extração o plasmídeo foi fracionado e quantificado e, posteriormente, digerido com enzimas de restrição para confirmação da liberação do inserto de tamanho esperado. Alíquotas da cultura dos clones foram congeladas em glicerol 50% v/v e congeladas em freezer -70°C.

Os clones selecionados na digestão, foram crescidos em 500mL de meio LB 1X e o DNA plasmidial foi preparado em larga escala (Maxi-prep), através do método de Lise alcalina (Sambrook et al, 1989), para obtenção de quantidade de DNA plasmidial suficiente para realização de experimentos.

4.19 - Ensaio de Fenótipo de Placa de Lise Viral

As células MEF WT e MEF JNK^{-/-} foram contadas e implantadas em placas de 6 poços. Em seguida, as células foram carenciadas com meio DMEM acrescido de antibióticos e 1% de SFB por 12 horas. Após este período, as células foram infectadas com VACV WR utilizando-se 50 UFP. Após adsorção de 1 hora, foi adicionado aos poços meio DMEM acrescido de agarose em uma concentração final de 0,3% para formar um meio semi-sólido. Após 48 horas de infecção, as células foram fixadas com formaldeído a 10% e coradas com solução 0,3% de cristal violeta em álcool a 20%.

4.20 – Ensaio de titulação das formas virais EEVs

As células MEF WT e MEF JNK^{-/-} foram contadas, implantadas em placas de 6 poços. Estas foram carenciadas com meio DMEM acrescido de antibióticos e 1% de SFB por 12 horas. Após este período as células foram infectadas com MOI 10,0 por uma hora. Após este período, o meio da célula foi retirado, as células foram lavadas com PBS1X duas vezes e acrescida de 1mL de novo meio DMEM com 1% de SFB por 36 horas. Após este período o meio foi retirado, centrifugado e incubado sob agitação por uma hora com o anticorpo contra a proteína L1R (1:1000) presente apenas nas formas IMV (Wolffe et al, 1995). O uso deste anticorpo neutraliza as formas IMV, sendo assim, somente

as formas EEV permanecem infectivas. Após este período o sobrenadante foi processado para titulação do EEV.

As monocamadas também foram processadas como descrito no tópico de curva de multiplicação viral e posteriormente foram processadas para titulação do IMV.

4.21 – ELISA

Células MEF WT e MEF JNK^{-/-} foram plaqueadas e posteriormente carenciadas por 12 horas. Após este período as células foram infectadas com MOI 10,0 por 36 horas. Os sobrenadantes foram coletados, centrifugados a 3000rpm por 5 minutos, aliqüotados e congelados a -70°C. As concentrações de IL-6 no sobrenadante de células foram determinadas através da técnica de ELISA sanduíche, onde foram utilizados pares de anticorpos e padrões de quimiocinas para IL-6, TNF- α e IL-10 (Pharmlingen). As instruções dos fabricantes para a realização dos ensaios foram seguidas. No caso dos ensaios de ELISAS montados com pares de anticorpos foi utilizado um protocolo geral, sintetizado a seguir: A uma placa de 96 poços foram adicionados 100 μ l de uma solução contendo concentração adequada do anticorpo de captura. Esta solução permaneceu em contato com a placa durante 18 h a 4°C e a placa foi lavada 5 vezes com PBS/Tween 0,1% em um lavador automático. Logo após, foram adicionados 200 μ l de solução de bloqueio contendo 1% de albumina de soro bovino em PBS. O tempo de bloqueio foi de 2h. Foram adicionados os padrões de citocinas em concentrações conhecidas e as amostras. As placas foram incubadas por mais 18 h a 4°C. Após este período, foram adicionados, então, 100 μ l de uma solução de anticorpo de detecção, que foi incubado por 1h. Transcorrido este período e após lavagem, foi adicionada à placa uma solução contendo estreptavidina ligada à peroxidase (Pharmlingen). Após 30 min, a placa foi novamente lavada e foi adicionado o tampão substrato contendo o-fenilenodiamina (OPD, Sigma) e H₂O₂ (Merck). A reação foi interrompida com 50 μ l de H₂SO₄ 1M. O produto de oxidação do OPD foi detectado por colorimetria em um leitor de ELISA no comprimento de onda de 492nm, após a parada da reação com ácido sulfúrico a 1 M.

5 - RESULTADOS

5.1 - O fator de crescimento do *Vaccinia virus* não é essencial para a fosforilação das MAPKs JNK1/2.

Durante a minha dissertação de mestrado em 2002, foi realizado um estudo da fosforilação das MAPKs JNK e p38 durante o período de infecção de 1 a 8 horas onde se observou que JNK e p38 apresentavam-se fosforiladas a partir de 2 até 8 horas de infecção, último tempo analisado. Neste mesmo estudo, foi demonstrada a fosforilação de ERK1/2 utilizando-se uma MOI baixa (1,0) até 30 horas de infecção e também a participação do fator de transcrição *Elk-1*. Estes últimos dois resultados foram publicados em Andrade e colaboradores em 2004.

O *Vaccinia virus* codifica, durante período precoce do seu ciclo de multiplicação, uma proteína denominada fator de crescimento do *Vaccinia virus* que é análogo ao fator de crescimento epidérmico (EGF) e ao fator de crescimento transformante alfa (TGF-alfa) (Blomquist et al, 1984). O VGF é secretado no meio extracelular e se liga ao receptor de EGF presente nas células, desta forma ativando-o (Tzahar et al, 1998).

Em um primeiro momento, para caracterizar a ativação de JNK1/2, queríamos responder se esta seria dependente do fator de crescimento do VACV (VGF). Esta dúvida persistia uma vez que na dissertação de mestrado, observamos que a infecção com o VACV-VGF⁻ não induzia a fosforilação de JNK1/2 em experimento realizado em células A31 infectadas com MOI 10,0 nos tempos de 2 a 6 horas, com uma ativação semelhante ao nível basal no tempo de 8 horas. A partir disto, imaginamos que a fosforilação de JNK pudesse ser dependente da expressão de VGF. No entanto, isto poderia também ocorrer porque a infecção pelo VACV-VGF⁻ costuma ser mais lenta e ter um rendimento bem menor que o do vírus selvagem. Então, poderia ser este o motivo de até este momento da infecção não observarmos a fosforilação de JNK. Para testar esta hipótese, resolvemos realizar a infecção em uma MOI maior. Para isto, utilizamos células A31 cultivadas até 80% de confluência que foram carenciadas por 12 horas com meio contendo 1% de SFB e, após este período,

infectadas com o VACV WR e VACV VGF⁻ utilizando-se MOI de 10,0 e 50,0 durante quatro horas de infecção. Proteínas celulares totais foram extraídas para a transferência de “Western”.

Como podemos observar na figura 8, utilizando-se a MOI de 50,0 (canaleta 5), a infecção pelo VACV VGF⁻ leva à fosforilação de JNK, ainda que reduzida em relação ao vírus selvagem (canaleta 3). Este resultado nos sugere, portanto, que a fosforilação de JNK1/2, apesar de mais acentuada, é independente da expressão de VGF.

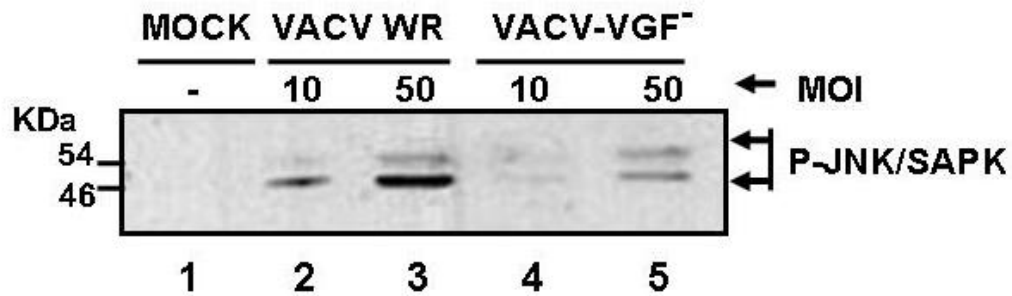


Figura 8: Análise da participação do fator de crescimento do *Vaccinia virus* na fosforilação de JNK1/2 durante a infecção utilizando diferentes MOIs.

Células A31 crescidas e carenciadas foram não infectadas (MOCK) ou infectadas com o VACV WR ou VACV VGF⁻ utilizando-se MOI de 10,0 e 50,0 por 4 horas. Após este período, as células foram coletadas e as proteínas totais extraídas e quantificadas. As proteínas totais (40µg/amostra) foram fracionadas por eletroforese em gel de poliacrilamida/SDS (SDS-PAGE). A seguir, foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, onde foi feita a reação com o anticorpo anti fosfo-JNK1/2 (1:1000). A massa molecular das proteínas está indicada à esquerda em kilodaltons (KDa).

5.2 - A infecção pelo *Vaccinia virus* leva à ativação da via de JNK1/2.

A partir do resultado que durante a infecção viral pelo VACV ocorria a fosforilação das SAPKs JNK1/2 nos tempos analisados de 2 a 8 horas de infecção, decidimos analisar mais detalhadamente esta via.

Com o intuito de caracterizar melhor a fosforilação destas quinases, resolvemos verificar o padrão de fosforilação de JNK1/2 até tempos tardios. Para isto, utilizamos células A31 cultivadas até 80% de confluência que foram carenciadas por 12 horas com meio contendo 1% de SFB e, após este período, infectadas com o VACV utilizando-se a MOI de 10,0.

Observamos, então na figura 9, que a fosforilação de JNK1/2 ocorre até o último tempo analisado aqui, de 36 horas de infecção viral. Podemos notar que apesar destas quinases se apresentarem fosforiladas desde tempos precoces da infecção (canaleta 6), há um aumento substancial em tempos mais tardios, de 24 e 36 horas (canaletas 9 e 10). Este resultado nos sugere que o papel de JNK1/2 pode ser mais proeminente em tempos tardios da infecção desde é neste período que estas se apresentam mais fortemente fosforiladas.

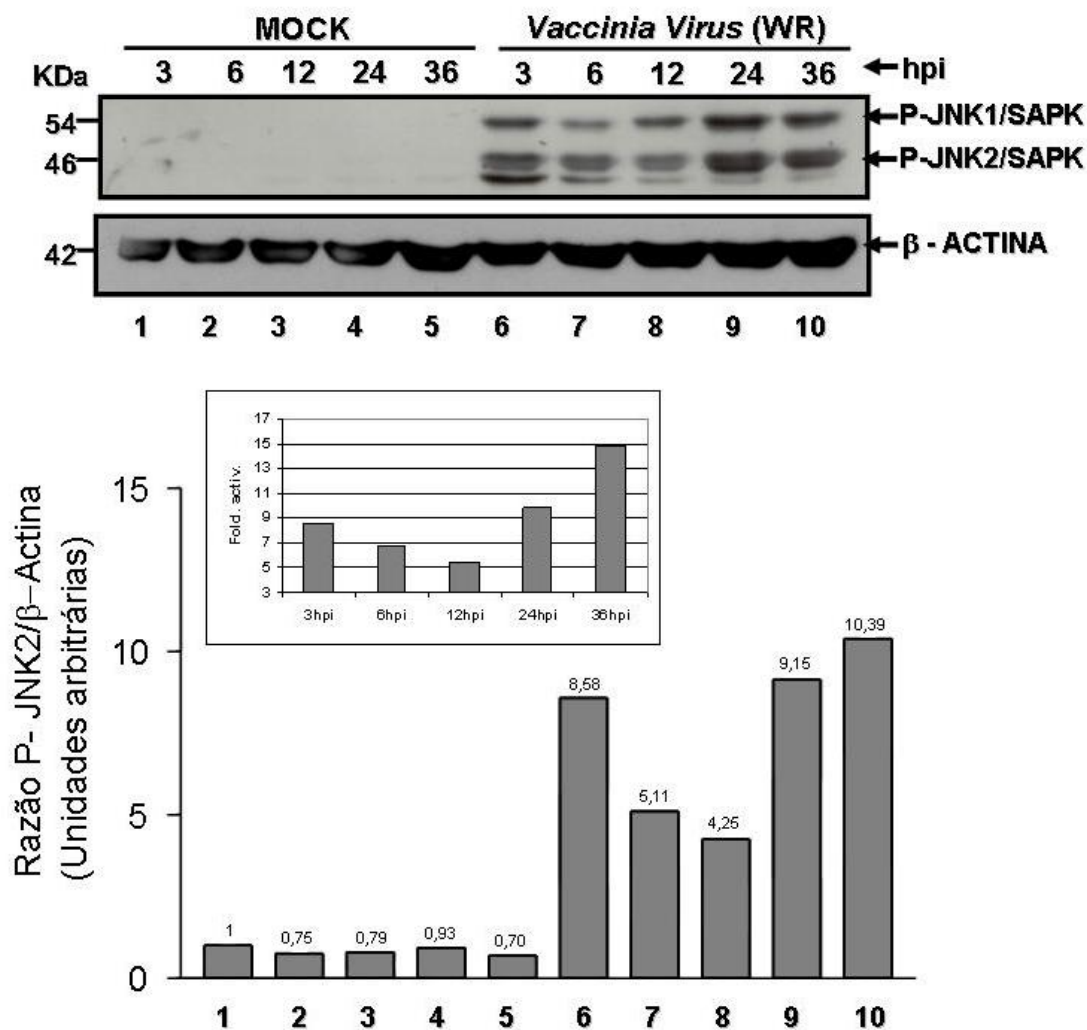


Figura 9: A infecção pelo *Vaccinia virus* induz a fosforilação da SAPKK JNK1/2

Células A31 crescidas e carenciadas foram não infectadas (MOCK) ou infectadas com o VACV WR utilizando-se MOI de 10,0 pelos tempos determinados. Após este período, as células foram coletadas e as proteínas totais extraídas e quantificadas. As proteínas totais (40 μ g/amostra) foram fracionadas por eletroforese em gel de poliacrilamida/SDS (SDS-PAGE). A seguir, foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, onde foi feita a reação com o anticorpo anti fosfo-JNK1/2 (1:1000). A normalização da quantidade de proteínas nas diferentes canaletas foi feita com anticorpo anti β -actina. A massa molecular das proteínas está indicada à esquerda em kilodaltons (KDa). Os gráficos são relativos à representação gráfica da fosforilação de JNK1/2. O maior gráfico representa a razão entre ativação da proteína JNK2 pela quantidade de β -actina observada. O gráfico menor representa a fosforilação de JNK2 em células infectadas em relação à fosforilação de JNK2 em células não infectadas em cada hora após infecção

5.3 - Cinética de ativação de ERK1/2 durante a infecção pelo *Vaccinia virus*

Os trabalhos realizados nos últimos anos pelo Grupo de Transdução de Sinal do Laboratório de vírus têm demonstrado a participação de vias de transdução de sinal, especialmente das MAPKs, durante a infecção pelo *Vaccinia virus*, bem como a participação destas quinases celulares na biologia viral.

Em 2001, foi demonstrado por Magalhães e colaboradores que as MAPKs ERK1/2 eram fosforiladas em tempos precoces da infecção, de 30 minutos a 8 horas. Na continuidade do estudo, Andrade e colaboradores em 2004, demonstraram a importância desta via na biologia viral, uma vez que a inibição de ERK1/2 por inibidor farmacológico reduziu drasticamente a multiplicação viral.

A partir disto, resolvemos analisar a fosforilação das ERK1/2 durante todo o curso da infecção a fim de determinar a curva de fosforilação destas quinases ao longo do tempo até períodos tardios da infecção.

Para isto, utilizamos os mesmos procedimentos realizados nos experimentos anteriores com a célula A31 carenciadas por 12 horas e infectadas com MOI 10,0.

Como podemos observar na figura 10, as MAPKs ERK1/2 se apresentam fortemente fosforiladas com três horas pós infecção (hpi) (canaleta 6) e isto permanece com seis horas decaindo logo em seguida com 12 horas de infecção retornando a níveis próximos dos basais com 24 e 36 horas de infecção (canaletas 9 e 10 em relação à 4 e 5). Este resultado, aliado àqueles da literatura, nos sugere que as ERK1/2 desempenham seu papel no início da infecção, onde são requeridas e, portanto, mais ativas. Provavelmente, em tempos tardios, estas não sejam tão necessárias e, portanto, se apresentam fosforiladas em nível basal.

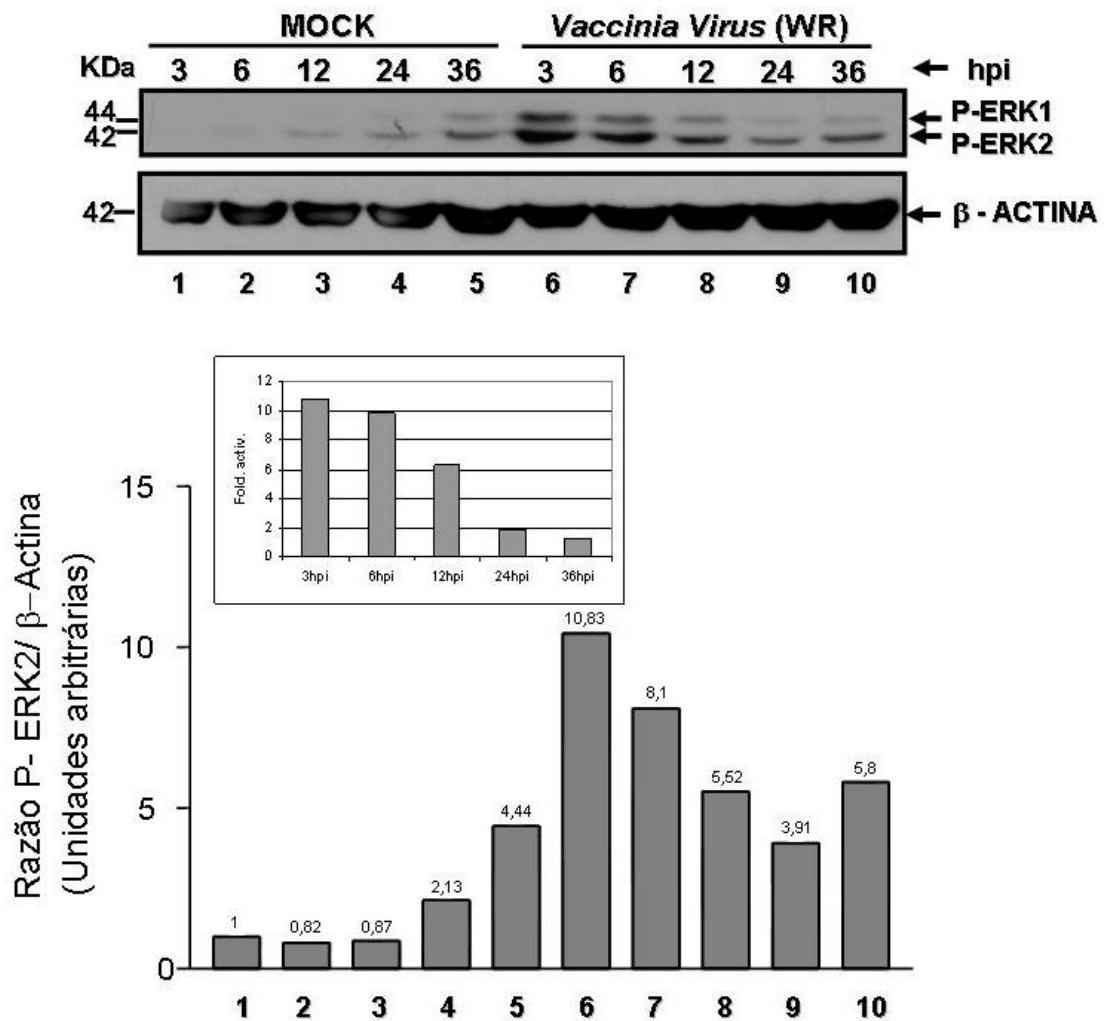


Figura 10 : A infecção pelo *Vaccinia virus* induz a fosforilação da MAPK ERK1/2.

Células A31 crescidas e carenciadas foram não infectadas (MOCK) ou infectadas com o VACV WR utilizando-se MOI de 10,0 pelos tempos determinados. Após este período, as células foram coletadas e as proteínas totais extraídas e quantificadas. As proteínas totais (40µg/amostra) foram fracionadas por eletroforese em gel de poliacrilamida/SDS (SDS-PAGE). A seguir, foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, onde foi feita a reação com o anticorpo anti fosfo-ERK1/2 (1:1500). A normalização da quantidade de proteínas nas diferentes canaletas foi feita com anticorpo anti β-actina. A massa molecular das proteínas está indicada à esquerda em kilodaltons (KDa). Os gráficos são relativos à representação gráfica da fosforilação de ERK1/2. O maior gráfico representa a razão entre ativação da proteína ERK2 pela quantidade de β-actina observada. O gráfico menor representa a fosforilação de ERK2 em células infectadas em relação à fosforilação de ERK2 em células não infectadas em cada hora pós infecção.

5.4 - A infecção pelo *Vaccinia virus* promove a fosforilação do fator de transcrição c-Jun.

Um dos substratos amplamente descritos das MAPKs, em especial, das JNK1/2 e ERK1/2 é o fator de transcrição c-Jun. Este fato caracteriza c-Jun como um fator de transcrição chave em muitos processos biológicos que vão desde proliferação e diferenciação à apoptose.

Durante a infecção pelo VACV, se levarmos em consideração o tempo de 1 a 36 horas, observamos que sempre uma das MAPKs ou ambas estão fosforiladas. Este fato aumenta a chance de que o fator de transcrição c-Jun esteja ativo durante a infecção. Desta forma, resolvemos avaliar o envolvimento de c-Jun. Para isto utilizamos o mesmo padrão experimental, células A31 carenciadas por 12 horas e infectadas com MOI de 10,0.

Podemos observar, na figura 11, em experimento realizado com extratos totais, que o fator de transcrição c-Jun é fosforilado desde o primeiro tempo aqui analisado, de 3 horas de infecção (canaleta 6) e se estende de forma mais intensa de 6 a 48 horas (canaletas 7 a 10).

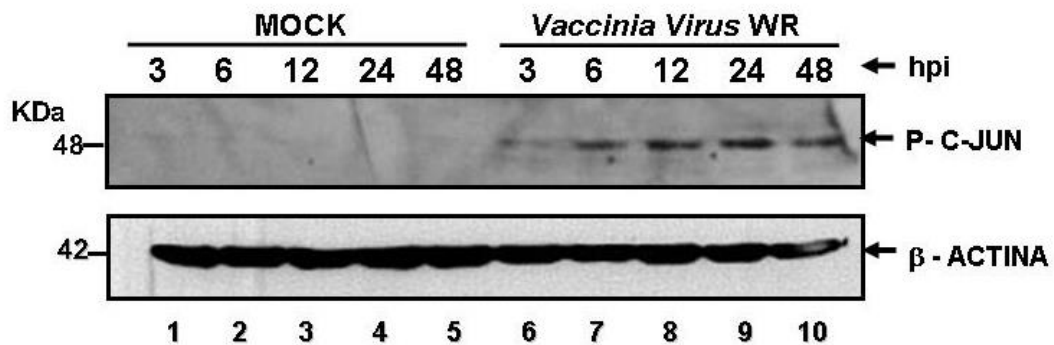


Figura 11 : A Infecção pelo *Vaccinia virus* induz a fosforilação do fator de transcrição c-Jun.

Células A31 crescidas e carenciadas foram não infectadas (MOCK) ou infectadas com o VACV WR utilizando-se MOI de 10,0 pelos tempos determinados. Após este período, as células foram coletadas e as proteínas totais extraídas e quantificadas. As proteínas totais (40µg/amostra) foram fracionadas por eletroforese em gel de poliacrilamida/SDS (SDS-PAGE). A seguir, foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, onde foi feita a reação com o anticorpo anti fosfo-c-Jun (1:1000). A normalização da quantidade de proteínas nas diferentes canaletas foi feita com anticorpo anti β-actina. A massa molecular das proteínas está indicada à esquerda em kilodaltons (KDa).

5.5 - O fator de transcrição c-Jun é fosforilado temporalmente pelas MAPKs JNK1/2 e ERK1/2.

O fator de transcrição c-Jun está descrito como substrato das quinases JNK1/2 e ERK1/2, podendo então, atuar mediado por ambas as quinases.

Para avaliar se ambas as quinases JNK1/2 e ERK1/2 estariam fosforilando c-Jun e em quais tempos estas estariam atuando, montamos alguns experimentos utilizando inibidores de ambas quinases.

Na figura 12, que corresponde a um extrato de proteínas nucleares, utilizamos células A31 carenciadas por 12 horas e infectadas com o VACV WR utilizando-se MOI de 10,0. Podemos observar, por ser um extrato nuclear, que a fosforilação de c-Jun inicia-se após 1 hora de infecção se mantendo estável até 8 horas de infecção. Na canaleta 10, realizamos um pré-tratamento de 30 minutos com o inibidor de MEK, e, portanto, da via de ERK1/2, PD98059. Após este pré-tratamento, as células foram infectadas com MOI de 10,0 por quatro horas, período de maior ativação das ERK1/2 durante a infecção viral.

Podemos observar que a inibição da via de ERK leva também a uma inibição da fosforilação de c-Jun (compare canaleta 7 e 10). Isto sugere fortemente, uma participação da via de MEK/ERK1/2 na fosforilação de c-Jun em momentos precoces da infecção (4 horas).

A fim de analisar a participação de ERK e JNK na fosforilação de c-Jun em tempos tardios da infecção, realizamos a infecção de células A31 pré-tratadas com os inibidores de JNK1/2; SP600125 e do inibidor de MEK; UO126 em conjunto e separadamente. Após o pré-tratamento de 30 minutos, infectamos as células por 30 horas.

Podemos observar na figura 13, que neste tempo tardio de infecção requer a participação de JNK1/2 na fosforilação de c-Jun (canaleta 3), desde que o uso do inibidor aboliu completamente a fosforilação do fator de transcrição. ERK1/2

não demonstra ter um papel neste tempo de infecção (canaleta 4) pois o uso do inibidor não teve efeito na fosforilação de c-Jun.

Este resultado corrobora com os resultados anteriores de análise da fosforilação das quinases celulares ERK1/2 e JNK1/2. Como podemos observar nas figuras 9 e 10, ERK1/2 se mostra fosforilada fortemente em momento iniciais da infecção viral (3-6 horas) decaindo nos tempos posteriores (24-36 horas). Já a SAPK JNK demonstra ter um padrão diverso, sendo fosforilada nos tempos precoces e esta fosforilação se tornando mais robusta, como mostra os dados quantitativos, nos tempos tardios de infecção (24-36 horas).

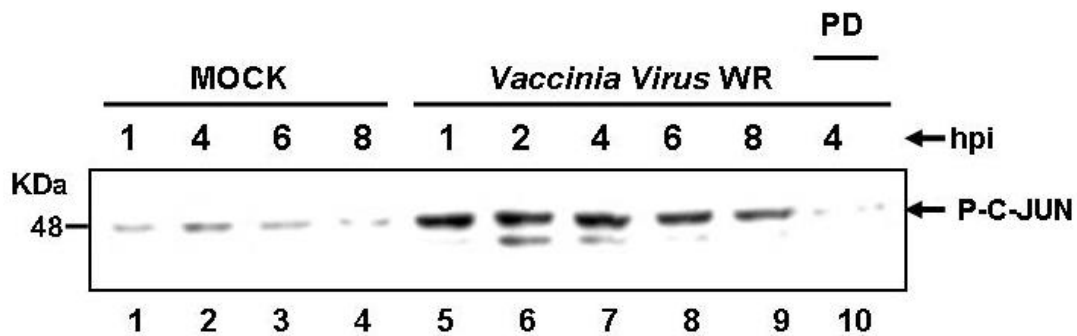


Figura 12: A inibição da via de MEK/ERK1/2 por PD98059 abole a fosforilação de c-Jun em período precoce de infecção.

Células A31 crescidas e carenciadas foram não infectadas (MOCK) ou infectadas com o VACV WR utilizando-se MOI de 10,0 pelos tempos determinados. Na canaleta 10, antes da infecção com o VACV, as células foram tratadas com PD98059 (50 μ M) por 30 minutos, o qual foi mantido durante todo o período da infecção. Após este período, as células foram coletadas e as proteínas nucleares extraídas e quantificadas. As proteínas totais (30 μ g/amostra) foram fracionadas por eletroforese em gel de poliacrilamida/SDS (SDS-PAGE). A seguir, foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, onde foi feita a reação com o anticorpo anti fosfo-c-Jun (1:1000). A massa molecular das proteínas está indicada à esquerda em kilodaltons (KDa).

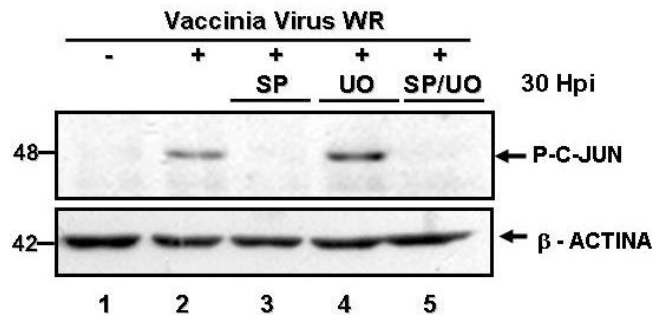


Figura 13: A inibição de JNK1/2 por SP600125 abole a fosforilação de c-Jun em período tardio de infecção.

Células A31 crescidas e carenciadas foram não infectadas (MOCK) ou infectadas com o VACV WR utilizando-se MOI de 10,0 pelos tempos determinados. Nas canaletas 3, 4 e 5, antes da infecção com o VACV, as células foram tratadas com SP600125 (40 μ M), UO126 (10 μ M) ou ambos, respectivamente, por 30 minutos, o qual foi mantido durante todo o período da infecção. Após este período, as células foram coletadas e as proteínas totais extraídas e quantificadas. As proteínas totais (30 μ g/amostra) foram fracionadas por eletroforese em gel de poliacrilamida/SDS (SDS-PAGE). A seguir, foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, onde foi feita a reação com o anticorpo anti fosfo-c-Jun (1:1000). A normalização da quantidade de proteínas nas diferentes canaletas foi feita com anticorpo anti β -actina. A massa molecular das proteínas está indicada à esquerda em kilodaltons (kDa).

5.6 - A infecção pelo VACV leva a formação de complexos DNA-proteínas das seqüências consensos AP-1 e CRE em tempos distintos e esta ligação é dependente de MAPKs distintas.

Está demonstrado na literatura que, o fator de transcrição c-Jun, após fosforilado, tem a capacidade de se translocar até o núcleo e formar homodímeros (Jun-Jun) ou heterodímeros. Neste último caso, c-Jun pode formar heterodímeros com outros fatores de transcrição como ATF-2, Fos e Elk-1. Estes dímeros, denominados, AP-1, têm o papel de se ligar às seqüências regulatórias de genes alvos e desta forma alterar o repertório gênico celular.

A partir dos resultados obtidos que c-Jun é fosforilado durante a infecção pelo VACV WR em todos os tempos analisados e ainda, partindo do fato, que esta fosforilação ocorre através das MAPK ERK1/2 e JNK1/2 de maneira tempo-dependente, decidimos analisar se durante a infecção viral poderia ocorrer a formação de complexos de proteínas às seqüências transativadoras AP-1 e CRE e qual a regulação das MAPK nesta ligação.

Na figura 14, de acordo com o mesmo padrão experimental que vinha sendo utilizado, células A31 foram carenciadas por 12 horas e após este período, pré-tratadas ou não com inibidores de MAPKs (SP600125 ou UO126) por trinta minutos sendo em seguida infectadas com uma MOI 10,0. Após o período de 5 horas, as células foram lavadas com PBS1X e processadas para a extração de proteínas celulares totais. Estas proteínas após quantificadas, foram utilizadas, 10µg para o ensaio do retardamento da mobilidade eletroforética, onde utilizamos a seqüência regulatória AP-1 na reação com o lisado de proteínas. Podemos observar na canaleta 2, que corresponde às células somente infectadas, a formação de uma banda correspondente ao complexo DNA/proteína. Este complexo permanece estável mesmo com o pré-tratamento com o inibidor de JNK, SP600125, na canaleta 3. No entanto, quando utilizamos o inibidor de ERK, UO126, a banda é completamente abolida. O mesmo ocorre quando utilizamos uma combinação de ambos inibidores das quinases.

Para controle da reação utilizamos um controle homólogo que corresponde ao excesso molar do oligonucleotídeo de AP-1 não marcado (canaleta 6), que foi capaz de abolir completamente a formação do complexo DNA/proteína. Como controle heterólogo, utilizamos excesso molar de oligonucleotídeo não relacionado e não marcado, NF κ B, que não alterou a formação do complexo DNA/proteína (canaleta 7).

Na figura 15, também utilizando o mesmo padrão experimental com as células A31, após o carenciamento e tratamento ou não com inibidores por 30 minutos, as células foram infectadas com MOI 10,0 por um período de 30 horas. Após este tempo, as células foram lavadas com PBS1X e processadas para a extração de proteínas nucleares. Estas proteínas após quantificadas, 10 μ g foram utilizadas para o ensaio do retardamento da mobilidade eletroforética, onde utilizamos a seqüência regulatória CRE na reação com o lisado de proteínas. Está descrito na literatura que as células 3T3, cuja A31 é parental, possui um nível basal alto de ligação à seqüência CRE, contudo este pode ser aumentado no caso de estimulação (McLean & Bachenheimer, 1999) (canaleta 1). Assim, podemos observar que a infecção pelo VACV acentua a ligação de proteínas ao DNA de CRE (canaleta 2). Este complexo é amplamente reduzido ao nível basal quando a via de JNK1/2 é inibida pelo uso de SP600125 (canaleta 3). Ao passo que esta redução não é pronunciada com a utilização do inibidor de MEK, UO126 (canaleta 4). A redução ao nível basal também é observada quando utilizamos uma combinação dos dois inibidores (canaleta 5).

Também para o controle da reação utilizamos o controle homólogo que corresponde ao excesso molar do oligonucleotídeo de CRE não marcado (canaleta 6), que foi capaz de abolir completamente a formação do complexo DNA/proteína. Como controle heterólogo, utilizamos excesso molar de oligonucleotídeo não relacionado e não marcado, NF κ B, que não alterou a formação do complexo DNA/proteína (canaleta 7). Assim, estes resultados nos mostram que a infecção pelo VACV estimula a fosforilação de c-Jun através da ativação das MAPKs ERK1/2 e JNK1/2 e este fenômeno leva à formação de complexos de proteínas com as seqüências de DNA AP-1 e CRE. Isto sugere

que estas vias podem modular o repertório gênico que é expresso durante a infecção viral.

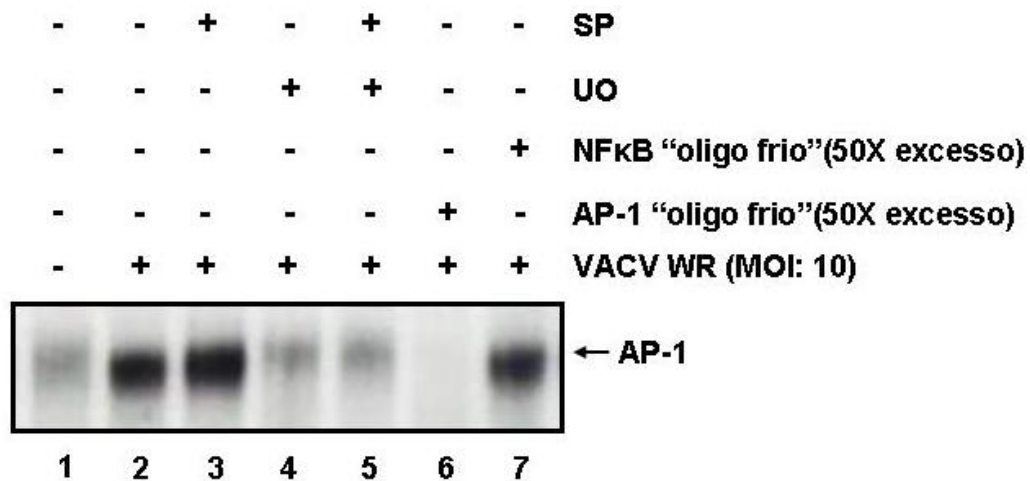


Figura 14: A infecção pelo *Vaccinia virus* induz a formação de complexo AP-1-proteínas de forma dependente de ERK1/2.

Células A31 crescidas e carenciadas foram não infectadas (MOCK) ou infectadas com o VACV WR utilizando-se MOI de 10,0 pelo tempo de 5 horas. Nas canaletas 3, 4 e 5, antes da infecção com o VACV, as células foram tratadas com SP600125 (40 μ M), UO126 (10 μ M) ou ambos, respectivamente, por 30 minutos, o qual foi mantido durante todo o período da infecção. Após este período, as células foram coletadas e as proteínas totais extraídas e quantificadas. O ensaio do retardamento da mobilidade eletroforética foi realizado utilizando-se 10 μ g/amostra das proteínas totais que foram incubadas com a sonda/oligodeoxinucleotídeo AP-1 marcada radioativamente com γ ³²P(ATP). Como controle da especificidade da interação, o extrato foi previamente incubado com excesso molar da sonda não marcada (canaleta 6) ou excesso molar da sonda não relacionada NFkB (canaleta 7). O complexo DNA/proteínas formado está indicado pela seta na figura.

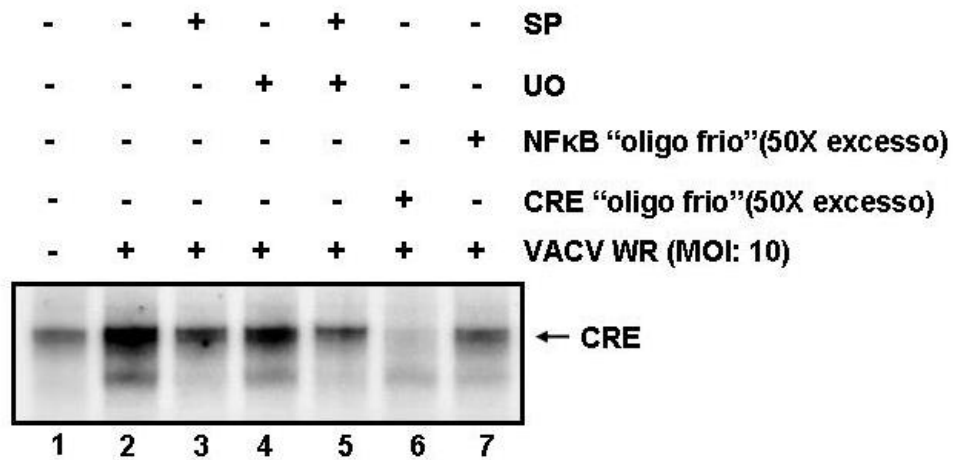


Figura 15: A infecção pelo *Vaccinia virus* induz a formação de complexo CRE- proteínas de forma dependente de JNK1/2

Células A31 crescidas e carenciadas foram não infectadas (MOCK) ou infectadas com o VACV WR utilizando-se MOI de 10,0 pelo tempo de 30 horas. Nas canaletas 3, 4 e 5 , antes da infecção com o VACV, as células foram tratadas com SP600125 (40 μ M), UO126 (10 μ M) ou ambos, respectivamente, por 30 minutos, o qual foi mantido durante todo o período da infecção. Após este período, as células foram coletadas e as proteínas totais extraídas e quantificadas. O ensaio do retardamento da mobilidade eletroforética foi realizado utilizando 10 μ g/amostra das proteínas nucleares que foram incubadas com a sonda/oligodeoxinucleotídeo CRE marcada radioativamente com γ^{32} P(ATP). Como controle da especificidade da interação, o extrato foi previamente incubado com excesso molar da sonda não marcada (canaleta 6) ou excesso molar da sonda não relacionada NFkB (canaleta 7). O complexo DNA/proteínas formado está indicado pela seta na figura.

5.7 - As MAPKKs MKK4 e MKK7 são necessárias para a fosforilação de JNK1/2 durante a multiplicação do *Vaccinia virus*.

A partir dos resultados obtidos, resolvemos caracterizar melhor a fosforilação de JNK durante a infecção viral. Para avaliar qual (is) MAPKK(s) estão envolvidas na via que leva à fosforilação de JNK1/2 realizamos experimentos utilizando células MEF nocautes para as MAPKK MKK4 (MKK4^{-/-}), MKK7 (MKK7^{-/-}) e o duplo nocaut destas MAPKKs (MKK4/7^{-/-}).

Desta forma, o *Vaccinia virus* foi titulado na parental MEF WT para posteriores experimentos.

As células foram então crescidas em meio DMEM acrescido de 5% de soro fetal bovino e dos antibióticos gentamicina e penicilina. Estas células foram carenciadas por 12 horas em meio DMEM sem soro e posteriormente infectadas com o VACV utilizando-se MOI de 10,0.

Após 1, 3, 6, 12, 24 e 36 hpi as células foram processadas para a extração de proteínas totais conforme descrito anteriormente.

Podemos observar nas figuras 16 e 17 correspondente aos extratos das células MKK4^{-/-} e MKK7^{-/-}, respectivamente, que JNK1/2 está fosforilada mesmo na ausência de uma das MAPKKs. Sugerindo então, que ambas as MAPKKs contribuiriam para a fosforilação de JNK1/2 durante a infecção viral. Para confirmar este fato, realizamos a infecção das células nocautes para as duas quinases (MKK4/7^{-/-}) utilizando as mesmas condições dos experimentos anteriores.

Na figura 18, observamos então que, em todos os tempos analisados, a ausência das duas quinases levou a uma abolição total da fosforilação de JNK1/2 durante a infecção viral. Na canaleta 9, podemos observar o controle positivo que corresponde à célula parental MEF WT, carenciada por 12 horas e infectada com MOI 10,0 durante o período de 24 horas. Estes resultados nos sugerem que diretamente as MAPKK MKK4 e MKK7 fosforilam JNK1/2 durante

a infecção, excluindo a possibilidade de fosforilação direta por uma quinase viral, mas, sim pela indução da infecção pelo vírus ou algum produto gênico viral da via de sinalização da MAPK.

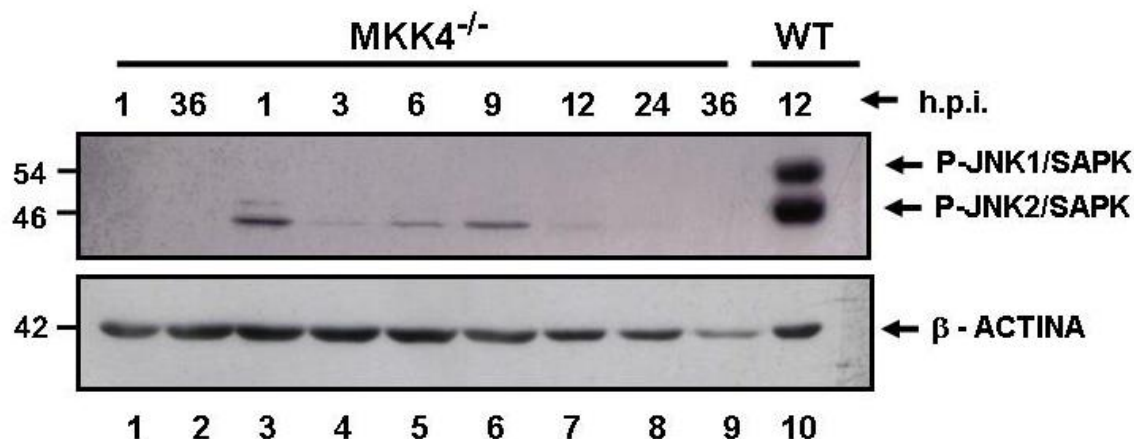


Figura 16: Fosforilação de JNK1/2 em células nocautes para MKK4.

Células MEF $MKK4^{-/-}$ e células MEF WT carenciadas foram não infectadas (MOCK) ou infectadas com o VACV WR utilizando-se MOI de 1,0 pelos tempos determinados. Após este período, as células foram coletadas e as proteínas totais extraídas e quantificadas. As proteínas totais ($40\mu\text{g}/\text{amostra}$) foram fracionadas por eletroforese em gel de poliacrilamida/SDS (SDS-PAGE). A seguir, foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, onde foi feita a reação com o anticorpo anti fosfo-JNK1/2 (1:1000). A massa molecular das proteínas está indicada à esquerda em kilodaltons (kDa). A canaleta 10 representa o controle positivo de células MEF WT infectadas com o *Vaccinia virus* por 24 horas.

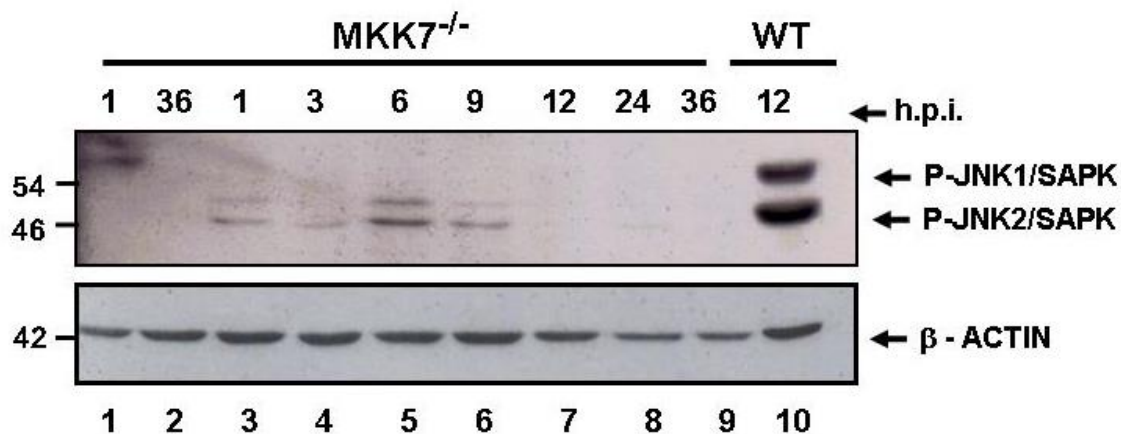


Figura 17: Fosforilação de JNK1/2 em células nocautes para MKK7.

Células MEF $MKK7^{-/-}$ e células MEF WT carenciadas foram não infectadas (MOCK) ou infectadas com o VACV WR utilizando-se MOI de 1,0 pelos tempos determinados. Após este período, as células foram coletadas e as proteínas totais extraídas e quantificadas. As proteínas totais ($40\mu\text{g}/\text{amostra}$) foram fracionadas por eletroforese em gel de poliacrilamida/SDS (SDS-PAGE). A seguir, foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, onde foi feita a reação com o anticorpo anti fosfo-JNK1/2 (1:1000). A massa molecular das proteínas está indicada à esquerda em kilodaltons (kDa). A canaleta 10 representa o controle positivo de células MEF WT infectadas com o *Vaccinia virus* por 24 horas.

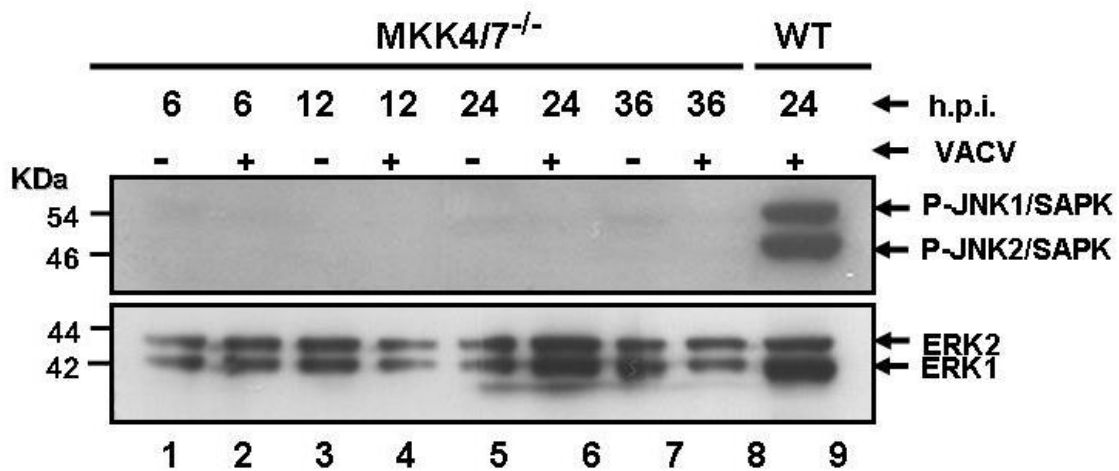


Figura 18: JNK1/2 não é fosforilado em células nocautes para MKK4/7^{-/-}

Células MEF MKK4/7^{-/-} e células MEF WT carenciadas foram não infectadas (MOCK) ou infectadas com o VACV WR utilizando-se MOI de 1,0 pelos tempos determinados. Após este período, as células foram coletadas e as proteínas totais extraídas e quantificadas. As proteínas totais (40µg/amostra) foram fracionadas por eletroforese em gel de poliacrilamida/SDS (SDS-PAGE). A seguir, foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, onde foi feita a reação com o anticorpo anti fosfo-JNK1/2 (1:1000). A massa molecular das proteínas está indicada à esquerda em kilodaltons (KDa). A canaleta 9 representa o controle positivo de células MEF WT infectadas com o *Vaccinia virus* por 24 horas.

5.8 - A replicação do DNA do *Vaccinia virus* não é etapa necessária para a fosforilação de JNK1/2.

O desnudamento do VACV, após a sua ligação à célula hospedeira, ocorre em duas etapas. Na primeira, o desnudamento ocorre após a penetração, permitindo a expressão dos genes imediatamente precoces. Na etapa seguinte, ocorre a degradação das proteínas do cerne, culminando com a liberação do DNA viral no citoplasma da célula hospedeira.

Na dissertação de mestrado em 2003, podemos observar que as etapas iniciais do processo de multiplicação viral são essenciais para a ativação das JNK1/2. Esta observação se deve ao fato que a exposição do VACV à luz ultravioleta (UV) foi capaz de inibir completamente a habilidade do VACV em induzir fosforilação de JNK1/2. Este fator sugere que a fosforilação de JNK1/2, em um primeiro momento, necessita da expressão dos genes imediatamente precoces que ocorre nestas etapas iniciais.

Para avaliar se seria necessária a replicação do DNA viral ou a expressão dos genes intermediários e tardios para a fosforilação de JNK1/2, realizamos a infecção viral na presença de citosina arabinosídeo (Ara C), um inibidor da replicação do DNA viral. Como podemos observar na figura 19, tanto nas células somente infectadas (canaletas 3 e 4), quanto nas pré-tratadas com Ara C (canaletas 7 e 8), ocorre a fosforilação de JNK1/2. Este resultado enfatiza o papel de genes precoces, mas não intermediários ou tardios, no processo de ativação de JNK1/2.

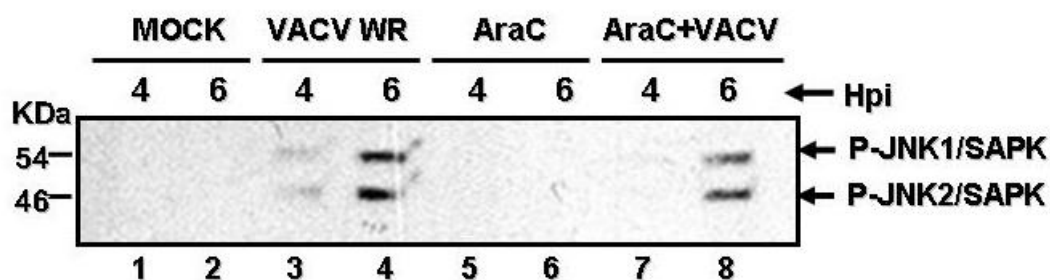


Figura 19: A fosforilação de JNK1/2 durante a infecção viral não depende da expressão dos genes tardios virais.

Células A31 foram crescidas e carenciadas. Em seguida, não foram infectadas (MOCK) (canaletas 1 e 2), ou então foram infectadas com o VACV WR à MOI: 10,0 (canaletas 3 e 4) ou apenas tratadas com citosina arabinosídeo (Ara C) (40 µg/ml) (canaletas 5 e 6). Nas canaletas 7 e 8, as células foram incubadas com Ara C por 30 minutos antes da infecção pelos tempos indicados. Após este período, as células foram coletadas e as proteínas totais extraídas e quantificadas. As proteínas totais (40µg/amostra) foram fracionadas por eletroforese em gel de poliacrilamida/SDS (SDS-PAGE). A seguir, foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, onde foi feita a reação com o anticorpo anti fosfo-JNK1/2 (1:1000). A massa molecular das proteínas está indicada à esquerda em kilodaltons (KDa).

5.9 - A proteína B1R do *Vaccinia virus* não é responsável pela fosforilação de JNK durante a infecção viral.

Para testar se a fosforilação de JNK e c-Jun que observamos durante a infecção pelo *Vaccinia virus* seria dependente da proteína B1R expressa pelo *Vaccinia virus*, realizamos experimentos utilizando células A31 carenciadas e infectadas com o VACV WR e o VACV termo sensível para B1R (VACV B1R⁻) verificando se JNK1/2 estaria fosforilada mesmo na ausência deste gene viral essencial.

Assim, como podemos observar na figura 20A, tanto as células infectadas à temperatura permissiva de 32°C (canaletas 1 a 5), quanto as células infectadas à temperatura não permissiva de 39°C (canaletas 6 a 10), apresentam o mesmo padrão fosforilação de JNK1/2. Sugerindo que durante a infecção viral a ausência de B1R não influencia a fosforilação de JNK1/2.

A figura 20B, apresenta as relações quantitativas obtidas através da normalização de JNK1/2 versus actina e mostra que o nível de fosforilação de JNK1/2 durante os tempos determinados permanecem equivalentes. Este resultado demonstra que B1R não participa da ativação de JNK.

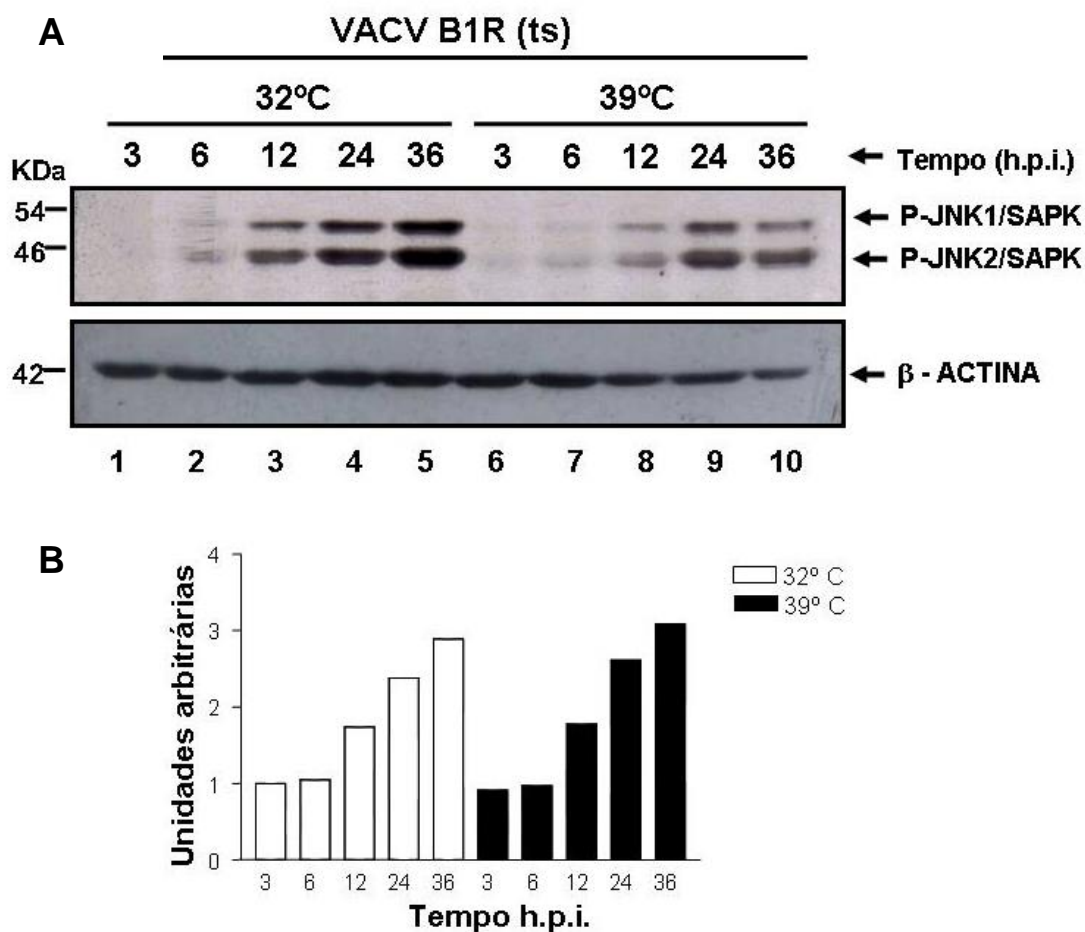


Figura 20: Fosforilação de JNK em células infectadas com VACV B1R termo sensível.

Células A31 carenciadas foram infectadas com VACV B1Rts em temperatura de 32°C (canaletas 1 a 5) ou em temperatura de 39°C (canaletas 5 a 10) com MOI de 1,0 nos tempos indicados. Após este período as células foram processadas para extração de proteína total. As proteínas totais (40µg/amostra) foram fracionadas por eletroforese em gel de poliacrilamida/SDS (SDS-PAGE). A seguir, foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, onde foi feita a reação com o anticorpo anti fosfo-JNK1/2 (1:1000). A normalização da quantidade de proteínas nas diferentes canaletas foi feita com anticorpo anti β-actina A massa molecular das proteínas está indicada à esquerda em kilodaltons (KDa).

5.10 - A inibição da fosforilação de JNK utilizando SP600125 durante a infecção viral inibe sensivelmente a transcrição do gene precoce TK assim como a replicação do DNA viral e a tradução das proteínas virais.

A fim de detectar se a via de JNK1/2 estaria envolvida em alguma etapa da multiplicação viral, resolvemos analisar a expressão de um gene precoce sendo a via desta quinase inibida. Para isto utilizamos a inibição de JNK1/2 através de SP600125 e avaliamos o nível dos transcritos virais. Resolvemos analisar o nível da transcrição de um gene precoce (TK – Timidina Kinase). Para isto utilizamos a técnica de transferência de Northern.

Como podemos observar na figura 21, nas canaletas de 1 a 4 podemos observar a transcrição do gene precoce TK, o qual foi detectado detectado de 3 a 9 horas após infecção. No entanto, nas células tratadas com o inibidor farmacológico SP600125, podemos observar uma abrupta inibição da transcrição do gene que somente aparece fracamente no tempo de 9 horas de infecção.

A baixa expressão do gene precoce poderia ter algum impacto na replicação do DNA viral. Para testar esta hipótese, realizamos uma análise da síntese de DNA viral em células infectadas e tratadas ou não com o inibidor SP600125. Como podemos observar na figura 22A, com 5 horas infecção existe uma quantidade significativa de DNA viral, a qual na presença do inibidor é bastante reduzida nos tempos de 5 e 7 horas pós infecção (figura 22B).

O impacto de SP600125 também pode ser observado sobre as proteínas virais. Na figura 23, observamos em extratos de proteínas de células infectadas na presença de SP600125 uma redução significativa da expressão da proteína viral tardia H3L (canaletas 6 a 10) em relação às células somente infectadas (canaletas 1 a 5).

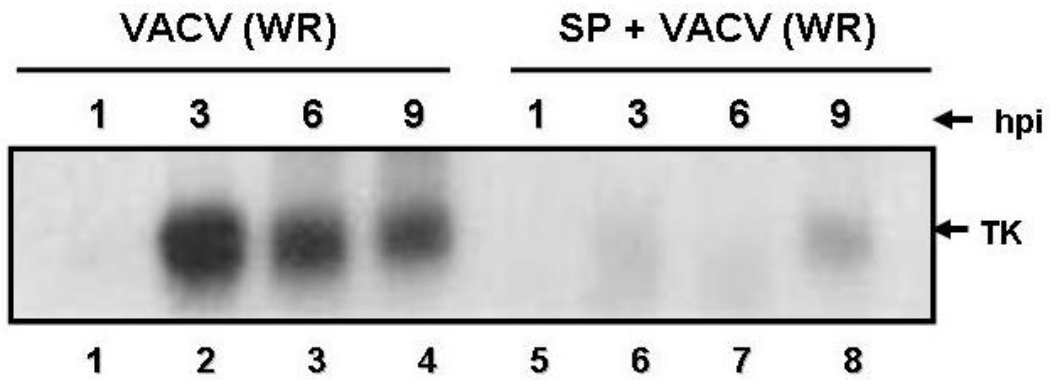
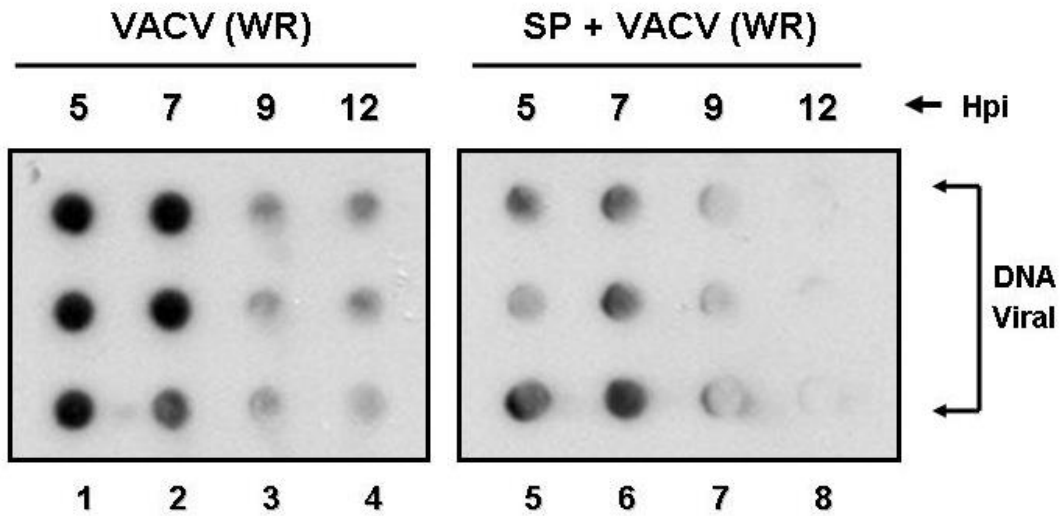


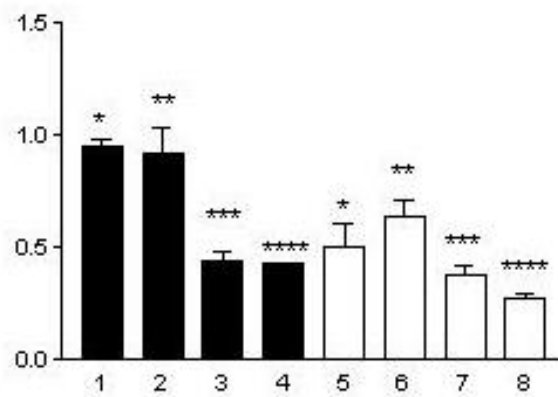
Figura 21: O inibidor farmacológico SP600125 reduz sensivelmente a acumulação do RNA mensageiro precoce viral TK.

Células A31 crescidas e carenciadas não foram tratadas (canaletas 1 a 4), ou então foram incubadas com SP600125 (40 μ M) por 30 min (canaletas 5 a 8) antes da infecção, permanecendo durante todo o período do experimento. Em seguida, foram infectadas por 3, 5, 6 e 9 horas com o VACV WR (MOI de 10,0). Após, as células foram coletadas, sendo realizada a extração do RNA total e 20 μ g deste foram fracionados em gel de agarose-formaldeído a 1,2% (p/v), transferidos para membrana de nylon e hibridizados com sonda do gene TK marcada com dCTP[α ³²P].

A



B



* P < 0.001
 ** P < 0.01
 *** P > 0.05
 **** P > 0.05

Figura 22: O uso do inibidor SP600125 diminui a replicação do DNA viral.

A. Células A31 crescidas e carenciadas não foram tratadas (canaletas 1–4), ou então foram incubadas com SP600125 (40 μ M) por 30 min (canaletas 5–8) antes da infecção, permanecendo durante todo o período do experimento. Em seguida, foram infectadas por 5, 7, 9 ou 12 horas com o VACV WR (MOI de 10,0). Após, foi feita a extração do DNA viral, o qual foi transferido sob vácuo para uma membrana de nylon e, então, sondado com o DNA do VACV marcado com dCTP[α ³²P]. B. Representação gráfica através da quantificação de cada ponto e posteriormente da média entre os pontos de cada tempo de infecção viral, os quais foram analisados utilizando-se o programa Prism 3.0 e o teste ANOVA.

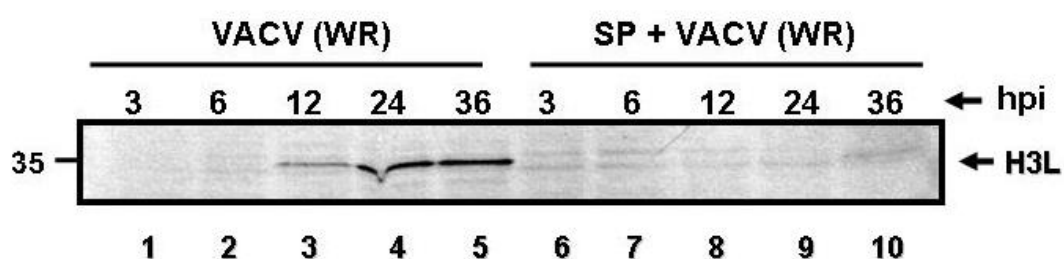


Figura 23: O inibidor farmacológico SP600125 reduz sensivelmente a tradução da proteína viral H3L

Células A31 crescidas e carenciadas não foram tratadas (canaletas 1 a 5), ou então foram incubadas com SP600125 (40 μ M) por 30 min (canaletas 6 a 10) antes da infecção, permanecendo durante todo o período do experimento. Em seguida, foram infectadas por 3, 6, 12, 24 e 36 horas com o VACV WR (MOI de 10,0). Após, as células foram coletadas, sendo realizada a extração de proteína total. 40 μ g/amostra foram fracionadas por eletroforese em gel de poliacrilamida/SDS (SDS-PAGE). A seguir, foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, onde foi feita a reação com o anticorpo anti-H3L (1:3000). A massa molecular das proteínas está indicada à esquerda em kilodaltons (kDa).

5.11 - O inibidor farmacológico SP600125 afeta a multiplicação viral

A partir de resultados que demonstravam o efeito da inibição de JNK1/2 em etapas da multiplicação viral, decidimos avaliar o efeito biológico da ativação da via de JNK durante a infecção pelo VACV, realizando um experimento de curva de multiplicação viral utilizando o inibidor farmacológico SP600125.

Células A31 carenciadas foram incubadas ou não com SP600125 30 minutos antes da infecção que foi realizada utilizando-se MOI de 10,0. Nos tempos de 3, 6, 12, 24, 36 e 48 hpi as células foram coletadas, processadas e posteriormente, tituladas para detecção do título obtido em cada tempo.

A figura 24 mostra que em células infectadas na ausência de SP600125, há uma curva de produção viral com o pico em 12 horas de infecção, que sofre um decréscimo logo em seguida no tempo de 24 horas e se mantém nos tempos finais de 36 e 48 horas. Nas células tratadas com o inibidor, observamos uma acentuada inibição da produção viral onde observa-se uma curva que indica aproximadamente a mesma quantidade viral em todos os tempos analisados.

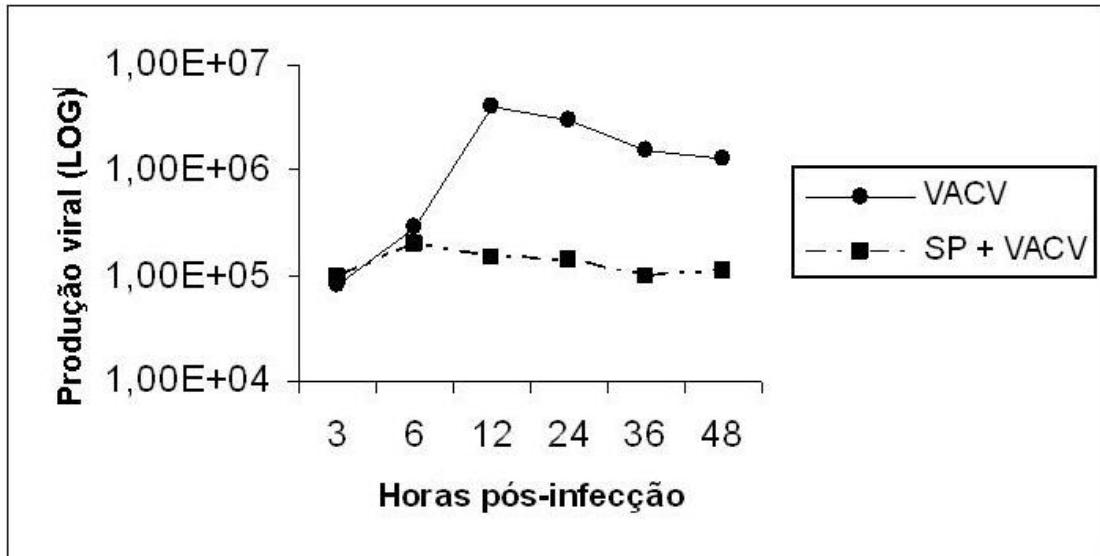


Figura 24: SP600125 inibe a multiplicação do VACV.

Células A31 crescidas e carenciadas foram incubadas ou não com SP600125 (40 μ M) por 30 min, sendo, em seguida, infectadas por 3, 6, 12, 24, 36 e 48 horas com o VACV WR (MOI de 10,0). Após esses tempos, os vírus foram coletados e o título determinado através de titulação.

5.12 - A multiplicação viral não é diminuída em células nocaute para JNK1/2.

A partir dos resultados contraditórios do uso do inibidor SP600125 e da expressão de proteínas dominantes negativas, resolvemos utilizar células nocautes para determinar qual o impacto da ausência desta MAPK na multiplicação do *Vaccinia virus*.

As células nocautes de JNK (MEF JNK^{-/-}) são provenientes da linhagem MEF, e portanto, fibroblasto de camundongos como a A31. Desta forma, realizamos uma curva de multiplicação viral nas células MEF WT e MEF JNK^{-/-} utilizando os mesmos parâmetros realizados nos experimentos com A31.

Como podemos observar na figura 25, em nenhum dos tempos de infecção utilizados neste experimento, verificamos uma diferença entre os títulos virais obtidos quando a infecção foi realizada nas células nocaute para JNK com a correspondente selvagem.

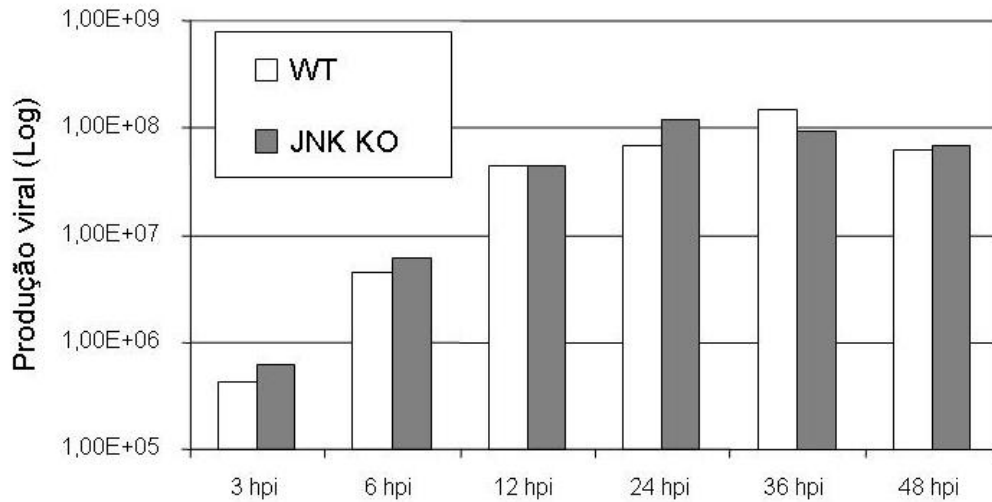


Figura 25: A multiplicação do VACV não é afetada por JNK1/2.

Células MEF WT e MEF JNK^{-/-} crescidas e carenciadas foram infectadas com VACV (MOI 10,0) pelos tempos de 3, 6, 12, 24, 36 e 48 horas. Após estes tempos as células foram processadas para titulação viral. Os títulos obtidos estão representados no gráfico. Barras brancas correspondem à MEF WT e barras cinzas corresponde à MEF JNK^{-/-}.

5.13 - O inibidor farmacológico SP600125, diminui a multiplicação viral por inibir outro alvo além de JNK1/2.

Os resultados que obtivemos até agora com o uso de inibidor farmacológico e das células nocautes e transfectantes nos mostram uma contradição. Está descrito na literatura que muitas vezes as células nocautes não apresentam o fenótipo adequado visto que em muitos casos outras vias sinalizadores proteínas podem suprir a deficiência do gene nocauteado.

Temos a partir disto duas hipóteses: a primeira que as células nocautes de JNK poderiam ter uma outra via suprimindo a deficiência e, portanto não obtivemos o impacto observado com o inibidor. A segunda hipótese que SP600125 poderia estar inibindo uma outra via ou proteína, que não JNK, que seria a responsável da inibição observada na multiplicação viral.

Para testar estas duas hipóteses, realizamos um experimento utilizando o mesmo padrão dos anteriores, onde células A31 e células nocautes de JNK foram tratadas ou não com SP600125 por 30 minutos e posteriormente infectadas com VACV utilizando MOI de 10,0 por 24 horas. Após este período as células foram processadas para a obtenção dos títulos virais.

Podemos observar na figura 26, como era esperado, existe uma significativa diferença (> 1 unidade logarítmica) na multiplicação viral entre células A31 tratadas e não tratadas com SP600125. Apesar de menos acentuada, podemos observar uma diferença na multiplicação viral entre a célula nocaute somente infectada, e a mesma tratada com o inibidor. Assim, podemos sugerir que SP600125 inibe inespecificamente, além de JNK, uma outra via sinalizadora, a qual deverá ser responsável pelo decréscimo na multiplicação viral.

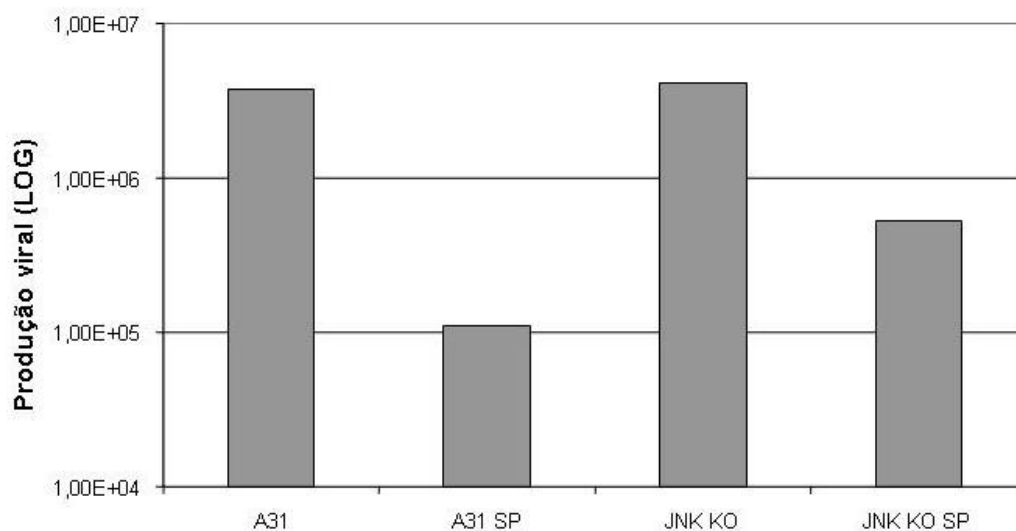


Figura 26: Efeito de SP600125 é exercido sobre outra via/proteína além de JNK1/2.

Células A31 e MEF JNK^{-/-} foram tratadas ou não com SP600125 por 30 minutos antes da infecção viral e foram infectadas com VACV (MOI 10,0) por 24 horas. Após este período as células foram processadas para titulação viral. Os títulos obtidos estão representados no gráfico.

5.14 - Células nocautes de JNK apresentam fosforilação de c-Jun somente em momentos precoces da infecção viral.

Através do uso dos inibidores de ERK1/2 e JNK1/2, observamos um padrão de fosforilação de c-Jun durante o ciclo de multiplicação viral. Observamos então, que este fator de transcrição é regulado temporalmente pelas duas MAPKs, sendo ERK1/2 responsável pela fosforilação de c-Jun em momentos precoces e JNK1/2 em momentos tardios de infecção.

Para confirmar este padrão de fosforilação de c-Jun, realizamos uma cinética de infecção em células MEF WT e MEF JNK^{-/-}. Após tempos determinados de infecção com MOI 10,0 estas células foram processadas para avaliação da fosforilação de c-Jun.

Como pode ser observado na figura 27, as células MEF WT possuem um padrão de fosforilação de c-Jun em todos os tempos analisados de 6 a 48 horas de infecção viral. Nas células nocautes para JNK, como observado na figura 28, a fosforilação de c-Jun é observada a partir do tempo de 1 hpi e segue até o tempo de 6 hpi decaindo logo no tempo de 9 e 12 horas. Com 24 horas de infecção já não detectamos a fosforilação de c-Jun.

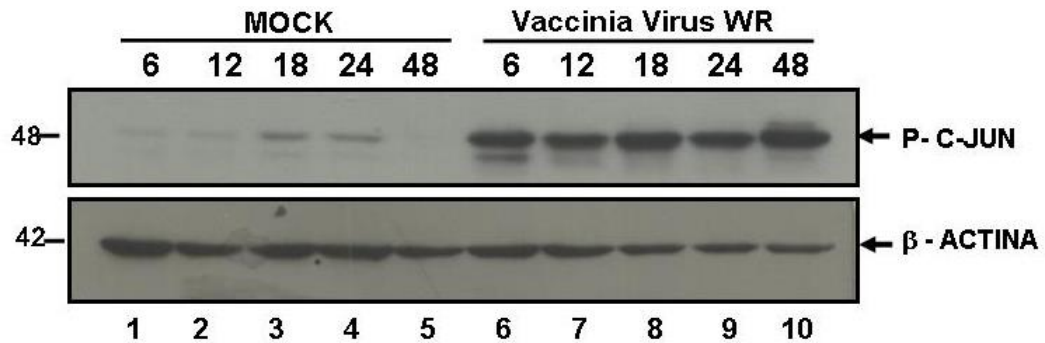


Figura 27: Fosforilação de c-Jun em células MEF WT.

Células MEF WT carenciadas foram não infectadas (MOCK) ou infectadas com o VACV WR utilizando-se MOI de 10,0 pelos tempos determinados. Após este período, as células foram coletadas e as proteínas totais extraídas e quantificadas. As proteínas totais (40µg/amostra) foram fracionadas por eletroforese em gel de poliacrilamida/SDS (SDS-PAGE). A seguir, foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, onde foi feita a reação com o anticorpo anti fosfo-c-Jun (1:1000). A normalização da quantidade de proteínas nas diferentes canaletas foi feita com anticorpo anti β-actina. A massa molecular das proteínas está indicada à esquerda em kilodaltons (KDa).

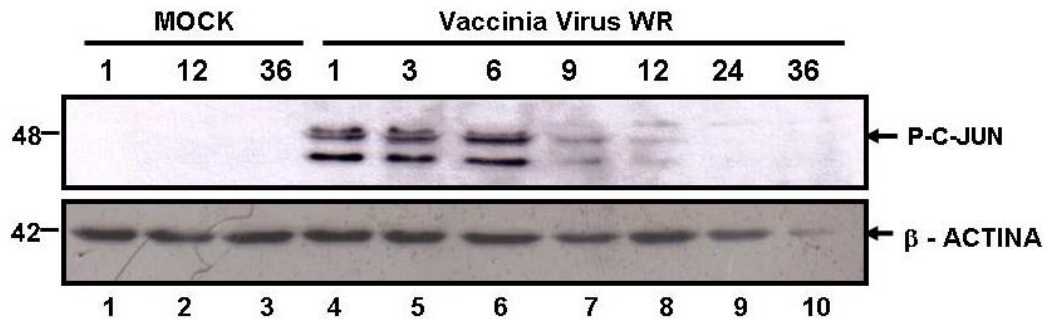


Figura 28: Fosforilação de c-Jun em células MEF JNK^{-/-}.

Células MEF JNK^{-/-} carenciadas foram não infectadas (MOCK) ou infectadas com o VACV WR utilizando-se MOI de 10,0 pelos tempos determinados. Após este período, as células foram coletadas e as proteínas totais extraídas e quantificadas. As proteínas totais (40µg/amostra) foram fracionadas por eletroforese em gel de poliacrilamida/SDS (SDS-PAGE). A seguir, foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose, onde foi feita a reação com o anticorpo anti fosfo-c-Jun (1:1000). A normalização da quantidade de proteínas nas diferentes canaletas foi feita com anticorpo anti β-actina. A massa molecular das proteínas está indicada à esquerda em kilodaltons (KDa).

5.15 - Células nocaute de JNK apresentam um fenótipo de placa reduzido em relação à selvagem.

Apesar de não observarmos uma alteração na multiplicação viral em células nocautes para JNK, resolvemos avaliar o fenótipo de placa nestas células.

Para isto, as células foram infectadas com 50 unidades formadoras de placas (u.f.p.) e após o período de adsorção, retiramos o inóculo e acrescentamos meio de cultura semi-sólido aos poços. Após 48 horas, as placas foram fixadas com formol 10%, coradas com cristal violeta e lavadas.

Para nossa surpresa, como podemos observar na figura 29, as células nocautes de JNK1/2 tiveram um tamanho de placa de lise muito reduzido em relação às células selvagens. Este resultado nos sugere que apesar de não ter um papel associado à multiplicação viral, JNK1/2 pode ter um papel relacionado à liberação das formas virais da célula, ou seja, à disseminação célula-a-célula dentro do hospedeiro que é realizada pela forma CEV.

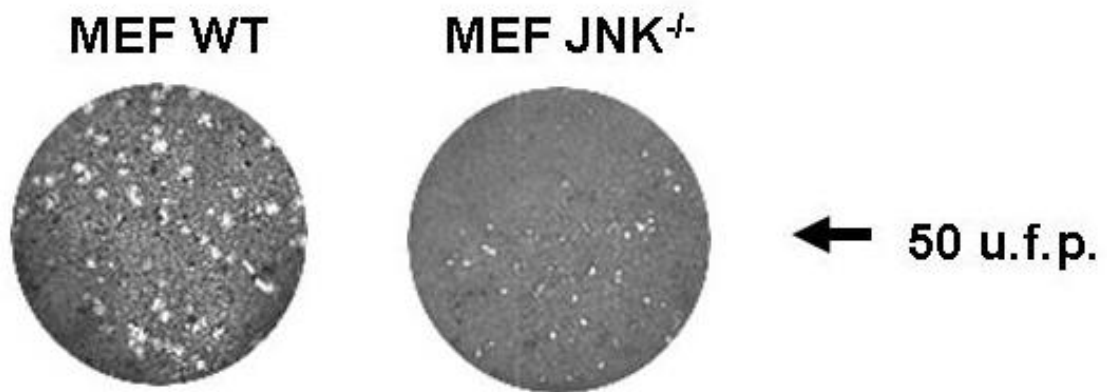


Figura 29: O fenótipo de placa de lise viral é menor quando a multiplicação é realizada em células JNK^{-/-}.

Células MEF WT e JNK^{-/-} foram crescidas e carenciadas e em seguida infectadas com 50 UFP por 48 horas em meio semi-sólido com 0,3% de agarose. Após este período, as células foram fixadas e coradas.

5.16 - A infecção de VACV em células nocaute para JNK libera maior quantidade de partículas EEV que as células selvagens.

Após observarmos a infecção das células nocautes apresentavam um fenótipo de placa reduzido em relação à selvagem, resolvemos avaliar se este fenômeno seria reflexo de uma menor produção de partículas IEV e, conseqüentemente, de EEV.

Para isto, as células MEF WT e MEF JNK^{-/-} foram infectadas com MOI 10,0 por 36 horas. Após este período os sobrenadantes foram coletados, centrifugados e incubados com o anticorpo anti-L1R, o qual neutraliza as partículas IMV, por 1 hora. Posteriormente os sobrenadantes foram processados para titulação.

Curiosamente, como podemos observar na figura 30, as células nocautes para JNK1/2 apresentaram um aumento na produção das partículas EEV em relação às células selvagens. Em nossos experimentos realizados em triplicatas podemos observar que este aumento foi de 60 a 80%.

Este resultado sugere que a via de JNK1/2 pode ter um papel associado ao controle da liberação viral.

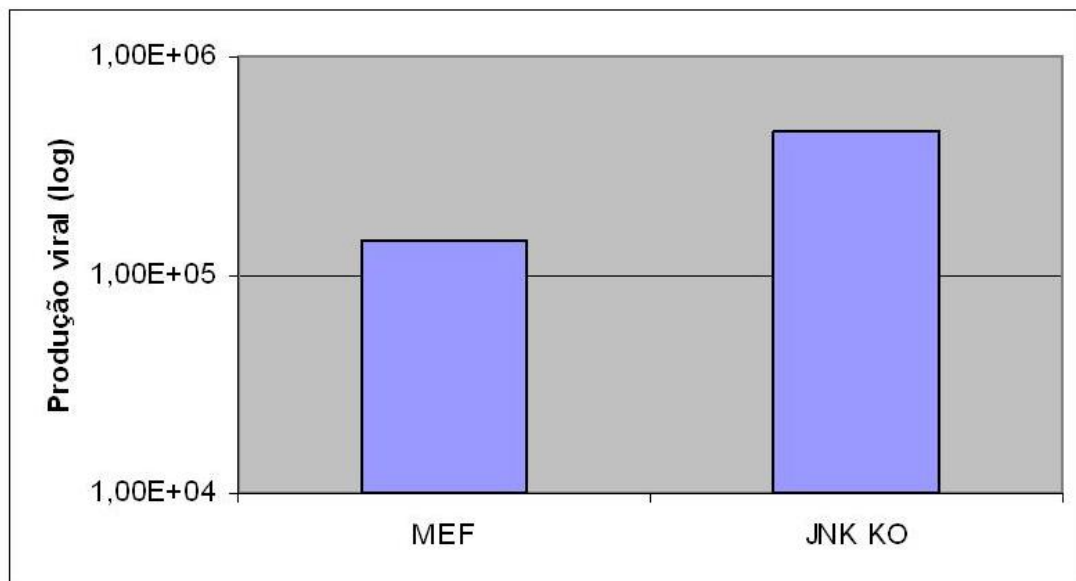


Figura 30: As células $JNK^{-/-}$ liberam mais formas infectivas EEV que as células selvagens.

Células MEF WT e MEF $JNK^{-/-}$ foram crescidas e carenciadas e em seguida infectadas com MOI de 10,0 por 36 horas em 1mL de meio. Após este período, o sobrenadante da cultura foi coletado, centrifugado e posteriormente incubado com anticorpo anti - L1R e titulado. Os títulos virais obtidos estão representados no gráfico.

5.17 - A infecção de VACV induz à expressão de IL-6 via JNK1/2.

Para avaliar se JNK1/2 poderia estar associada à resposta celular antiviral, decidimos analisar se esta quinase estaria regulando a expressão de alguma citocina relacionada a resposta antiviral.

Levamos em consideração o fato de JNK1/2 durante a infecção induzir a formação de complexos DNA-proteína com o consenso de CRE, o tipo celular utilizado neste trabalho, e a relação da citocina com resposta antiviral e pró-inflamatória. A partir destes dados, selecionamos como candidata a citocina IL-6 que esta descrita na literatura como regulada através dos sítios AP-1 e CRE presentes no seu promotor.

Desta forma, realizamos experimento de ELISA a partir de sobrenadantes de células MEF e JNK^{-/-} infectadas com MOI de 10,0 em tempos de 12 a 72 horas. Como podemos observar na figura 31, nas células selvagens ocorre uma grande indução de IL-6 detectada desde o primeiro tempo analisado que segue aumentando nos tempos posteriores. Nas células JNK^{-/-} observamos a indução de IL-6 bem diminuída em relação às células selvagens.

TNF- α e IL-10 também foram incluídos na análise, porém não verificamos nenhuma alteração nos níveis destas citocinas (resultados não apresentados), o que sugere que a participação de JNK1/2 se restringe a IL-6.

Este dado nos sugere que JNK1/2 pode também ter um papel relacionado à regulação da resposta imune influenciando no balanço da relação vírus-hospedeiro.

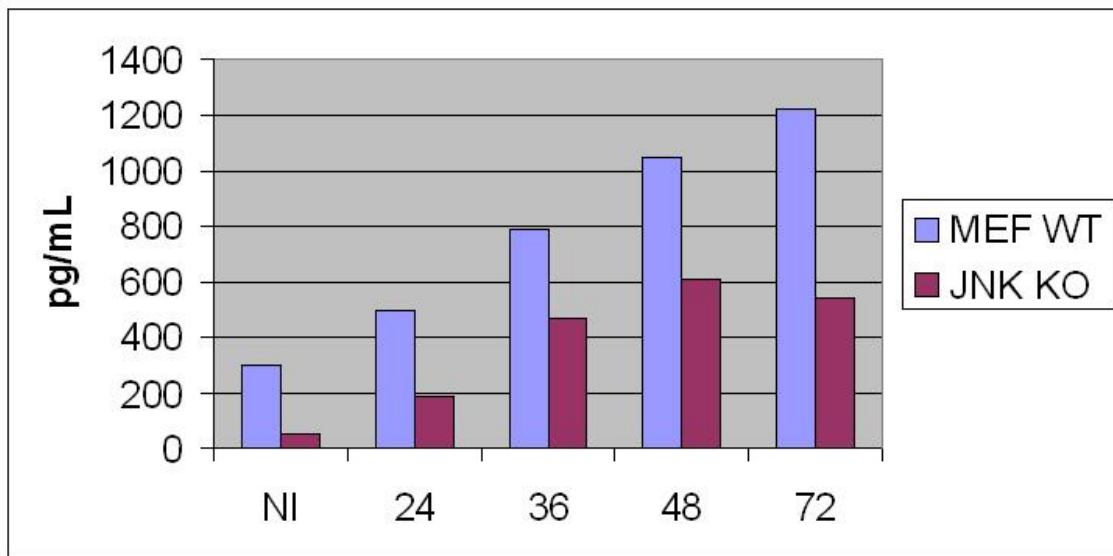


Figura 31: JNK tem papel na indução de IL-6 durante a infecção viral.

Sobrenadante de células MEF WT e MEF JNK^{-/-} infectadas com o VACV WR utilizando-se MOI de 10,0 pelos tempos determinados foram coletados e processados para detecção de IL-6. O nível de indução da citocina foi detectado através de ELISA sanduíche.

6 - DISCUSSÃO

A habilidade das células em perceber o ambiente que a cerca e responder de maneira apropriada é essencial para o funcionamento normal dos organismos. Embora as células sejam constantemente expostas a múltiplos estímulos, estas usualmente são hábeis em produzir a correta resposta porque desenvolveram um grande número de redes de sinalização intracelular com funções de receber e decodificar estes sinais. Estas respostas incluem entre outras, a regulação de centenas de genes, regulação de vias metabólicas e modulação do crescimento e motilidade celular. Não é surpreendente como a cada dia cresce mais a importância de se conhecer a sinalização e de se compreender o funcionamento da célula hospedeira, uma vez que os patógenos, sejam estes, bactérias, vírus ou parasitas, têm desenvolvido maneiras de se utilizar da rede de sinalização celular para otimizar seus ciclos infectivos. Mais do que isto, muitos patógenos dependem criticamente destes eventos de sinalização para sua replicação e continuada sobrevivência (Münter et al, 2006).

O objeto de estudo do Grupo de Transdução de Sinal têm sido a interação entre os poxvírus e a célula hospedeira. Todo o trabalho realizado até aqui teve como objetivo entender a relação parasita-hospedeiro do ponto de vista de traçar como o vírus se utiliza da célula como um objeto de manutenção da sua “sobrevivência” e principalmente apontar quais são, de fato, as vias e proteínas celulares importantes neste sentido. Muito já foi feito até aqui com os resultados obtidos pelo grupo nos últimos anos (Magalhães et al, 2001; Andrade et al, 2004; Silva et al, 2006). Agora, neste trabalho, pretendemos aumentar o conhecimento já obtido elucidando a sinalização e o papel da MAPK JNK1/2 durante a infecção pelo *Vaccinia virus*, a ativação prolongada de MEK/ERK e estabelecer correlações com os papéis desempenhados por ambas na biologia viral.

Para isto, iniciamos avaliando se a indução de JNK observada durante a infecção pelo *Vaccinia virus* era gerada pela expressão e secreção do fator de crescimento do *Vaccinia*, o VGF. É sabido que este fator ao ser secretado se liga ao receptor de EGF fosforilando-o e resultando na ativação da via Raf-MEK-ERK, estimulando as células à proliferação (Tzahar et al, 1998). Este fato facilita a multiplicação viral que é otimizada em células ciclando em relação à

células quiescentes. Este, certamente é um dos motivos que o VACV VGF⁻ se multiplica em uma velocidade menor e produz menores títulos virais em relação ao selvagem. Ainda também, Tzahar e colaboradores em 1998 verificaram que células tratadas com VGF purificado levava à ativação das MAPKs ERK, JNK e p38. Por este motivo, provavelmente observamos que a infecção com o vírus deletado para este gene tem uma indução menor que a observada para o vírus selvagem. O mesmo foi observado para a indução de expressão de ERK em células infectadas para o *Vaccinia virus* VGF⁻ (Andrade et al. 2004). De toda forma, podemos concluir que apesar de contribuir, a expressão de VGF não é essencial para a fosforilação de JNK1/2 (figura 8). Também podemos sugerir a partir deste resultado que o VACV, além de VGF, possui um outro modo para promover a fosforilação de JNK1/2 e excluindo a indução por uma proteína solúvel, seria portanto, dependente da indução de eventos intracelulares onde poderia estar relacionada à proteínas virais.

No entanto, podemos também sugerir que a fosforilação de JNK1/2 não ocorre diretamente pela interação de proteínas virais com JNK. Esta observação é baseada nos experimentos que realizamos onde caracterizamos a via que leva à ativação de JNK1/2. Tem sido descrito na literatura a necessidade diferencial de MKK4 e MKK7 na ativação de JNK1/2 relacionada aos diferentes estímulos. Um exemplo disto é a proteína latente de membrana (LMP-1) codificada durante o ciclo de multiplicação do vírus *Epstein-Barr* que ativa JNK1/2 somente através de MKK4 (Zou et al, 2006). No caso do VACV, quando analisamos a fosforilação de JNK em células nocaute para MKK4 e MKK7 (figuras 16 e 17), podemos observar que a ausência de uma destas não abole completamente a fosforilação de JNK. Quando observamos o padrão de fosforilação de JNK em células nocaute para ambas MKK4 e MKK7 verificamos a abolição completa da fosforilação de JNK (figura 18). Assim, retomando o conceito que foi explanado acima, muito provavelmente, não seria diretamente uma interação com uma proteína viral e JNK que levaria à fosforilação desta, mas, uma ativação em componentes ou fatores da via da SAPK que levaria em um segundo momento, à ativação de JNK1/2.

Outra observação que podemos afirmar a cerca da ativação das MAPKs JNK1/2 é o fato da necessidade das etapas iniciais da infecção viral para que esta ocorra. Este fato pode ser afirmado a partir do resultado que células infectadas com *Vaccinia virus* tratado com luz ultravioleta perde completamente a capacidade de induzir a fosforilação de JNK1/2 (Pereira, 2003). Os vírus irradiados com luz ultravioleta mantem a capacidade de penetrar na célula hospedeira perdendo sua membrana externa e liberando o cerne no citoplasma, mas perdem a capacidade de transcrever os genes precoces e sofrer o desnudamento secundário (Bablanian *et al.*, 1981). Assim também podemos dizer que além da necessidade das etapas iniciais, a indução da fosforilação de JNK1/2 é dependente da expressão dos genes precoces e não dos genes tardios. Esta observação é baseada levando-se em consideração que o tratamento das células com o inibidor da replicação do DNA viral, Ara C, não inibiu a capacidade da infecção induzir a fosforilação de JNK1/2 (figura 19). Assim, a expressão dos genes tardios que ocorre após a replicação do DNA viral não se mostra necessária para a indução de JNK1/2 observada quatro horas após infecção. Não excluimos aqui, entretanto, a possibilidade da necessidade destes genes tardios para a manutenção desta ativação em tempos avançados da infecção viral.

Também foi avaliada a participação da proteína quinase viral B1R na ativação de JNK1/2. Dados recentes da literatura, publicados por Santos e colaboradores em 2006, utilizando experimentos de transfecção *in vitro*, verificaram que a proteína serina-treonina quinase do *Vaccinia virus* B1R interage com JIP aumentando e estabilizando a ligação desta à JNK e consequentemente o estado de fosforilação da MAPK.

Em um primeiro momento, imaginamos a hipótese de que B1R poderia ser a proteína viral responsável pela sinalização de JNK e conseqüente fosforilação de c-Jun desencadeada pela infecção viral. No entanto, nos experimentos realizados com VACV termo-sensível para o gene que codifica a quinase B1R em temperatura não permissiva (39°C), observamos o mesmo padrão de fosforilação de JNK observado em temperatura permissiva (32°C) (figura 20). Em um primeiro momento, imaginamos que a ativação de JNK1/2 se

apresentava mais pronunciada a 32°C, porém a quantificação relacionada ao nível de actina demonstrou que os níveis de JNK em ambas temperaturas são equivalentes. Nossos resultados embora não apontem um aumento da fosforilação de JNK1/2 na presença de B1R não excluem a possibilidade desta proteína viral auxiliar na interação e estabilização do arcabouço que forma o complexo entre JNK e as proteínas JIP e MKK7 assim como na fosforilação de c-Jun. De acordo com a literatura, existem evidências que a serina-treonina quinase B1R pode ter outras funções ainda não relacionadas, visto que vírus termo-sensível para B1R mesmo apresentando 60% de produção de DNA tem uma baixa produção viral (Banham et al, 1992). Portanto, acreditamos que esta quinase pode também ser mais uma estratégia viral relacionada a alguma função importante e ainda indefinida durante o ciclo de multiplicação, com eventual participação de JNK1/2, ainda que indireta.

Outro ponto explorado neste trabalho se refere à cinética de ativação das MAPKs ERK1/2 e JNK1/2 durante a infecção pelo *Vaccinia virus*. Como já mencionado algumas vezes ao longo do texto, a importância de via MEK/ERK foi bem estabelecida durante a infecção pelo VACV (Magalhães et al, 2001). No trabalho de Andrade e colaboradores (2004), não somente a importância da via foi caracterizada, como também os fatores associados à esta como a quinase RSK2 e os fatores de transcrição Elk-1 e Egr-1.

Neste trabalho, o nosso objetivo foi, além de traçar a cinética de ativação de ERK1/2 e JNK1/2 durante todo o ciclo de multiplicação viral, também detectar se o substrato comum destas quinases, o fator de transcrição c-Jun estaria ativo durante a infecção. Objetivamos, também, detectar se ambas quinases seriam importantes na fosforilação de c-Jun.

Como observamos através dos dados quantitativos, a cinética de fosforilação de ERK1/2 (figura 10) inicia-se muito fortemente nos tempos iniciais da infecção viral (de 6 a 10 vezes) e ao longo do ciclo de multiplicação vai decaindo chegando ao basal nos tempos mais tardios analisados. Isto nos sugere fortemente que ERK1/2 tem um papel crucial desde os momentos iniciais da infecção. Certamente estes sinais estão relacionados com a entrada

viral e com a manutenção do ciclo de replicação, visto que a inibição desta via bloqueia todo o ciclo de multiplicação viral (Andrade et al, 2004). Ainda Unger e Traktman em 2004 identificaram que a proteína A13 do VACV como um possível alvo da fosforilação ERK1/2, corroborando com a importância desta quinase no ciclo replicativo. Hoje se sabe que tanto A13 quanto F18 são alvos de MEK/ERK *in vitro* (Traktman, comunicação pessoal).

Ao avaliarmos a cinética de fosforilação de JNK1/2 durante a infecção viral observamos pelos dados quantitativos, que apesar da infecção levar à fosforilação da quinase em momentos precoces (figura 9), são em tempos tardios de infecção, no entanto, que estas estão mais fortemente fosforiladas. Estes fatos nos sugerem que JNK1/2 deve exercer atividades biológicas relacionada a aspectos tardios da infecção viral. Várias evidências reforçam esta hipótese e serão explanados ao longo desta discussão.

Antes disto, avaliando a participação de c-Jun durante a infecção pelo *Vaccinia virus*, observamos que este fator de transcrição foi estimulado em todos os tempos de infecção analisados. Na figura 11, que foi realizada a partir de extratos protéicos totais podemos observar c-Jun fosforilado desde o primeiro tempo analisado de 3 horas. Também na figura 12, realizada a partir de extratos nucleares observamos que c-Jun desde 1 hora após infecção está fortemente fosforilado. Estes resultados nos sugerem que o papel de c-Jun pode estar relacionado, durante a infecção viral com um ou mais eventos. Esta hipótese pode ser corroborada ao notarmos que c-Jun é controlado pelos sinais desencadeados por ambas quinases ERK1/2 e JNK1/2 em momentos sobrepostos e distintos da infecção viral (figuras 12 e 13). Assim, cada uma das MAPKs têm o período de infecção onde se apresentam mais ativa e desta forma apresentam uma sinalização mais intensa para seus substratos em determinado período. Observamos que em momentos precoces, representado pelo tempo de 5 horas de infecção, ERK1/2 determina a fosforilação de c-Jun. Este fato é corroborado com a formação de complexos “AP-1-proteínas” via ERK1/2 (figura 14). A participação de c-Jun neste complexo foi confirmada através de infecção de células A31 expressando proteína selvagem e dominante negativa para este fator (Leite, 2006).

O papel de JNK1/2 sobre seu substrato c-Jun é observado principalmente nos momentos tardios de infecção, quando a quinase se mostra mais fortemente fosforilada. Assim, com 30 horas de infecção, há a formação de complexo “CRE-proteínas” via JNK1/2. A participação de c-Jun neste complexo também foi confirmada através de células expressando proteína dominante negativa para c-Jun (resultado não mostrado). Também podemos sugerir a possibilidade da participação do fator de transcrição ATF-2, neste complexo de ligação à CRE visto que este também é ativo durante o ciclo de multiplicação do VACV pelas vias de JNK1/2 e p38 (resultado não mostrado e Freitas, dados não publicados).

Ainda confirmando o fato da atuação das duas quinases sobre c-Jun, nas células MEF selvagens podemos observar a fosforilação de c-Jun em todos os tempos analisados de 6 a 48 horas (figura 27). Já o padrão observado nas células MEF JNK^{-/-} é de uma forte fosforilação de c-Jun desde 1 hora de infecção, período onde JNK1/2 não se apresenta ainda fosforilada, permanece por 3 e 6 horas após infecção, decaindo logo em seguida, nos tempos de 9 e 12 horas onde se inicia a forte fosforilação de JNK1/2 e decaimento da ativação de ERK1/2 (figura 28).

A participação de c-Jun durante a infecção foi objeto de estudos mais detalhados pelo nosso grupo (Leite, 2006). Estes resultados, demonstram que este fator de transcrição tem um papel importante durante a infecção viral, visto que em células expressando dominância negativa para c-Jun ocorre um decréscimo de mais de 80% na produção viral. Além disto, o fator de transcrição *Egr-1*, demonstrado por Silva e colaboradores, 2006 como essencial durante a infecção pelo VACV tem sua expressão abolida em células expressando dominância negativa para c-Jun. Este fato pode ser diretamente explicado pela presença de elementos AP-1 no promotor do gene *Egr-1*. Desta forma, com os resultados aqui mostrados podemos sugerir que a via MEK-ERK leva à fosforilação de c-Jun e conseqüentemente à formação de dímeros de ligação à AP-1, que, por sua vez, regulam a expressão de *Egr-1*. Assim, a via sinalizadora MEK/ERK/C-JUN/EGR-1 desempenha papel fundamental na biologia do VACV.

Sabendo que JNK1/2 são estimuladas durante a infecção pelo VACV, e ainda pelos resultados obtidos até então, partimos para uma análise com intuito de descobrir qual o papel desta SAPK durante a infecção viral. Como em muitos trabalhos realizados na literatura para avaliar o papel de JNK1/2, inclusive em infecções por diversas famílias de vírus, em um primeiro momento, optamos por utilizar o difundido inibidor farmacológico SP600125. Embora atualmente se saiba que outras quinases também podem ser afetadas por SP600125 (Bain et al, 2003) este continua ser utilizado em recentes trabalhos.

Com o uso de SP600125, verificamos uma drástica inibição da multiplicação viral (figura 24). Também durante a infecção obtivemos uma grande redução da transcrição do gene precoce viral da timidina quinase (figura 21) e uma diminuição na replicação do DNA viral (figura 22) e das proteínas virais (figura 23) que são resultados que relacionam muito bem com a queda na produção viral. No entanto, esta inibição na multiplicação viral não foi confirmada em experimentos preliminares utilizando transfecção de plasmídios dominantes negativo para JNK1/2 (resultados não mostrados) ou em células nocautes para JNK1/2 (figura 25). Assim, não podemos diretamente apontar JNK1/2 como responsável direto pelo impacto causado na infecção viral pelo uso do inibidor.

Desta forma, podemos demonstrar baseado no experimento da figura 26, onde mesmo em células nocautes para JNK1/2, o uso do inibidor foi capaz de diminuir a multiplicação viral, que além da MAPK, SP600125 inibe inespecificamente outra proteína/via sinalizadora.

Bain e colaboradores em 2003, fizeram um estudo de vários inibidores e mostram que SP600125 inibe em maior ou menor extensão outras proteínas quinases. Desta forma, podem surgir outra(s) proteína(s) e/ou vias relacionada com a replicação viral e estudos deverão ser realizados para detectar o papel destas na multiplicação dos diferentes Orthopoxvírus.

Ainda assim, estes dados abrem uma nova perspectiva para este trabalho. SP600125 tem sido amplamente estudado nos últimos anos para possível uso terapêutico no tratamento de diversas doenças. Experimentos realizados em

células e alguns mais avançados realizados em animais, demonstram SP600125 como um candidato a uso terapêutico em tratamentos de asma (Duan & Wong, 2006), isquemia/injúria cerebral (Guan et al, 2006), colite (Assi et al, 2006), câncer (Bulgin et al, 2006), aneurisma da aorta abdominal (Yoshimura et al, 2005 e Yoshimura et al, 2006) e doenças inflamatórias (Bennet et al, 2001).

Aliado a isto, a colaboradora deste trabalho, Dr. Paula Traktman (Universidade de Wisconsin) relata interessantes resultados em experimentos de microscopia eletrônica. Nestes, foi observado que em infecção com *Vaccinia virus* em células BSC-40 utilizando-se SP600125 em doses de 10 a 40 μ M, o ciclo viral não prossegue até o final ficando estacionado na etapa de morfogênese viral onde os vírus se acumulam na forma IV (vírus intracelular), não chegando a formar o IMV. Além de não ser célula específica a atuação de SP600125, também não se resume somente ao *Vaccinia virus*. Jamária Soares (doutorado em andamento) observou resultados semelhantes aos deste trabalho para o Orthopoxvirus *Cowpox*.

Uma grande barreira para o uso de antivirais é a alta citotoxicidade que estes demonstram *in vivo*. SP600125, por já estar sendo testado em animais com resultados promissores, leva uma grande vantagem sobre a maioria dos antivirais atualmente em estudo. Somando-se o que foi relatado até aqui, sugerimos que o inibidor SP600125 seja um potencial candidato no uso terapêutico em tratamentos contra infecções por poxvírus (manuscrito em preparação).

O objetivo deste trabalho, além de caracterizar a via de sinalização de JNK1/2, está também preocupado em desvendar o possível papel desta MAPK. A maior ativação de JNK1/2, de 10 a 15 vezes em relação às células não infectadas, em tempos tardios de infecção nos sugere que o papel desta estaria relacionado com o final da replicação viral especificamente em etapas relacionadas com morfogênese e/ou saída viral. Observamos que não há diferença na multiplicação viral em células nocaute de JNK em relação às células selvagens (figura 25). Podemos afirmar então, que JNK1/2 não tem um papel associado à

produção da partícula viral IMV. No entanto, quando realizamos experimentos de tamanho de placa (figura 29) observamos que em células nocautes para JNK o tamanho da placa se apresenta muito reduzido em relação às células selvagens. Para nossa surpresa, ao avaliarmos o impacto da ausência de JNK na liberação das partículas EEV, obtivemos em nossos resultados um aumento de 60-80% na produção de EEV em células nocautes em relação às células selvagens. Este conjunto de resultados nos sugere fortemente que JNK1/2 poderia ter um papel associado à regulação da disseminação viral, isto é, ao controle da liberação das partículas EEV e propulsão célula-a-célula das partículas CEV.

Como já comentado em tópicos anteriores, é notável a participação de proteínas celulares na movimentação do vírus tanto em etapas da morfogênese quanto em etapas da saída viral. Aliado a estes fatos, estão bem relatados na literatura várias evidências que implicam a via de JNK na migração e movimentação celular. Primeiro a ativação da via de JNK está correlacionada com aumento da migração em uma série de tipos celulares. Estudos em *Drosophila*, demonstram o controle exercido por JNK sobre o citoesqueleto de actina, sendo esta quinase necessária para a formação de filopódio e lamelipódio. Além disto, entre os fatores de transcrição e proteínas relacionadas a apoptose que são substratos de JNK, uma série de proteínas associadas ao citoesqueleto e moléculas sinalizadoras, como também proteínas adaptadoras, têm sido identificadas como substratos de JNK. Estas incluem as proteínas associadas à microtúbulos (MAPs), como MAP1B, MAP2, DCX e SCG10, além da proteína ligante de actina p150-spir. Todas estas citadas estão envolvidas em processos de dinâmica de actina, dinâmica de microtúbulos e adesão (revisto em Huang et al, 2004). Além disto, Verhey e colaboradores em 2001, relataram que a proteína de arcabouço de sinalização de JNK, JIP, interage com a cadeia leve da quinesina, a mesma cadeia de ligação à proteína A36 do *Vaccinia virus*.

O fenótipo de placa reduzido (figura 29) aliado ao aumento da liberação de EEV (figura 30), corroboram que a sinalização JNK1/2 e sua relação com motilidade celular, pode ser importante na saída do vírus. Como foi relatado

anteriormente, a partícula viral IEV, para sair da célula como EEV ou CEV, necessita da movimentação através de microtúbulos até a periferia da célula. E depois, já na membrana celular, para ser impulsionado para a célula vizinha, a partícula CEV necessita da polimerização das caudas de actina.

Coincidentes com os fenômenos que ocorrem na ausência de JNK1/2, vírus mutantes ou deletados para as proteínas A33R e A34R apresentam o mesmo fenótipo de CEV e EEV observados em MEF JNK^{-/-}. A33R é a proteína viral que forma um complexo com A36R para a inserção desta última na membrana do envelope viral e A34R medeia a ligação de CEV com a superfície viral. Está descrito que mutações nos genes A33R, A34R e A36R interferem com a formação de vilosidades contendo actina o que resulta em um menor fenótipo de placa e reduzida virulência.

Além do fenótipo de placa, uma desregulação na liberação do EEV também afeta a virulência. Tanto a linhagem viral quanto a célula hospedeira influenciam na liberação do EEV. Por exemplo, o VACV linhagem IHD-J produz mais EEV que o VACV WR ou o VACV Lister nas células RK13. O aumento da liberação de EEV pela linhagem viral IHD-J está relacionada com a mutação da Lys-151 para Glu na proteína A34R (Blasco et al, 1993). Aliado a este fato, o VACV IHD-J se apresentam menos virulento que os VACV WR e Lister.

Curiosamente o VACV retém significativa quantidade de CEV na superfície celular (Blasco e Moss, 1992). Uma explicação para isto é que existe necessidade de CEV para induzir a formação da cauda de actina. Se os vírus envelopados forem desprendidos da superfície da célula imediatamente, as caudas de actina podem não ser formadas a tempo e dirigir as partículas para fora da célula na forma de EEV, não sendo eficiente a disseminação célula-a-célula.

Todos estes fatos aliados corroboram que JNK1/2 pode ter um papel importante no controle da disseminação do vírus através de CEV e EEV e conseqüentemente na virulência. Sendo assim podemos levantar algumas hipóteses da atuação de JNK1/2 na disseminação viral:

A) através dos efetores regulados por JNK1/2 como os fatores de transcrição, c-Jun e ATF-2, que podem alterar a expressão gênica e regular a organização da actina celular;

B) através da atuação de JNK1/2 sobre as proteínas associadas à microtúbulos (MAPs). Baseado no fato que todos os fenótipos relacionados à actina observados durante o ciclo de multiplicação viral são eficientemente inibidos por nocodazol, como também o rearranjo de actina depende de microtúbulos intactos (Schepis et al, 2006);

C) através da atuação de JNK em ativar a proteína ligante de actina p150-spir que está envolvida na reorganização da actina. Esta proteína que pertence à família de proteínas WASP pode se ligar à proteína Arp2/3 e regular a polimerização da actina que propulsiona as formas CEV célula-a-célula. Vale ressaltar, que o envelopamento da forma viral IMV, ocorre no trans-golgi e resulta no vírus IEV, coincidentemente a mesma localização da p150-spir, proteína fosforilada por JNK1/2. Assim, o transporte viral através dos microtúbulos poderia ocorrer através da quinesina até a periferia da célula onde após a inserção da A36 viral na membrana plasmática e fosforilação dos resíduos de tirosina (112 e 132) recrutariam a maquinaria de polimerização de actina. Este processo em algum ponto requereria a participação de JNK. Além disto, como a retenção no citoplasma de JNK ativada é dependente de JIP, esta proteína poderia funcionar como o arcabouço que localiza MKK/JNK/Jun além do IEV e da quinesina durante o transporte do vírus para a periferia.

D) através de um possível papel de interação com a proteína viral A36R que interage com a cadeia leve da quinesina, mesma proteína com a qual a proteína de arcabouço JIP pode interagir;

E) através de um possível papel associado às funções das proteínas virais A33R e A34R que quando ausentes ou mutadas apresentam o mesmo fenótipo observado nas células JNK^{-/-};

F) o envolvimento de JNK na reorganização de actina é dependente de sinais mediados pelas GTPases Rac e CDC42. Locker e colaboradores, 2000, demonstraram que Rac desempenha importante papel na entrada do VACV. Além disso, estudos realizados pela doutoranda Ana Paula Salgado, revelam que o VACV estimula a via sinalizadora JNK/Jun dependente de Rac.

Estas evidências reforçam a idéia de que JNK desempenha papel na liberação das partículas virais. Andrade e colaboradores, 2004, demonstraram que a estimulação de MEK/ERK pelo VACV é dependente da reorganização de actina precocemente durante infecção (2hpi), o mesmo sendo observado com a polimerização de microtúbulos. Assim, podemos afirmar que a reorganização do citoesqueleto tenha importante papel na ativação de MEK/ERK e conseqüente entrada de VACV na célula e que JNK desempenha funções associadas á liberação da partícula viral, coincidindo com sua ativação máxima entre 24 e 36 horas.

Curiosamente, JNK1/2 está envolvida na indução de IL-6 (figura 31). Esta citocina tem muitas funções diferentes que são importantes na resposta antiviral. Está envolvida na produção de anticorpo, diferenciação de linfócito T citotóxico, na resposta inflamatória, febre e resposta de fase aguda.

A indução de IL-6 por JNK1/2 pode ser regulada pela ligação de fatores de transcrição à CRE presente no promotor da citocina. Levando-se em consideração que JNK1/2 está envolvida com a fosforilação de c-Jun e ATF-2 durante a infecção e ainda que a curva de indução de IL-6 acompanha a curva de ativação da MAPK, sendo máxima quando a ativação de JNK atinge seu pico.

Este resultado corrobora com trabalho de Rokita e colaboradores, 1998 que observaram que a transcrição de IL-6, bem como o aumento dos níveis da proteína em fibroblastos infectados com VACV WR ocorre de 24 a 48 horas. Ainda, em infecção de macacos com o *Variola virus* observou-se elevadas concentrações de IL-6 (Jahrling et al, 2004).

A partir deste conjunto de resultados, podemos também sugerir que JNK1/2, durante a infecção pelo VACV parece ter um papel imuno-modulatório. A ausência de JNK na célula hospedeira prejudica a saída viral observada através da redução da disseminação célula-a-célula pelo CEV e da desregulação com o aumento da liberação de EEV. Ao mesmo tempo, observamos que JNK1/2 tem um papel relacionado à modulação da resposta do hospedeiro através da indução da citocina IL-6, uma importante mediadora da resposta antiviral.

Ainda Ramshaw et al, 1997, relatam que camundongos deficientes em IFN-gama, receptor de IFN-gama, receptores de IFN-alfa e IL-6 são altamente susceptíveis à infecção por poxvírus com alta taxa de mortalidade. Assim, parece que a função de resposta celular associada à JNK1/2, através da indução de IL-6, pode não representar uma grande ameaça ao sucesso replicativo do VACV, pelo menos *in vitro*, levando em consideração que o vírus na presença de JNK1/2 produz IMV e se dissemina normalmente através das formas CEV e EEV.

Esta dupla função de JNK1/2 representa de forma clara o balanço da relação vírus-hospedeiro. Assim como fatores celulares podem ser fundamentais em etapas distintas do ciclo de multiplicação viral têm também suas funções relacionadas com resposta celular, inflamatória e antiviral.

Evolutivamente, a relação parasita-hospedeiro melhor sucedida é aquela que tende a um equilíbrio entre ambas as partes. Nestas relações, os parasitas mais adaptados aos seus hospedeiros são aqueles que conseguem se disseminar no organismo, sem contudo levar o hospedeiro a óbito, assim como permanecer na população.

O poxvírus *Vaccinia* é um exemplo de vírus adaptado que possui um grande número de estratégias para minimizar as defesas do hospedeiro e tirar grande proveito da estrutura celular de modo a favorecer e otimizar a sua produção e disseminação (Finlay e McFadden, 2006; Bonjardim, 2005; Alcami, 2003).

De forma geral, este trabalho contribui para elucidar um intrincado mecanismo de interação VACV-célula hospedeira envolvendo a ativação de duas vias sinalizadoras celulares: MEK/ERK e MKK4/7/JNK1/2, as quais utilizam o fator de ativação transcricional c-Jun como o elemento integrador dos sinais transmitidos através das mesmas durante a infecção pelo VACV.

A estratégia viral é bem sucedida para determinar a ativação predominante de uma das vias para atender necessidades temporais virais distintas. Assim, verificamos que a ativação de MEK/ERK, cuja ativação prevalece nas fases precoce/intermediária da infecção, coincide com a fase de crescimento viral, o que está em concordância com o papel desempenhado por MEK/ERK anteriormente definido por nosso grupo (Andrade et al, 2004; Silva et al, 2006). É importante ressaltar que embora JNK1/2 também seja ativada em período coincidentes com a ativação de MEK/ERK, a estimulação destas quinases pelo VACV sempre é mantida abaixo dos níveis de ativação verificados para MEK/ERK. Como podemos demonstrar, JNK1/2 não desempenha papel associado a multiplicação viral, e considerando as atividades biológicas veiculadas por esta via, ora são coincidentes (proliferação) ora são opostas (apoptose, inflamação), a manutenção de MEK/ERK em níveis superiores àqueles de MKK4/7/JNK, poderia ser interpretado como controle exercido pelo vírus sobre os fatores que favorecem a proliferação e conseqüente multiplicação viral. Isto ocorre uma vez que as atividades associadas à JNK1/2 poderiam ser conflitantes até que a progênie viral fosse gerada. Portanto, após garantir o sucesso multiplicativo, o VACV permitiria nos momentos intermediários/tardios da infecção que as funções associadas à disseminação da infecção fossem privilegiadas como conseqüência do predomínio da ativação de JNK.

Com base nos resultados obtidos neste trabalho, propomos um modelo a somar nos já conhecidos eventos de sinalização requeridos durante a infecção pelo *Vaccinia virus* (Figura 32).

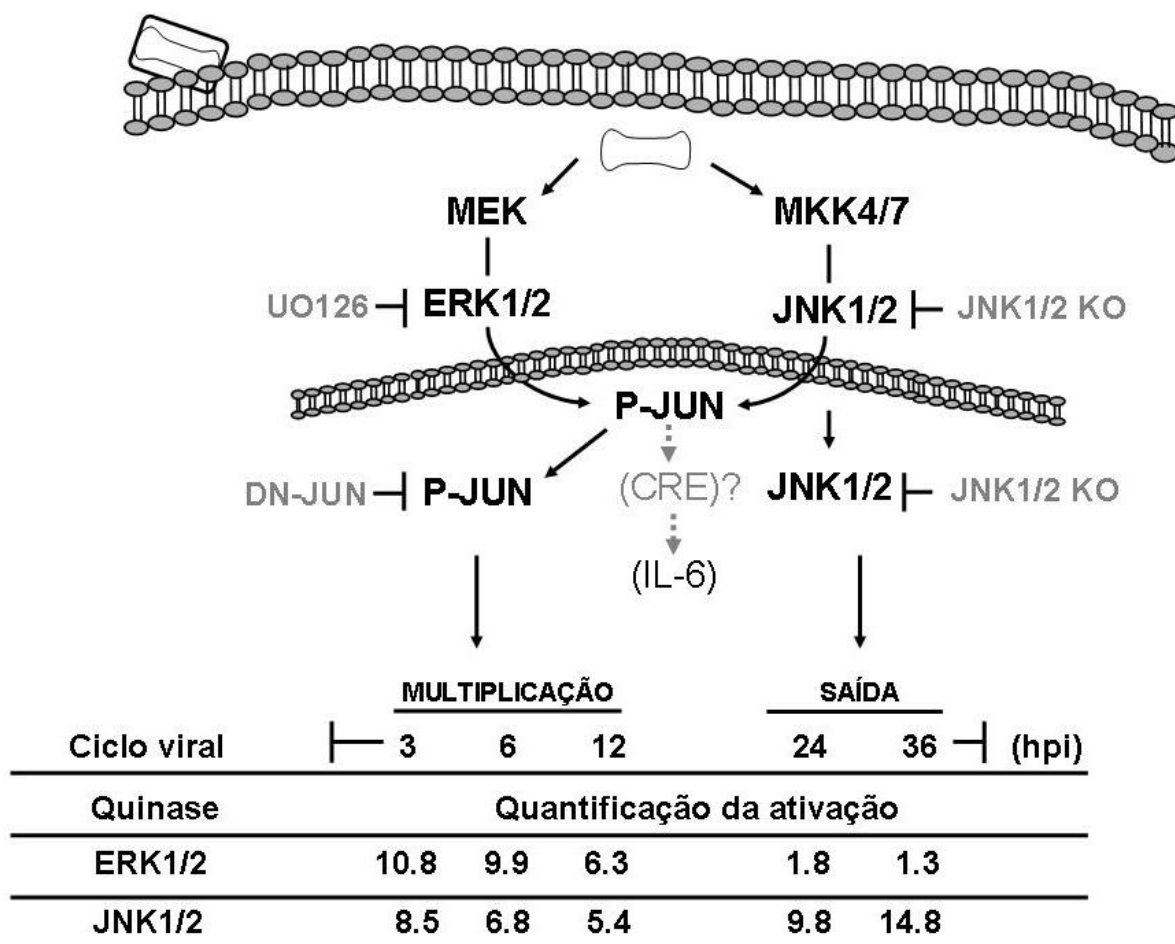


Figura 32: Representação da ativação das MAPKs durante o ciclo de multiplicação do VACV.

A infecção pelo VACV leva à ativação das vias das MAPKs MEK/ERK1/2 e MKK4/7/JNK1/2. os sinais transmitidos por ambas vias convergem para a ativação do fator de transcrição c-Jun. Embora a ativação das vias se sobreponha durante um determinado período de tempo, o VACV demonstra modular as MAPKs de acordo com suas necessidades biológicas. Desta forma, MEK/ERK/c-Jun está ligada á replicação viral sendo esta via ativada em momentos precoce/intermediários do ciclo. MKK4/7/JNK1/2/c-Jun têm sua ativação máxima em momentos tardios de infecção e parece estar relacionada com o controle da liberação das formas CEV e EEV. A via MKK4/7/JNK1/2 também está envolvida com a expressão da citocina IL-6 provavelmente através da formação de heterodímeros c-Jun/ATF-2 que podem se ligar na seqüência regulatória CRE no promotor do gene.

7 – CONCLUSÕES

Neste trabalho demonstramos que a infecção pelo VACV induz à ativação das MAPKs ERK1/2 e JNK1/2. A cinética de fosforilação destas quinases variam entre si. As MAPKs ERK1/2 se mostraram fortemente ativas nos momentos iniciais a intermediários da infecção viral, diminuindo expressivamente nos tempos tardios de infecção. As MAPKs JNK1/2 se mostraram ativadas desde momentos precoces da infecção viral, porém estão fortemente fosforiladas em tempos tardios.

Demonstramos que a via de sinalização de JNK1/2 é independente do fator de crescimento do *Vaccinia virus* (VGF), mas é dependente da sinalização das MAPKs MKK4 e MKK7.

O conjunto de resultados obtidos demonstram que a ativação da via de JNK1/2 além de ser dependente de vírus competente-replicativo e provavelmente do desnudamento primário, é independente da expressão dos genes tardios. Além disto, a ativação de JNK se mostrou ser independente da proteína quinase serina-treonina viral B1R.

Nossos resultados fornecem evidência que ERK1/2 e JNK1/2 regulam temporalmente a fosforilação do fator de transcrição c-Jun e esta regulação leva à formação de complexos DNA-proteínas com os consensos de AP-1 via ERK1/2 e CRE, via JNK1/2.

Demonstramos que o inibidor farmacológico, SP600125, inibe a transcrição de gene precoce bem como a replicação do DNA viral e demonstra ser, por sua capacidade de conter a multiplicação viral, potencial candidato no uso terapêutico antiviral contra Orthopoxvirus.

JNK1/2 não tem papel na multiplicação do *Vaccinia virus* mas demonstra ter um papel no controle da disseminação viral célula-a-célula. Além disto, JNK1/2 demonstra ter um papel na indução da citocina IL-6 durante a replicação.

A modulação das vias sinalizadoras celulares MEK/ERK1/2 e MKK4/7/JNK1/2 levando a ativação de c-Jun, exercida pelo VACV durante todo o seu ciclo multiplicativo, atende, portanto, necessidades virais distintas temporalmente.

8 – PERSPECTIVAS

A partir do conjunto de resultados gerados neste trabalho, várias questões precisam, no entanto, ser elucidadas:

1. Avaliar o efeito de JNK1/2 sobre proteínas do citoesqueleto, especificamente actina. As JNK KO serão comparadas com as MEF WT, após infecção e marcação com faloidina (cora actina em vermelho) e análise em microscopia confocal, para observação da dispersão viral CEV e EEV.
2. Considerando-se que os fenótipos virais associados aos mutantes KO para os genes virais A33R e A34R, coincidem com a menor produção de CEV e aumento na liberação de EEV observada durante a infecção das células JNK KO, será interessante observar à microscopia eletrônica se a morfogênese do IEV se encontra alterada quando o VACV é multiplicado em células JK KO
3. Restaurar a deficiência das células JNK KO através de transfecção com os cDNAs de JNK1 e JNK2 e analisar a reversão fenotípica, tanto do tamanho de placa de lise viral (CEV), quanto da dispersão da partícula EEV.

9 – BIBLIOGRAFIA

Adachi-Yamada T, K. Fujimura-Kamada *et al.* Distortion of proximodistal information causes JNK-dependent apoptosis in *Drosophila* wing. Nature 400: 166-9. 1999.

Alcami, A. Viral mimicry of cytokines, chemokines and their receptors. Nat Rev Immunol, v.3, n.1, Jan, p.36-50. 2003.

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

Appleyard, G., A. J. Hapel, *et al.* An antigenic difference between intracellular and extracellular rabbitpox virus. J Gen Virol, v.13, n.1, Oct, p.9-17. 1971.

Assi, K., R. Pillai, *et al.* The specific JNK inhibitor SP600125 targets tumour necrosis factor-alpha production and epithelial cell apoptosis in acute murine colitis. Immunology, v.118, n.1, May, p.112-21. 2006.

Bablanian, R., B. Baxt, *et al.* Studies on the mechanisms of vaccinia virus cytopathic effects. II. Early cell rounding is associated with virus polypeptide synthesis. J Gen Virol, v.39, n.3, Jun, p.403-13. 1978.

Bablanian, R., G. Coppola, *et al.* Inhibition of protein synthesis by vaccinia virus. III. The effect of ultraviolet-irradiated virus on the inhibition of protein synthesis. Virology, v.112, n.1, Jul 15, p.1-12. 1981.

Bain, J., H. Mclauchlan, *et al.* The specificities of protein kinase inhibitors: an update. Biochem J, v.371, n.Pt 1, Apr 1, p.199-204. 2003.

Banham, A. H. e G. L. Smith. Vaccinia virus gene B1R encodes a 34-kDa serine/threonine protein kinase that localizes in cytoplasmic factories and is packaged into virions. Virology, v.191, n.2, Dec, p.803-12. 1992.

Barr, R. K. e M. A. Bogoyevitch. The c-Jun N-terminal protein kinase family of mitogen-activated protein kinases (JNK MAPKs). Int J Biochem Cell Biol, v.33, n.11, Nov, p.1047-63. 2001.

Barry, M & McFadden, G. Regulation of Apoptosis by Poxviruses. In *Effects of Microbes on the Immune System* (Eds. Cunningham, M. W. & Fujinami, R. S.), Chapter 31, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 509-520. (2000).

Barry, M., S. T. Wasilenko, *et al.* Apoptosis regulator genes encoded by poxviruses. Prog Mol Subcell Biol, v.36, p.19-37. 2004.

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

Bennett, B. L., D. T. Sasaki, *et al.* SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. Proc Natl Acad Sci U S A, v.98, n.24, Nov 20, p.13681-6. 2001.

Blomquist, M. C., L. T. Hunt, *et al.* Vaccinia virus 19-kilodalton protein: relationship to several mammalian proteins, including two growth factors. Proc Natl Acad Sci U S A, v.81, n.23, Dec, p.7363-7. 1984.

Bogoyevitch, M. A. e B. Kobe. Uses for JNK: the many and varied substrates of the c-Jun N-terminal kinases. Microbiol Mol Biol Rev, v.70, n.4, Dec, p.1061-95. 2006.

Bogoyevitch, M. A., I. Boehm, *et al.* Targeting the JNK MAPK cascade for inhibition: basic science and therapeutic potential. Biochim Biophys Acta, v.1697, n.1-2, Mar 11, p.89-101. 2004.

Bonjardim, C. A. Interferons (IFNs) are key cytokines in both innate and adaptive antiviral immune responses--and viruses counteract IFN action. Microbes Infect, v.7, n.3, Mar, p.569-78. 2005.

Bowie, A., E. Kiss-Toth, *et al.* A46R and A52R from vaccinia virus are antagonists of host IL-1 and toll-like receptor signaling. Proc Natl Acad Sci U S A, v.97, n.18, Aug 29, p.10162-7. 2000.

Broyles, S. S., X. Liu, *et al.* Transcription factor YY1 is a vaccinia virus late promoter activator. J Biol Chem, v.274, n.50, Dec 10, p.35662-7. 1999.

Bulgin, D., A. Podtcheko, *et al.* Selective pharmacologic inhibition of c-Jun NH2-terminal kinase radiosensitizes thyroid anaplastic cancer cell lines via induction of terminal growth arrest. Thyroid, v.16, n.3, Mar, p.217-24. 2006.

Burridge, K. e K. Wennerberg. Rho and Rac take center stage. Cell, v.116, n.2, Jan 23, p.167-79. 2004.

Campos, M. A. S.; Kroon, E. G. Critical period for irreversible block of Vaccinia virus replication. Rev. Microbiol. v.24, p.104-110, 1993.

Carter, G. C., M. Law, *et al.* Entry of the vaccinia virus intracellular mature virion and its interactions with glycosaminoglycans. J Gen Virol, v.86, n.Pt 5, May, p.1279-90. 2005.

Chiu, W. L., P. Szajner, *et al.* Effects of a temperature sensitivity mutation in the J1R protein component of a complex required for vaccinia virus assembly. J Virol, v.79, n.13, Jul, p.8046-56. 2005.

Chomczynski, P.; Sacchi, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. v.162, p.156-9, 1987.

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

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

Cudmore, S., P. Cossart, *et al.* Actin-based motility of vaccinia virus. Nature, v.378, n.6557, Dec 7, p.636-8. 1995.

Da Fonseca, F. e B. Moss. Poxvirus DNA topoisomerase knockout mutant exhibits decreased infectivity associated with reduced early transcription. Proc Natl Acad Sci U S A, v.100, n.20, Sep 30, p.11291-6. 2003.

Dales, S. The uptake and development of vaccinia virus in strain L cells followed with labeled viral deoxyribonucleic acid. J Cell Biol, v.18, Jul, p.51-72. 1963.

Damaso, C. R., J. J. Esposito, *et al.* An emergent poxvirus from humans and cattle in Rio de Janeiro State: Cantagalo virus may derive from Brazilian smallpox vaccine. Virology, v.277, n.2, Nov 25, p.439-49. 2000.

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

De Magalhaes, J. C., A. A. Andrade, *et al.* A mitogenic signal triggered at an early stage of vaccinia virus infection: implication of MEK/ERK and protein kinase A in virus multiplication. J Biol Chem, v.276, n.42, Oct 19, p.38353-60. 2001.

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

Dignam, J. D.; Lebovitz, R. M.; Roeder, R. G. Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. Nucleic Acids Res. v.11, p.1475-89, 1983.

- Duan, W. e W. S. Wong. Targeting mitogen-activated protein kinases for asthma. Curr Drug Targets, v.7, n.6, Jun, p.691-8. 2006.
- Dubochet, J., M. Adrian, *et al.* Structure of intracellular mature vaccinia virus observed by cryoelectron microscopy. J Virol, v.68, n.3, Mar, p.1935-41. 1994.
- Dunn, C., C. Wiltshire, *et al.* Molecular mechanism and biological functions of c-Jun N-terminal kinase signalling via the c-Jun transcription factor. Cell Signal, v.14, n.7, Jul, p.585-93. 2002.
- Eferl, R., R. Ricci, *et al.* Liver tumor development. c-Jun antagonizes the proapoptotic activity of p53. Cell, v.112, n.2, Jan 24, p.181-92. 2003.
- Esposito, J. J.; Knight, J. C. Orthopoxvirus DNA: a comparison of restriction profiles and maps. Virology. v.143, p.230-51, 1985.
- Fenner, F. Historical vignette: a life with poxviruses and publishers. Adv Virus Res, v.51, p.1-33. 1998.
- Finlay, B. B. e G. Mcfadden. Anti-immunology: evasion of the host immune system by bacterial and viral pathogens. Cell, v.124, n.4, Feb 24, p.767-82. 2006.
- Fonseca, F. G., M. C. Lanna, *et al.* Morphological and molecular characterization of the poxvirus BeAn 58058. Arch Virol, v.143, n.6, p.1171-86. 1998.
- Fuchs, S. Y., V. Adler, *et al.* MEKK1/JNK signaling stabilizes and activates p53. Proc Natl Acad Sci U S A, v.95, n.18, Sep 1, p.10541-6. 1998.
- Goebel, S. J., G. P. Johnson, *et al.* The complete DNA sequence of vaccinia virus. Virology, v.179, n.1, Nov, p.247-66, 517-63. 1990.

Griffiths, G., R. Wepf, *et al.* Structure and assembly of intracellular mature vaccinia virus: isolated-particle analysis. J Virol, v.75, n.22, Nov, p.11034-55. 2001.

Guan, Q. H., D. S. Pei, *et al.* Neuroprotection against ischemic brain injury by SP600125 via suppressing the extrinsic and intrinsic pathways of apoptosis. Brain Res, v.1092, n.1, May 30, p.36-46. 2006.

Gupta, S., T. Barrett, *et al.* Selective interaction of JNK protein kinase isoforms with transcription factors. Embo J, v.15, n.11, Jun 3, p.2760-70. 1996.

Haga, I. R. e A. G. Bowie. Evasion of innate immunity by vaccinia virus. Parasitology, v.130 Suppl, p.S11-25. 2005.

Hagemann, C. e J. L. Blank. The ups and downs of MEK kinase interactions. Cell Signal, v.13, n.12, Dec, p.863-75. 2001.

Hall, A. Rho GTPases and the actin cytoskeleton. Science, v.279, n.5350, Jan 23, p.509-14. 1998.

Hallberg, B., S. I. Rayter, *et al.* Interaction of Ras and Raf in intact mammalian cells upon extracellular stimulation. J Biol Chem, v.269, n.6, Feb 11, p.3913-6. 1994.

Hargett, D., T. Mclean, *et al.* Herpes simplex virus ICP27 activation of stress kinases JNK and p38. J Virol, v.79, n.13, Jul, p.8348-60. 2005.

Hazan-Halevy, I., R. Seger, *et al.* The requirement of both extracellular regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase for stimulation of cytosolic phospholipase A(2) activity by either FcgammaRIIA or FcgammaRIIB in human neutrophils. A possible role for Pyk2 but not for the Grb2-Sos-Shc complex. J Biol Chem, v.275, n.17, Apr 28, p.12416-23. 2000.

Henderson, D. A., T. V. Inglesby, *et al.* Smallpox as a biological weapon: medical and public health management. Working Group on Civilian Biodefense. Jama, v.281, n.22, Jun 9, p.2127-37. 1999.

Heuser, J. Deep-etch EM reveals that the early poxvirus envelope is a single membrane bilayer stabilized by a geodetic "honeycomb" surface coat. J Cell Biol, v.169, n.2, Apr 25, p.269-83. 2005.

Hollinshead, M., G. Rodger, *et al.* Vaccinia virus utilizes microtubules for movement to the cell surface. J Cell Biol, v.154, n.2, Jul 23, p.389-402. 2001.

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

Ichihashi, Y., S. Matsumoto, *et al.* Biogenesis of poxviruses: role of A-type inclusions and host cell membranes in virus dissemination. Virology, v.46, n.3, Dec, p.507-32. 1971.

Inglesby, T. V., D. A. Henderson, *et al.* Anthrax as a biological weapon: medical and public health management. Working Group on Civilian Biodefense. Jama, v.281, n.18, May 12, p.1735-45. 1999.

Ip, Y. T. e R. J. Davis. Signal transduction by the c-Jun N-terminal kinase (JNK)--from inflammation to development. Curr Opin Cell Biol, v.10, n.2, Apr, p.205-19. 1998.

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

Jasper, H., V. Benes, *et al.* The genomic response of the Drosophila embryo to JNK signaling. Dev Cell, v.1, n.4, Oct, p.579-86. 2001.

Jensen, O. N., T. Houthaeve, *et al.* Identification of the major membrane and core proteins of vaccinia virus by two-dimensional electrophoresis. J Virol, v.70, n.11, Nov, p.7485-97. 1996.

Johnson, G. P., S. J. Goebel, *et al.* An update on the vaccinia virus genome. Virology, v.196, n.2, Oct, p.381-401. 1993.

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

Karin, M., Z. Liu, *et al.* AP-1 function and regulation. Curr Opin Cell Biol, v.9, n.2, Apr, p.240-6. 1997.

Knutson, B. A., X. Liu, *et al.* Vaccinia virus intermediate and late promoter elements are targeted by the TATA-binding protein. J Virol, v.80, n.14, Jul, p.6784-93. 2006.

Kotwal, G. J. Poxviral mimicry of complement and chemokine system components: what's the end game? Immunol Today, v.21, n.5, May, p.242-8. 2000.

Kuan, C. Y., D. D. Yang, *et al.* The Jnk1 and Jnk2 protein kinases are required for regional specific apoptosis during early brain development. Neuron, v.22, n.4, Apr, p.667-76. 1999.

Kyriakis, J. M. e J. Avruch. Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. Physiol Rev, v.81, n.2, Apr, p.807-69. 2001.

Kyriakis, J. M., D. L. Brautigan, *et al.* pp54 microtubule-associated protein-2 kinase requires both tyrosine and serine/threonine phosphorylation for activity. J Biol Chem, v.266, n.16, Jun 5, p.10043-6. 1991.

Law, M., G. C. Carter, *et al.* Ligand-induced and nonfusogenic dissolution of a viral membrane. Proc Natl Acad Sci U S A, v.103, n.15, Apr 11, p.5989-94. 2006.

Law, M., M. M. Putz, *et al.* An investigation of the therapeutic value of vaccinia-immune IgG in a mouse pneumonia model. J Gen Virol, v.86, n.Pt 4, Apr, p.991-1000. 2005.

Lefkowitz, E. J., C. Wang, *et al.* Poxviruses: past, present and future. Virus Res, v.117, n.1, Apr, p.105-18. 2006.

Leite, F. G. G. A contribuição do fator transcricional c-Jun à multiplicação do *Vaccinia virus*. Dissertação de Mestrado. Departamento de Microbiologia – UFMG – Fevereiro – 2006.

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

Locker, J. K., A. Kuehn, *et al.* Entry of the two infectious forms of vaccinia virus at the plasma membrane is signaling-dependent for the IMV but not the EEV. Mol Biol Cell, v.11, n.7, Jul, p.2497-511. 2000.

Ludwig, S., C. Ehrhardt, *et al.* Influenza virus-induced AP-1-dependent gene expression requires activation of the JNK signaling pathway. J Biol Chem, v.276, n.24, Jun 15, p.10990-8. 2001.

Luo, H., B. Yanagawa, *et al.* Coxsackievirus B3 replication is reduced by inhibition of the extracellular signal-regulated kinase (ERK) signaling pathway. J Virol, v.76, n.7, Apr, p.3365-73. 2002.

Mahalingam, S., I. K. Damon, *et al.* 25 years since the eradication of smallpox: why poxvirus research is still relevant. Trends Immunol, v.25, n.12, Dec, p.636-9. 2004.

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

Mclean, T. I. e S. L. Bachenheimer. Activation of cJUN N-terminal kinase by herpes simplex virus type 1 enhances viral replication. J Virol, v.73, n.10, Oct, p.8415-26. 1999.

Moss, B. *Poxviridae: the viruses and their replication* (Fields, B.N., Knipe, D.M. and Howley, P.M. Ed.) Lippincot-Raven Press Publisher Philadelphia. 2001.

Munter, S., M. Way, *et al.* Signaling during pathogen infection. Sci STKE, v.2006, n.335, May 16, p.re5. 2006.

Newsome, T. P., N. Scaplehorn, *et al.* SRC mediates a switch from microtubule- to actin-based motility of vaccinia virus. Science, v.306, n.5693, Oct 1, p.124-9. 2004.

Oh, J. e S. S. Broyles. Host cell nuclear proteins are recruited to cytoplasmic vaccinia virus replication complexes. J Virol, v.79, n.20, Oct, p.12852-60. 2005.

Ono, K. e J. Han. The p38 signal transduction pathway: activation and function. Cell Signal, v.12, n.1, Jan, p.1-13. 2000.

Payne, L. G. e E. Norrby. Adsorption and penetration of enveloped and naked vaccinia virus particles. J Virol, v.27, n.1, Jul, p.19-27. 1978.

Pearson, L. L., B. E. Castle, *et al.* CD40-mediated signaling in monocytic cells: up-regulation of tumor necrosis factor receptor-associated factor mRNAs and activation of mitogen-activated protein kinase signaling pathways. Int Immunol, v.13, n.3, Mar, p.273-83. 2001.

Pereira, A. C. T. C. Análise da ativação das MAPKs durante a infecção viral pelo *Vaccinia virus*: envolvimento de ERK, JNK e p38. Dissertação de Mestrado – Departamento de Microbiologia – UFMG. Janeiro – 2003.

Pouyssegur, J., V. Volmat, *et al.* Fidelity and spatio-temporal control in MAP kinase (ERKs) signalling. Biochem Pharmacol, v.64, n.5-6, Sep, p.755-63. 2002.

Ramshaw, I. A., A. J. Ramsay, *et al.* Cytokines and immunity to viral infections. Immunol Rev, v.159, Oct, p.119-35. 1997.

Rempel, R. E. e P. Traktman. Vaccinia virus B1 kinase: phenotypic analysis of temperature-sensitive mutants and enzymatic characterization of recombinant proteins. J Virol, v.66, n.7, Jul, p.4413-26. 1992.

Rempel, R. E.; Anderson, M. K.; *et al* Temperature-sensitive vaccinia virus mutants identify a gene with an essential role in viral replication. J. Virol. v.64, p.574-83, 1990.

Resch, W., A. S. Weisberg, *et al.* Vaccinia virus nonstructural protein encoded by the A11R gene is required for formation of the virion membrane. J Virol, v.79, n.11, Jun, p.6598-609. 2005.

Rincon, M., A. Whitmarsh, *et al.* The JNK pathway regulates the In vivo deletion of immature CD4(+)CD8(+) thymocytes. J Exp Med, v.188, n.10, Nov 16, p.1817-30. 1998.

Robinson, M. J. e M. H. Cobb. Mitogen-activated protein kinase pathways. Curr Opin Cell Biol, v.9, n.2, Apr, p.180-6. 1997.

Rottger, S., F. Frischknecht, *et al.* Interactions between vaccinia virus IEV membrane proteins and their roles in IEV assembly and actin tail formation. J Virol, v.73, n.4, Apr, p.2863-75. 1999.

Sabapathy, K., W. Jochum, *et al.* Defective neural tube morphogenesis and altered apoptosis in the absence of both JNK1 and JNK2. Mech Dev, v.89, n.1-2, Dec, p.115-24. 1999.

Sambrook, J. & Russel, D. W. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 3rd. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY – USA, 1989.

Sanderson, C. M., M. Hollinshead, *et al.* The vaccinia virus A27L protein is needed for the microtubule-dependent transport of intracellular mature virus particles. J Gen Virol, v.81, n.Pt 1, Jan, p.47-58. 2000.

Santos, C. R., S. Blanco, *et al.* Vaccinia virus B1R kinase interacts with JIP1 and modulates c-Jun-dependent signaling. J Virol, v.80, n.15, Aug, p.7667-75. 2006.

Schepis, A., B. Schramm, *et al.* Vaccinia virus-induced microtubule-dependent cellular rearrangements. Traffic, v.7, n.3, Mar, p.308-23. 2006.

Schmelz, M., B. Sodeik, *et al.* Assembly of vaccinia virus: the second wrapping cisterna is derived from the trans Golgi network. J Virol, v.68, n.1, Jan, p.130-47. 1994.

Schreiber, M., A. Kolbus, *et al.* Control of cell cycle progression by c-Jun is p53 dependent. Genes Dev, v.13, n.5, Mar 1, p.607-19. 1999.

Senkevich, T. G. e B. Moss. Vaccinia virus H2 protein is an essential component of a complex involved in virus entry and cell-cell fusion. J Virol, v.79, n.8, Apr, p.4744-54. 2005.

Senkevich, T. G., B. M. Ward, *et al.* Vaccinia virus entry into cells is dependent on a virion surface protein encoded by the A28L gene. J Virol, v.78, n.5, Mar, p.2357-66. 2004.

Senkevich, T. G., S. Ojeda, *et al.* Poxvirus multiprotein entry-fusion complex. Proc Natl Acad Sci U S A, v.102, n.51, Dec 20, p.18572-7. 2005.

Sepkowitz, K. A. How contagious is vaccinia? N Engl J Med, v.348, n.5, Jan 30, p.439-46. 2003.

- Si, X., H. Luo, *et al.* Stress-activated protein kinases are involved in coxsackievirus B3 viral progeny release. J Virol, v.79, n.22, Nov, p.13875-81. 2005.
- Silva, P. N., J. A. Soares, *et al.* Differential role played by the MEK/ERK/EGR-1 pathway in orthopoxviruses vaccinia and cowpox biology. Biochem J, v.398, n.1, Aug 15, p.83-95. 2006.
- Smith, G. L. Secreted poxvirus proteins that interact with the immune system. In Effects of Microbes on the Immune System (Eds. Cunningham, M. W. & Funijinami, R. S.), Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp.491-507. 2000.
- Smith, G. L., A. Vanderplasschen, *et al.* The formation and function of extracellular enveloped vaccinia virus. J Gen Virol, v.83, n.Pt 12, Dec, p.2915-31. 2002.
- Smith, G. L., B. J. Murphy, *et al.* Vaccinia virus motility. Annu Rev Microbiol, v.57, p.323-42. 2003.
- Sodeik, B. e J. Krijnse-Locker. Assembly of vaccinia virus revisited: de novo membrane synthesis or acquisition from the host? Trends Microbiol, v.10, n.1, Jan, p.15-24. 2002.
- Sodeik, B., R. W. Doms, *et al.* Assembly of vaccinia virus: role of the intermediate compartment between the endoplasmic reticulum and the Golgi stacks. J Cell Biol, v.121, n.3, May, p.521-41. 1993.
- Sumbayev, V. V. e I. M. Yasinska. Role of MAP kinase-dependent apoptotic pathway in innate immune responses and viral infection. Scand J Immunol, v.63, n.6, Jun, p.391-400. 2006.

Townsley, A. C., T. G. Senkevich, *et al.* The product of the vaccinia virus L5R gene is a fourth membrane protein encoded by all poxviruses that is required for cell entry and cell-cell fusion. J Virol, v.79, n.17, Sep, p.10988-98. 2005.

Townsley, A. C., T. G. Senkevich, *et al.* Vaccinia virus A21 virion membrane protein is required for cell entry and fusion. J Virol, v.79, n.15, Aug, p.9458-69. 2005.

Traktman, P., A. Caligiuri, *et al.* Temperature-sensitive mutants with lesions in the vaccinia virus F10 kinase undergo arrest at the earliest stage of virion morphogenesis. J Virol, v.69, n.10, Oct, p.6581-7. 1995.

Traktman, P., K. Liu, *et al.* Elucidating the essential role of the A14 phosphoprotein in vaccinia virus morphogenesis: construction and characterization of a tetracycline-inducible recombinant. J Virol, v.74, n.8, Apr, p.3682-95. 2000.

Traktman, P., M. K. Anderson, *et al.* Vaccinia virus encodes an essential gene with strong homology to protein kinases. J Biol Chem, v.264, n.36, Dec 25, p.21458-61. 1989.

Tzahar, E., J. D. Moyer, *et al.* Pathogenic poxviruses reveal viral strategies to exploit the ErbB signaling network. Embo J, v.17, n.20, Oct 15, p.5948-63. 1998.

Unger, B. e P. Traktman. Vaccinia virus morphogenesis: a13 phosphoprotein is required for assembly of mature virions. J Virol, v.78, n.16, Aug, p.8885-901. 2004.

Upton, C., S. Slack, *et al.* Poxvirus orthologous clusters: toward defining the minimum essential poxvirus genome. J Virol, v.77, n.13, Jul, p.7590-600. 2003.

Van Eijl, H., M. Hollinshead, *et al.* The vaccinia virus F12L protein is associated with intracellular enveloped virus particles and is required for their egress to the cell surface. J Gen Virol, v.83, n.Pt 1, Jan, p.195-207. 2002.

Vanderplasschen, A., M. Hollinshead, *et al.* Intracellular and extracellular vaccinia virions enter cells by different mechanisms. J Gen Virol, v.79 (Pt 4), Apr, p.877-87. 1998.

Verhey, K. J., D. Meyer, *et al.* Cargo of kinesin identified as JIP scaffolding proteins and associated signaling molecules. J Cell Biol, v.152, n.5, Mar 5, p.959-70. 2001.

Wang, F., Y. Ma, *et al.* Disruption of Erk-dependent type I interferon induction breaks the myxoma virus species barrier. Nat Immunol, v.5, n.12, Dec, p.1266-74. 2004.

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

Ward, B. M. e B. Moss. Vaccinia virus intracellular movement is associated with microtubules and independent of actin tails. J Virol, v.75, n.23, Dec, p.11651-63. 2001.

Ward, B. M. The longest micron; transporting poxviruses out of the cell. Cell Microbiol, v.7, n.11, Nov, p.1531-8. 2005.

Weiss, C. e D. Bohmann. Deregulated repression of c-Jun provides a potential link to its role in tumorigenesis. Cell Cycle, v.3, n.2, Feb, p.111-3. 2004.

Widmann, C., S. Gibson, *et al.* Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. Physiol Rev, v.79, n.1, Jan, p.143-80. 1999.

Wilton, S., A. R. Mohandas, *et al.* Organization of the vaccinia envelope and relationship to the structure of intracellular mature virions. Virology, v.214, n.2, Dec 20, p.503-11. 1995.

Wolffe, E. J., A. S. Weisberg, *et al.* The vaccinia virus A33R protein provides a chaperone function for viral membrane localization and tyrosine phosphorylation of the A36R protein. J Virol, v.75, n.1, Jan, p.303-10. 2001.

Wolffe, E. J., D. M. Moore, *et al.* Vaccinia virus A17L open reading frame encodes an essential component of nascent viral membranes that is required to initiate morphogenesis. J Virol, v.70, n.5, May, p.2797-808. 1996.

Wolffe, E. J., S. N. Isaacs, *et al.* Deletion of the vaccinia virus B5R gene encoding a 42-kilodalton membrane glycoprotein inhibits extracellular virus envelope formation and dissemination. J Virol, v.67, n.8, Aug, p.4732-41. 1993.

Wolffe, E. J., S. Vijaya, *et al.* A myristylated membrane protein encoded by the vaccinia virus L1R open reading frame is the target of potent neutralizing monoclonal antibodies. Virology, v.211, n.1, Aug 1, p.53-63. 1995.

Xia, Y. e M. Karin. The control of cell motility and epithelial morphogenesis by Jun kinases. Trends Cell Biol, v.14, n.2, Feb, p.94-101. 2004.

Yoshimura, K., H. Aoki, *et al.* Regression of abdominal aortic aneurysm by inhibition of c-Jun N-terminal kinase. Nat Med, v.11, n.12, Dec, p.1330-8. 2005.

Yoshimura, K., H. Aoki, *et al.* Regression of abdominal aortic aneurysm by inhibition of c-Jun N-terminal kinase in Mice. Ann N Y Acad Sci, v.1085, Nov, p.74-81. 2006.

Zachos, G., B. Clements, *et al.* Herpes simplex virus type 1 infection stimulates p38/c-Jun N-terminal mitogen-activated protein kinase pathways and activates transcription factor AP-1. J Biol Chem, v.274, n.8, Feb 19, p.5097-103. 1999.

Zhou, Q., Snipas, S. *et al.*. Target protease specificity of the viral serpin CrmA. Analysis of five caspases. Journal of Biological Chemistry 272, 7797-7800. 1997

Fontes Eletrônicas:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/>

<http://www.cdphe.embanet.com>

<http://www.cellsignal.com>