

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Microbiologia

Dissertação de Mestrado

**Análise da ativação e relevância funcional de vias sinalizadoras
celulares durante a infecção pelo *Vaccinia virus* Belo Horizonte**

Jonas Dutra Albarnaz

Belo Horizonte, fevereiro de 2010.

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Microbiologia

**Análise da ativação e relevância funcional de vias sinalizadoras
celulares durante a infecção pelo *Vaccinia virus* Belo Horizonte**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Microbiologia) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia).

Jonas Dutra Albarnaz

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Antônio Bonjardim

Belo Horizonte, fevereiro de 2010.

Tudo que é profundo é, ao mesmo tempo, simples, e, como tal, pode ser interpretado, contanto que não se perca de vista a relação existente para com a realidade do todo.

Albert Schweitzer

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Cláudio, pela oportunidade, orientação e confiança ao longo do desenvolvimento deste trabalho;

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

À Profa Giliane, pelo incentivo para o desenvolvimento deste trabalho;

Ao Prof. Eurico Arruda, pela disponibilidade em compor a banca examinadora;

À Ângela, ao João, à Hilda e à Andreza, pelos excelentes serviços prestados ao Laboratório de Vírus, que tornam o trabalho muito mais fácil;

À Dra. Lirlândia, pelo incentivo e pelas inúmeras cessões gentis para a realização deste trabalho;

Aos GTS, pelo companheirismo e pela imensa ajuda ao longo desenvolvimento deste trabalho: André, Bruno, Fernanda, Flávia, Leonardo, Luciana e Rafael;

À Paloma, pela ajuda, especialmente nos últimos seis meses do mestrado;

Ao Jônatas e à Leandra, pela ajuda com o sequenciamento;

À Graciela, pela ajuda com o PCR em tempo real e com os camundongos;

Aos demais amigos do Laboratório;

Aos amigos distantes;

À minha família, pelo apoio incondicional.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABELAS.....	viii
ABREVIATURAS.....	ix
RESUMO.....	xii
ABSTRACT.....	xiii
I. INTRODUÇÃO.....	1
1. Os Poxvírus.....	1
1.1. <i>Circulação de Vaccinia virus no Brasil</i>	2
1.2. <i>Vaccinia virus Belo Horizonte</i>	3
2. Aspectos Gerais da Biologia dos Poxvírus.....	6
2.1. <i>Morfologia</i>	6
2.2. <i>Genoma</i>	8
2.3. <i>Ciclo de multiplicação dos poxvírus</i>	10
2.3.1. <i>Adsorção e penetração</i>	13
2.3.2. <i>Expressão gênica</i>	14
2.3.3. <i>Replicação do genoma</i>	15
2.3.4. <i>Morfogênese e liberação</i>	17
2.4. <i>Patogênese</i>	18
3. Interação Poxvírus-Hospedeiro: Balanço entre Fatores Celulares e Produtos Gênicos Virais.....	19
4. Vias Sinalizadoras Celulares e os Vírus.....	24
4.1. <i>PI3K(fosfatidilinositol 3-quinase)/Akt</i>	24
4.1.1. <i>PI3K/Akt e os vírus</i>	27
4.2. <i>MAPK (proteínas quinases ativadas por mitógenos)</i>	29
4.2.1. <i>MAPK e os vírus</i>	34
II. JUSTIFICATIVA.....	37
III. OBJETIVOS.....	40
1. Objetivo Geral.....	40
2. Objetivos Específicos.....	40
IV. MATERIAL E MÉTODOS.....	42
1. Células.....	42
1.1. <i>Células BSC-40</i>	42

1.2. Células A31	42
1.3. Células WT e <i>jnk-1/2</i>^{-/-}	42
1.4. Células RAW 264.7	43
1.5. Macrófagos intraperitoniais de camundongos	43
2. Vírus	44
2.1. Produção dos estoques virais	44
2.2. Purificação viral	45
2.3. Titulação viral	45
3. Análise das Vias de Sinalização durante a Infecção pelo <i>Vaccinia Virus</i> Belo Horizonte	46
3.1. Anticorpos e Drogas	46
3.2. Infecção	47
3.3. Extração de Proteínas Totais	47
3.4. Transferência “Western”	47
4. Análise da Relevância Funcional de Vias Sinalizadoras Celulares para a Biologia do <i>Vaccinia Virus</i> Belo Horizonte	48
4.1. Titulação de EEV (vírus envelopados extracelulares)	49
5. Microscopia Eletrônica de Transmissão	49
6. Análise da Permissividade e da Expressão do mRNA de Citocinas durante a Infecção de Macrófagos pelos <i>Vaccinia Virus</i> Belo Horizonte e Western Reserve	50
6.1. Extração do RNA Total	51
6.2. Transcrição Reversa	51
6.3. PCR em Tempo Real	52
7. Seqüenciamento	52
7.1. PCR	52
7.2. Precipitação de DNA para seqüenciamento	54
7.3. Obtenção das seqüências	56
7.4. Análise das seqüências	56
V. RESULTADOS	48
1. Morfogênese do <i>Vaccinia Virus</i> Belo Horizonte	48
2. O <i>Vaccinia Virus</i> Belo Horizonte Regula Temporamente a Ativação das Vias Sinalizadoras das MAPK ERK, JNK e p38, e de PI3K/Akt ao Longo da Infecção	61

3. Efeito da Inibição Farmacológica de Vias Sinalizadoras Celulares Sobre a Multiplicação do <i>Vaccinia Virus</i> Belo Horizonte.....	64
4. A Geração da Progenie e a Liberação de Vírus Envelopados Extracelulares Não São Afetadas em Células <i>jnk-1/2^{-/-}</i> Infectadas pelo <i>Vaccinia Virus</i> Belo Horizonte.....	67
5. A Multiplicação do <i>Vaccinia Virus</i> Belo Horizonte assim como o Acúmulo de Proteínas Virais Tardias São Retardados em Presença do Inibidor de PI3K, LY294002.....	69
6. Apoptose É Desencadeada durante a Infecção pelo <i>Vaccinia virus</i> Belo Horizonte.....	74
7. Caracterização dos Genes B13R, F1L E N1L do <i>Vaccinia Virus</i> Belo Horizonte.....	77
8. Expressão de Citocinas em Macrófagos Infectados pelos <i>Vaccinia Virus</i> Belo Horizonte e Western Reserve.....	79
VI. DISCUSSÃO.....	83
VII. CONCLUSÕES.....	97
PERSPECTIVAS.....	99
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	100

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Camundongos do Centro de Bioterismo da UFMG, dos quais foi isolado o VBH (modificado de DINIZ <i>et al.</i> , 2001).....	4
Figura 2: Representação esquemática da partícula dos poxvírus, evidenciando os principais elementos estruturais: membrana externa, corpúsculos laterais, cerne e envelope (modificado de MOSS, 2001).....	7
Figura 3: Organização geral do genoma dos poxvírus (modificado de SMITH & MCFADDEN, 2002).....	9
Figura 4: Representação esquemática do ciclo de multiplicação dos poxvírus (modificado de MCFADDEN, 2005).....	11
Figura 5. Visão geral da regulação e dos alvos da via sinalizadora PI3K/Akt (modificado de COORAY, 2004).....	25
Figura 6. Visão geral das vias sinalizadoras das MAPK ERK, JNK e p38 (modificado de YANG <i>et al.</i> , 2003).....	30
Figura 7. Morfogênese do VBH em fibroblastos murinos.....	60
Figura 8. A ativação das MAPK ERK, JNK e p38, e da serina-treonina quinase Akt é temporalmente regulada de modos similares durante a infecção pelo VBH e pelo VACV-WR.....	63
Figura 9. A liberação de EEV não é afetada em células <i>jnk-1/2^{-/-}</i> infectadas pelo VBH.....	68
Figura 10. Curva de crescimento em ciclo único do VBH em presença de LY294002, inibidor de PI3K.....	71

Figura 11. O acúmulo das proteínas tardias do VBH é retardado em presença de LY294002, inibidor de PI3K.....	72
Figura 12. Morfogênese do VBH não é afetada por LY294002.....	73
Figura 13. Apoptose é desencadeada durante a infecção pelo VBH.....	75
Figura 14. Efeito da inibição de caspases, por zVAD.fmk, sobre a multiplicação do VBH e do VACV-WR.....	76
Figura 15. Os genes B13R, F1L e N1L do VBH não apresentam polimorfismos quando comparado ao VACV-WR.....	78
Figura 16. Multiplicação do VBH e do VACV-WR em macrófagos de camundongo.....	81
Figura 17. O VBH induz uma menor expressão de citocinas inflamatórias em macrófagos infectados pelo VACV-WR.....	82
Figura 18. Balanço entre produtos gênicos virais e vias sinalizadoras celulares durante a infecção pelo VBH.....	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Iniciadores utilizados para a avaliação da expressão do mRNA de citocinas inflamatórias em macrófagos de camundongo infectados pelo VBH e pelo VACV-WR..... 53

Tabela 2. Iniciadores utilizados para a amplificação por PCR dos genes B13R, F1L e N1L de VACV..... 55

Tabela 3. Efeito de inibidores farmacológicos de vias sinalizadoras celulares sobre a multiplicação do VBH, em comparação ao VACV-WR. 66

ABREVIATURAS

AIDS – Síndrome da imunodeficiência adquirida
ATI – corpúsculo de inclusão do tipo acidófilo
BAV – *Vaccinia virus* BeAn 58058
bp – pares de bases nucleotídicas BR-VACV –
Amostras brasileiras de *Vaccinia virus* cDNA –
DNA complementar
CEV – vírus envelopado associado à célula
CO₂ – dióxido de carbono
CPXV – *Cowpox virus*
Crm – modificador da resposta de citocinas
CTGV – *Vaccinia virus* Cantagalo CVB3 –
Coxsackievirus B3
DMEM – meio essencial mínimo modificado por Dulbecco
DNA – ácido desoxidorribonucleico dsRNA – RNA fita
dupla
EBV – *Epstein-Barr virus*
ECP – efeito citopático
EEV – vírus envelopado extracelular
EGR-1 – gene de resposta precoce ao crescimento
ERK – quinase regulada por sinal extracelular
GAG - glicosaminoglicana
GP1V – *Vaccinia virus* Guarani P1
GP2V – *Vaccinia virus* Guarani P2
h – hora
ha – hemaglutinina
HCMV – *Human cytomegalovirus*
HIV – *Human immunodeficiency virus*
IEV – vírus envelopado intracelular
IFN – interferon
IL – interleucina
IMV – vírus maduro intracelular
IRF-3 – fator regulatório de interferon

ITR – repetição terminal invertida
IV – vírus imaturo
JNK – quinase do N-terminal de c-Jun
kb – quilo-pares de bases nucleotídicas
kDa – quilo-Dálon
LD₅₀ – dose letal a 50%
MAPK – proteína quinase ativada por
mitógeno MCA – membrana corioalantoide
MEF – fibroblasto embrionário de camundong
MEM – meio essencial mínimo MEK –
quinase da MAPK ERK
MKK – MAPK quinase
µg – micrograma
µL – microlitro
µM – micromolar
min - minuto
mL – mililitro
MOI – multiplicidade de infecção
mTORC – complexo mTOR
MYXV – *Myxoma virus*
mRNA – RNA mensageiro
MΦ – macrófagos
NF-κB – fator nuclear κB
ng - nanograma
nm – nanômetro
NYCBH – New York City Board of Health
OMS – Organização Mundial da Saúde
ORF – janela aberta de leitura
PBS – solução tamponada de fosfato
PCR – reação em cadeia da polimerase
pfu – unidade formado de placa
p.i. – pós-infecção
PI3K – fosfatidilinositol 3-quinase
PKR – quinase dependente de RNA

PSTV – *Vaccinia virus* Passatempo
RNA – ácido ribonucléico
rpm – rotação por minuto
s – segundo
SAV – *Vaccinia virus* SPAn 232
SFB – soro fetal bovino
tk – timidina quinase
TLR – receptores do tipo Toll
TNF – fator de necrose tumoral
VACV – *Vaccinia virus*
VACV-WR – *Vaccinia virus* Western
Reserve VARV – *Variola virus*
VBH – *Vaccinia virus* Belo Horizonte
VETF – fator de transcrição precoce do
Vaccinia vgf – fator de crescimento do *Vaccinia*
WT – selvagem

RESUMO

Durante a infecção, os vírus usurpam a maquinaria celular em seu benefício e, ao mesmo tempo, evadem às respostas antivirais do hospedeiro, com vistas à eficiente geração e disseminação da sua progênie. Os poxvírus codificam uma miríade de proteínas envolvidas na evasão imune e também manipulam a ativação de vias sinalizadoras, a fim de tornar o ambiente intracelular mais propício à sua multiplicação. No Brasil, diferentes amostras de *Vaccinia virus* (VACV) têm sido isoladas a partir de infecções que acometem roedores, bovinos e humanos, caracterizando-as como zoonoses emergentes. Estas amostras de VACV isoladas a partir de infecções naturais constituem uma ferramenta muito útil ao estudo da interação poxvírus-hospedeiro. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi analisar a ativação e o envolvimento de vias sinalizadoras celulares durante a infecção pelo VACV Belo Horizonte (VBH), isolado durante um surto de varíola murina no Centro de Bioterismo da UFMG, em comparação ao VACV Western Reserve (VACV-WR). Neste estudo, mostrou-se que durante a infecção de células A31 (fibroblastos 3T3 de camundongos Balb/C), a ativação das MAPK MEK/ERK, JNK e p38, e de PI3K/Akt foi temporalmente regulada de modo semelhante por ambos os vírus. Entretanto, a inibição farmacológica de MEK/ERK (UO126), PI3K/Akt (LY294002) e JNK (JNK inhibitor VIII) não afetou significativamente a multiplicação do VBH (inibição $\leq 50\%$), ao contrário do observado para VACV-WR. Já a inibição de p38 (SB202190) reduziu a progênie do VBH em 90%, mas não afetou o VACV-WR. Genisteína (inibidor de proteínas tirosina quinases) e dois inibidores sabidamente inespecíficos (SP600125 e Akt inhibitor IV) inibiram igualmente a multiplicação do VBH e do VACV-WR, ressaltando suas potenciais atividades antivirais. Em presença de LY294002, a multiplicação do VBH, assim como a síntese de proteínas virais precoces e tardias foram apenas retardadas mas não inibidas, como para o VACV-WR. A morfogênese do VBH também se procedeu normalmente em presença de LY294002. Entretanto, diferente do VACV-WR, apoptose foi desencadeada durante a infecção pelo VBH, independentemente da inibição de PI3K/Akt. Apesar disso, quatro genes virais (B13R, E3L, F1L e N1L) diretamente envolvidos na inibição da apoptose não apresentaram polimorfismos no VBH. Ambos os vírus multiplicaram em macrófagos de camundongo, mas o VBH induziu 2 log₁₀ menos a expressão de citocinas inflamatórias que o VACV-WR. Em conclusão, estes dados indicam que, a despeito da grande similaridade genética entre VBH e VACV-WR, estas duas amostras de VACV apresentam diferenças biológicas que certamente refletem na patogênese destes vírus *in vivo*.

Palavras-Chave: *Vaccinia virus*, VBH, VACV-WR, MAPK, PI3K/Akt, interação vírus-hospedeiro

ABSTRACT

During infection, viruses rely on cell metabolism and, at the same time, evade from host antiviral responses, to guarantee their efficient replication and dissemination. In spite of poxviruses encoding a plethora of immune evasion proteins, they also manipulate intracellular signaling pathways to create an environment propitious to virus replication. In Brazil, several strains of *Vaccinia virus* (VACV) have been isolated from outbreaks involving rodents, cows and humans, characterizing them as emerging zoonoses. As these Brazilian VACV strains, isolated from natural infections, constitute a useful tool to investigate virus-host interaction, the aim of this work was to analyze activation and functional relevance of cellular signaling pathways during VACV Belo Horizonte (VBH) infection, in comparison to VACV Western Reserve (WR). VBH was isolated during a mousepox outbreak in UFMG's animal facility. During infection of A31 cells (3T3 fibroblasts derived from Balb/C mice), VBH and VACV-WR temporally regulate the activation of MAPK MEK/ERK, JNK and p38, and of PI3K/Akt in similar fashion. However, pharmacological inhibition of MEK/ERK (UO126), PI3K/Akt (LY294002) and JNK (JNK inhibitor VIII) did not affect significantly VBH replication (inhibition $\leq 50\%$), in contrast to VACV-WR. Inhibition of p38 (SB202190) reduced VBH progeny in 90%, but did not for VACV-WR. Genistein (protein tyrosine kinase inhibitor) and two known unspecific drugs (SP600125 e Akt inhibitor IV) inhibited equally VBH and VACV-WR replication, indicating their potential antiviral activities. In presence of LY294002, VBH replication and early/late protein synthesis were delayed, but not inhibited like VACV-WR. VBH morphogenesis also proceeded normally in presence of LY294002. Therefore, in contrast to VACV-WR, VBH infected cells underwent apoptosis even in the absence of PI3K/Akt inhibition. In spite of that, four viral genes (B13R, E3L, F1L e N1L) directly involved in apoptosis inhibition did not present polymorphisms in VBH. Both viruses replicated in murine macrophages, but VBH induced cytokine gene expression 2 \log_{10} lesser than VACV-WR. In conclusion, these data indicate that VBH and VACV-WR, though closely related genetically, display biologic differences that certainly influence pathogenesis of these VACV strains *in vivo*.

Keywords: *Vaccinia virus*, VBH, VACV-WR, MAPK, PI3K/Akt, virus-host interaction

I. INTRODUÇÃO

Os poxvírus representam um importante grupo de vírus, extensivamente estudado ao longo da história da virologia, sendo o primeiro vírus animal observado ao microscópio, multiplicado e titulado em cultivo celular, fisicamente purificado e quimicamente analisado (MOSS, 2007). Entretanto, o melhor exemplo da sua contribuição foi a utilização do *Cowpox virus* em 1796, por Edward Jenner, como vacina contra a varíola humana, marcando o início da era das vacinas. Dois séculos após, nas décadas de 1960 e 1970, a Organização Mundial da Saúde (OMS), desta vez utilizando diferentes amostras de *Vaccinia virus* como vacina, coordenou um esforço internacional de vacinação contra a varíola, culminando com a erradicação desta doença, declarada oficialmente erradicada pela OMS em 1980 (revisado por SMITH & MCFADDEN, 2002).

Apesar de novos casos de varíola não terem sido relatados desde então, recentemente, o número de registros de infecções por outros poxvírus em animais domésticos e em humanos tem aumentado consideravelmente, caracterizando-as como um importante problema de saúde pública e despertando o interesse em mais estudos acerca desta grande família de vírus (revisado por LEWIS-JONES, 2004).

Os poxvírus também são extensivamente estudados como vetores vacinais, vetores de expressão heteróloga de proteínas ou agentes oncolíticos. Apesar de até o momento nenhum estudo ter apresentado resultados promissores, os poxvírus têm aberto novos horizontes para a pesquisa biomédica, que vislumbra estratégias terapêuticas mais eficazes e seguras para importantes doenças humanas, tais como a síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) e o câncer (MCFADDEN, 2005).

1. Os Poxvírus

Os poxvírus reunidos na família *Poxviridae* e se caracterizam por apresentar genoma de DNA fita dupla linear, contendo de 130 a 300kb e com capacidade codificadora em torno de 200 genes. Os poxvírus possuem vírion com morfologia complexa, formato ovoide ou de tijolo e dimensões em

torno de 300 nm, e completam o seu ciclo de replicação inteiramente no citoplasma da célula hospedeira (revisado por MOSS, 2007).

A família *Poxviridae* é dividida em duas subfamílias, de acordo com o espectro de hospedeiros: (i) *Chordopoxvirinae*, que abrange os poxvírus que infectam vertebrados e, (ii) *Entomopoxvirinae*, que inclui os poxvírus que infectam insetos (MOSS, 2007).

A subfamília *Chordopoxvirinae* reúne nove gêneros, a saber: *Orthopoxvirus*, *Parapoxvirus*, *Avipoxvirus*, *Capripoxvirus*, *Leporipoxvirus*, *Suipoxvirus*, *Molluscipoxvirus*, *Yatapoxvirus* e um gênero ainda não estabelecido, que inclui o *Squirrelpox virus*. O gênero *Orthopoxvirus* inclui o protótipo da família, o *Vaccinia virus* (VACV), e é o gênero mais estudado atualmente. Alguns outros *Orthopoxvirus* são *Variola virus*, *Cowpox virus*, *Ectromelia virus* e *Monkeypox virus* (MOSS, 2007).

Os poxvírus que infectam exclusivamente humanos são o *Variola virus* e o *Molluscum contagiosum virus*, pois outros reservatórios na natureza nunca foram descritos. Entretanto, outros poxvírus podem causar infecções eventuais em humanos, sob a forma de zoonoses. Estes são VACV, *Cowpox virus*, *Monkeypox virus*, *Buffalopox virus*, alguns *Parapoxvirus*, e *Tanapox virus* (revisado por LEWIS-JONES, 2004).

1.1. Circulação de *Vaccinia virus* no Brasil

No Brasil, a partir de 1999, diferentes amostras de VACV foram isoladas durante surtos de vaccínia bovina que acometeram gado leiteiro e ordenhadores, especialmente na Região Sudeste, caracterizando uma zoonose emergente no país (DAMASO *et al.*, 2000; TRINDADE *et al.*, 2003; LEITE *et al.*, 2005; TRINDADE *et al.*, 2006; TRINDADE *et al.*, 2007; ABRAHÃO *et al.*, 2009). Amostras de VACV também já foram isoladas de roedores silvestres e de camundongos de laboratório (FONSECA *et al.*, 1998; FONSECA *et al.*, 2002; TRINDADE *et al.*, 2004).

Existe grande discussão acerca da origem destas amostras de VACV circulantes no Brasil (BR-VACV). Alguns autores propõem sua origem a partir da disseminação das amostras utilizadas para vacinação contra varíola no Brasil, principalmente VACV-IOC e VACV-Lister-Butantan, e o estabelecimento

da circulação de VACV entre animais domésticos e silvestres, sendo eventualmente transmitido ao homem (DAMASO *et al.*, 2000; TRINDADE *et al.*, 2003; LEITE *et al.*, 2005).

Entretanto, estudos mais recentes têm mostrado que os BR-VACV apresentam grande diversidade genética entre si e diferem significativamente das amostras vacinais utilizadas no Brasil (TRINDADE *et al.*, 2006; DRUMOND *et al.*, 2008). Isso indica que BR-VACV provavelmente não compartilham uma origem comum. Trindade e colaboradores propuseram que podem ter havido três ondas de introdução do VACV no Brasil: (i) o tráfico de escravos (início do século XIX); (ii) a utilização de vacinas mantidas em animais (final do século XIX); e (iii) a campanha de erradicação da varíola (meados do século XX) (TRINDADE *et al.*, 2007).

Estudos filogenéticos e de virulência em camundongos mostraram que há duas populações de BR-VACV. Os BR-VACV virulentos incluem as amostras Guarani P1 (GP1V), Belo Horizonte (VBH), SPAn 232 (SAV) e BeAn 58058 (BAV) e apresentam alta morbidade e mortalidade em camundongos BALB/c após inoculação intranasal. Já as amostras Araçatuba (ARAV), Passatempo (PSTV) e Guarani P2 (GP2V) são avirulentas, ou seja, não causam sinais clínicos ou morte nos camundongos infectados (FERREIRA *et al.*, 2008).

Análises filogenéticas realizadas com sequências de dez genes virais relacionados com virulência e espectro de hospedeiro mostraram que, novamente, os BR-VACV se agrupam em duas populações distintas, corroborando os dados obtidos com os estudos de virulência (DRUMOND *et al.*, 2008).

1.2. Vaccinia virus *Belo Horizonte*

O *Belo Horizonte virus* ou *Vaccinia virus* Belo Horizonte (VBH) foi isolado no Laboratório de Vírus após um surto de varíola murina no Centro de Bioterismo da UFMG (Figura 1). O vírus foi isolado do fígado, do baço e de lesões da cauda de animais doentes através de inoculação destas amostras em membrana corioalantoide (MCA) de ovos embrionados de galinha e em

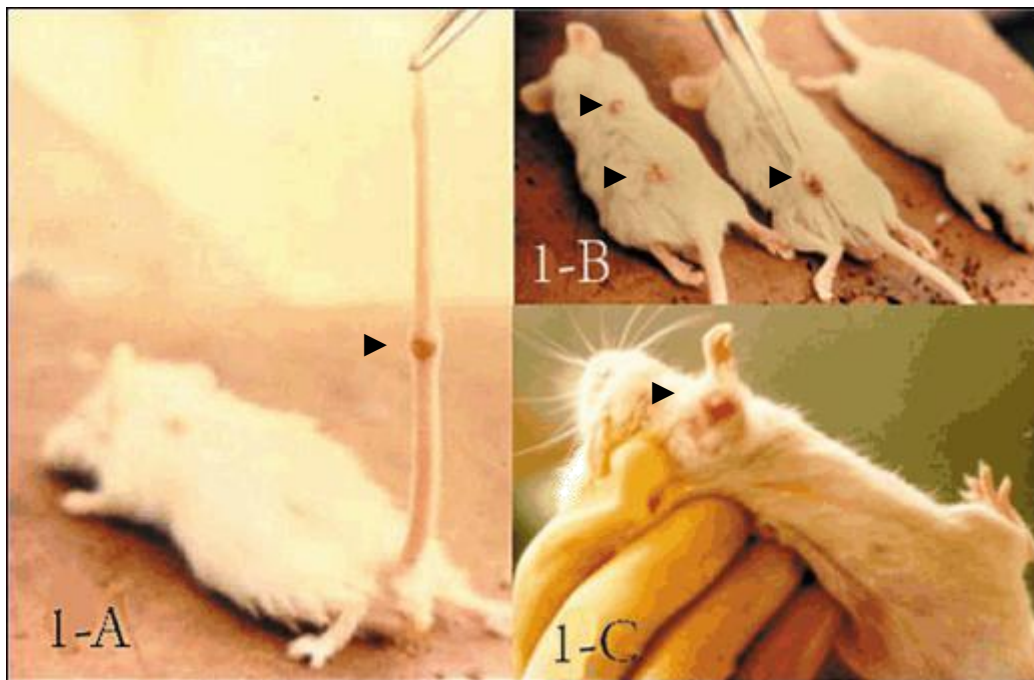


Figura 1: Camundongos do Centro de Bioterismo da UFMG, dos quais foi isolado o VBH (modificado de DINIZ *et al.*, 2001).

As setas indicam as lesões ulcerativas, características das infecções por poxvírus, observadas na cauda (A), no dorso (B) e na pata (C) de camundongos suíços 21 dias após o início do surto de varíola murina na colônia.

culturas de células Vero. A identificação do vírus foi feita através da observação do efeito citopático característico em MCA (morfologia do “pock”), microscopia eletrônica e neutralização com soro anti-VACV (DINIZ *et al.*, 2001; TRINDADE *et al.*, 2004).

A análise do perfil de restrição do DNA viral, após digestão com a endonuclease *Hind*III e hibridização com o DNA do VACV-WR radioativamente marcado, mostrou muita similaridade entre VBH e VACV Western Reserve (WR), assim como a comparação das seqüências dos genes virais *tk* (timidina quinase), *vgf* (fator de crescimento de *Vaccinia*) e *ha* (hemaglutinina), que derrubaram as suspeitas iniciais de se tratar de *Ectromelia virus*, que comumente acomete colônias de camundongos (TRINDADE *et al.*, 2004). As tentativas de detectar por PCR o gene *ati* no genoma do VBH falharam. Entretanto, a comparação das seqüências do gene *ati* (corpúsculo de inclusão do tipo acidófilo) mostrou que o VBH apresenta apenas 112 nucleotídeos do gene *ati*, correspondentes à porção C-terminal da proteína por ele codificada (TRINDADE *et al.*, 2004). O genoma do VBH também apresenta uma deleção única de 59 nucleotídeos no gene *crmB* (modificador da resposta de citocinas B) quando comparado com VACV-WR (MOTA, 2006).

As seqüências de outros dez genes do VBH, relacionados com virulência e espectro de hospedeiro, também foram obtidas, a saber: A56R, B5R, B8R, B18R, C6L, C7L, E3L, K1L, K2L e K3L. Destes, apenas os genes A56R, B18R e K2L do VBH apresentaram polimorfismos quando comparados com os mesmos genes do VACV-WR. As análises filogenéticas baseadas nas seqüências destes genes mostraram que o VBH é bastante relacionado ao VACV-WR (DRUMOND *et al.*, 2008).

Em relação à virulência, após a inoculação intranasal de camundongos, o VBH mostrou-se uma das amostras mais virulentas. Após a infecção com $1,0 \times 10^6$ pfu (unidade formadora de placa), o VBH induziu a perda de 25% do peso corpóreo dos camundongos até o 3º dia após a infecção (p.i.), ao passo que com os demais BR-VACV virulentos isso ocorreu no 4º ou 5º dias p.i. e, com o VACV-WR, no 6º dia p.i. Além disso, VBH também apresentou a menor LD₅₀ (dose letal para 50%), de 5×10^3 pfu; a LD₅₀ do VACV-WR foi de 1×10^4 pfu. Partículas infecciosas foram detectadas em todos os órgãos analisados (traquéia, pulmão, coração, baço, rim, fígado e cérebro). Contudo, os títulos do

VBH no baço, rim, fígado e cérebro dos animais infectados geralmente foram os menores dentre os BR-VACV (FERREIRA *et al.*, 2008).

Todos os animais infectados com os BR-VACV virulentos apresentaram pneumonia intersticial, bronquiolite e lesões pulmonares difusas variando de moderadas a graves. Os camundongos infectados apresentaram expressão de antígeno viral no citoplasma de células inflamatórias no pulmão, ruptura da parede alveolar e destruição bronquiolar e, diferente dos demais BR-VACV, os camundongos infectados com o VBH apresentaram necrose epitelial na mucosa pulmonar (FERREIRA *et al.*, 2008).

2. Aspectos Gerais da Biologia dos Poxvírus

2.1. Morfologia

O vírion dos poxvírus, baseado em estudos realizados com VACV, apresenta formato ovoide ou de tijolo, com dimensões de cerca de 360x270x250 nm. É envolto por uma membrana externa, de natureza lipoprotéica, de 5-6 nm de espessura, coberta por protruções irregulares. Internamente, o vírion é formado por um cerne ovóide bicôncavo, com formato de haltere. Agregados de composição e função desconhecidas, chamados corpúsculos laterais, estão localizados entre as concavidades do cerne e a membrana externa (revisado por MOSS, 2007) (Figura 2).

A parede do cerne parece ser composta de duas camadas, somando cerca de 18-19 nm de espessura. A camada externa apresenta uma estrutura de paliçada, formada por espículas em formato de T ancoradas na camada interna, que aparentemente é contínua, exceto por um pequeno número de canais (revisado por MOSS, 2007). A ultraestrutura do cerne não está completamente compreendida, mas parece consistir de duas fases, sendo a fase mais densa, localizada sob a parede do cerne, aparentemente composta por elementos de morfologia fibrilar, provavelmente de natureza nucleoproteica (revisado por MOSS, 2007).

Uma peculiaridade dos membros da família *Poxviridae* reside no fato da célula infectada produzir quatro tipos de vírions morfológicamente distintos: (i) vírus intracelular maduro (IMV), que apresenta a morfologia como descrito

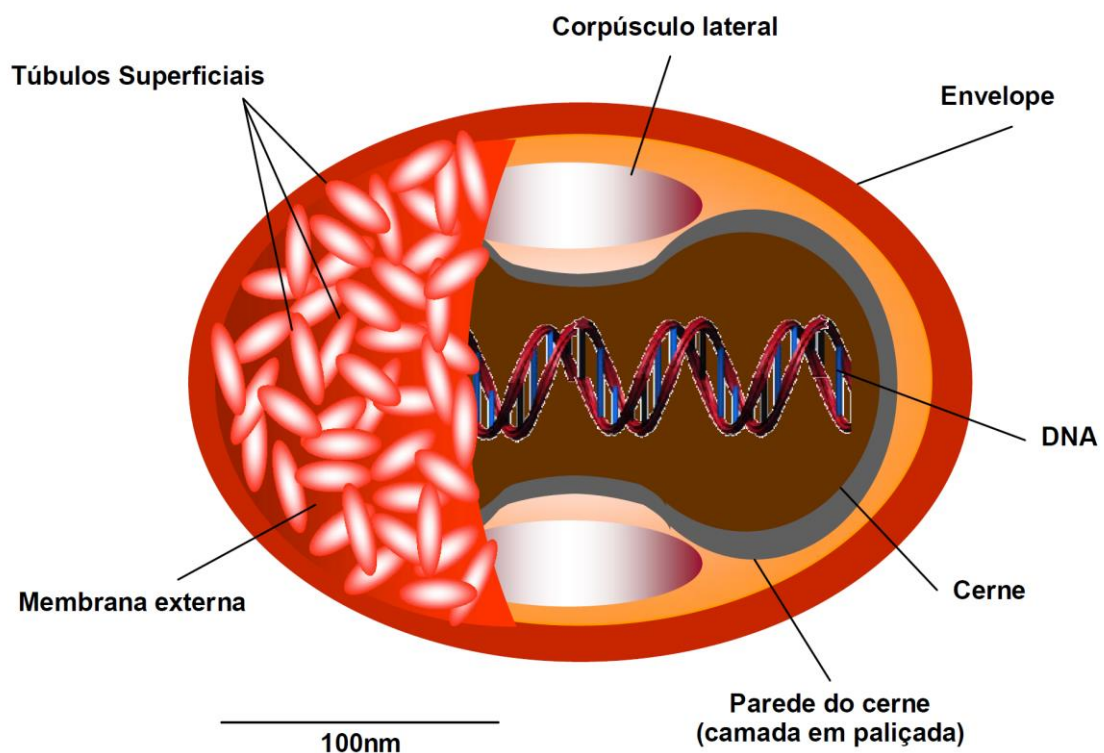


Figura 2: Representação esquemática da partícula dos poxvírus, evidenciando os principais elementos estruturais: membrana externa, corpúsculos laterais, cerne e envelope (modificado de MOSS, 2001).

acima, constitui a maioria da progênie viral e permanece dentro da célula infectada até que ocorra a lise celular; (ii) vírus intracelular envelopado (IEV), que representa o IMV envolto por dois envelopes derivados de membranas intracelulares; (iii) vírus envelopado associado à célula (CEV), que se forma quando o envelope mais externo do IEV se funde à membrana plasmática da célula hospedeira liberando um vírion envelopado, que fica retido na superfície celular; e (iv) vírus extracelular envelopado (EEV), quando o IEV se funde à membrana da célula e o vírion envelopado é liberado no meio extracelular. As formas EEV e CEV são indistinguíveis morfológicamente. Destes quatro tipos de vírions, apenas a forma IEV não é infecciosa (revisado por SMITH *et al.*, 2002).

As três formas infecciosas dos poxvírus desempenham funções distintas na disseminação viral. Ao passo que o CEV medeia a disseminação célula-a-célula, o EEV é importante para a disseminação a longa distância dentro do organismo do hospedeiro e o IMV, dada a sua maior estabilidade, realiza a disseminação entre hospedeiros (MCFADDEN, 2005).

Uma nova nomenclatura para as partículas dos poxvírus foi proposta por Moss (2006), na qual os IMV passam a ser denominados vírus maduros (MV), as formas EEV e CEV passam a ser chamados de vírus extracelulares (EV) e a forma IEV, de vírus envelopado (WV). Por razões didáticas, ao longo deste trabalho será utilizada a nomenclatura anterior das partículas produzidas durante o ciclo de multiplicação dos poxvírus.

2.2. Genoma

Os poxvírus possuem genoma de DNA fita dupla linear que se encontra entre os maiores genomas de vírus animais, variando de 130 kb para os *Parapoxvirus* a 300 kb para os *Avipoxvirus*. O genoma dos poxvírus por si só não é infeccioso, já que há necessidade da RNA polimerase viral e de outros fatores presentes no vírion para a expressão dos genes virais no citoplasma da célula infectada. Um importante aspecto do genoma dos poxvírus é que as extremidades das duas fitas de DNA são covalentemente ligadas através de alças não pareadas do tipo “grampo de cabelo” (*hairpin*) (revisado por MOSS, 2007) (Figura 3).

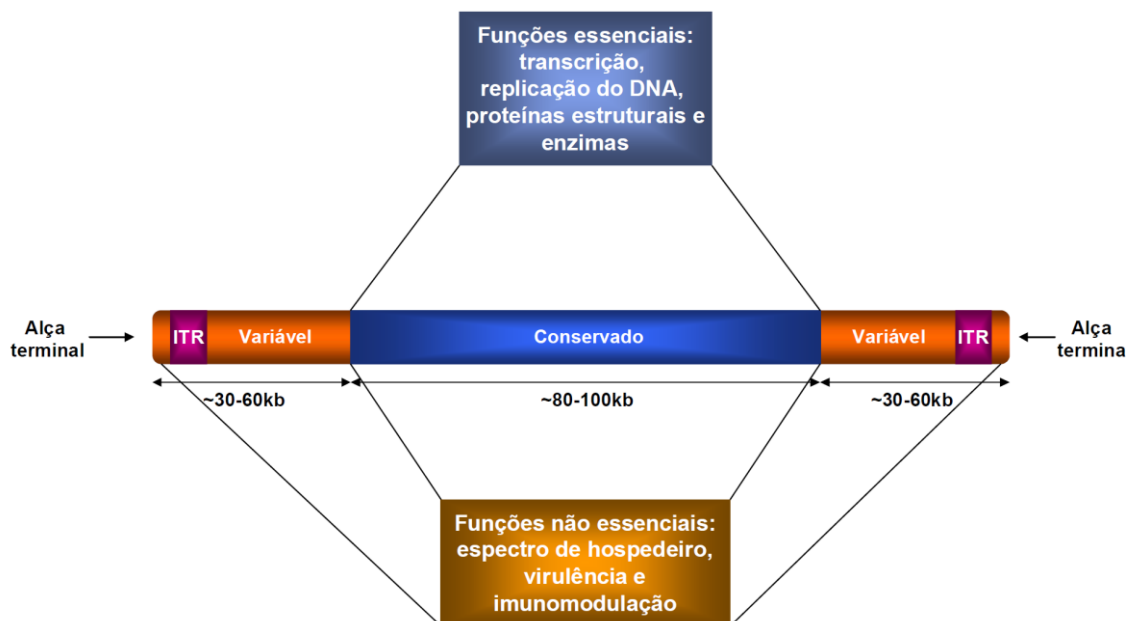


Figura 3: Organização geral do genoma dos poxvírus (modificado de SMITH & MCFADDEN, 2002).

O genoma dos poxvírus apresenta de 130 a 300kb de DNA fita dupla com as extremidades covalentemente ligadas através das alças terminais. Os genes localizados na porção central do genoma são bastante conservados entre os poxvírus e codificam para proteínas relacionadas a funções essenciais, tais como transcrição, replicação do genoma e morfogênese. Já nas extremidades encontram-se as ITR (repetições terminais invertidas) e genes variáveis que codificam proteínas relacionadas a funções não essenciais, como espectro de hospedeiro, virulência e imunomodulação.

As extremidades do genoma apresentam as repetições terminais invertidas (ITRs), que são sequências idênticas, mas com orientações opostas. As ITRs incluem as alças que conectam as duas fitas de DNA, sequências conservadas com menos de 100 bp importantes durante a replicação do DNA, conjuntos variáveis de pequenas sequências repetidas organizadas *in tandem* e, em alguns casos, podem apresentar muitas ORF (janelas abertas de leitura) (revisado por MOSS, 2007).

Sequências completas de genomas de vários poxvírus estão disponíveis, pelo menos de um membro de cada gênero da subfamília *Chordopoxvirinae*. Como características gerais da organização destes genomas pode se citar que as ORF não apresentam sobreposições nem íntrons e que os genes localizados na região central do genoma (cerca de 90 genes) são altamente conservados entre os poxvírus e geralmente estão relacionados com funções essenciais, como replicação, transcrição e proteínas estruturais. Já os genes localizados nas extremidades do genoma são mais variáveis e relacionados a funções consideradas não essenciais, tais como espectro de hospedeiros, virulência e imunomodulação (revisado por SMITH & MCFADDEN, 2002; MOSS, 2007).

Os genes de VACV são, convencionalmente, nomeados de acordo com a sua localização nos fragmentos que são gerados após a digestão do genoma viral com a endonuclease *HindIII*. Estes fragmentos são denominados por letras e o nome do gene consiste da letra do fragmento de restrição no qual está localizado, seguido pelo número da ORF, que indica a ordem das ORFs no fragmento, da esquerda para a direita, e pelas letras L ou R, que indicam a orientação da ORF, esquerda ou direita, respectivamente. Para denominar as proteínas codificadas por estes genes, retiram-se as letras L ou R do nome do gene (MOSS, 2007).

2.3. Ciclo de multiplicação dos poxvírus

O ciclo de multiplicação dos poxvírus ocorre inteiramente no citoplasma da célula hospedeira, algo inusitado entre os vírus animais com genoma de DNA. O tempo necessário para completar todo o ciclo de multiplicação varia conforme a amostra de vírus e a célula estudada, sendo que para a infecção de

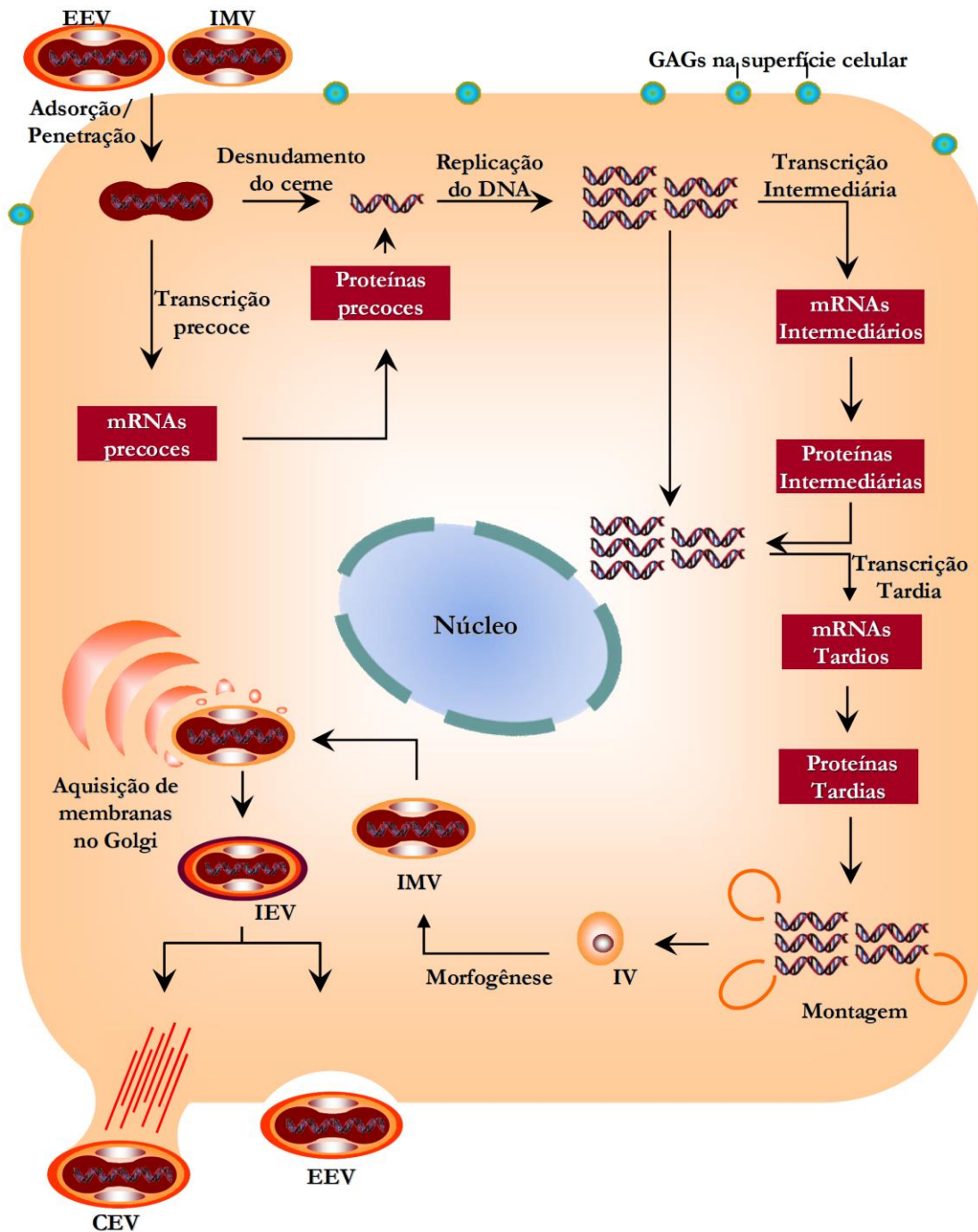


Figura 4: Representação esquemática do ciclo de multiplicação dos poxvírus (modificado de MCFADDEN, 2005).

As duas formas infecciosas dos poxvírus, o IMV (vírus maduro intracelular) e o EEV (vírus envelopado extracelular), após adsorção e penetração na célula hospedeira, liberam o cerne no citoplasma, processo denominado desnudamento do cerne. Ainda no cerne, ocorre a transcrição de genes precoces e após a síntese das proteínas precoces ocorre a liberação do genoma viral no citoplasma. Após o início da replicação do DNA, ocorre a

transcrição dos genes intermediários e tardios. Finalmente, ocorre a montagem dos IMV, que se acumulam no citoplasma e são liberados através da lise celular. Parte dos IMV adquire duas camadas de membrana nas cisternas trans-Golgi e, posteriormente, são liberadas através de processos dependentes das caudas de actina (CEV, vírus envelopado associado à célula) ou não (EEV). Ver texto para mais detalhes.

células epiteliais de linhagem contínua (Vero) com VACV, o ciclo dura de 12 a 24 h (revisado por MOSS, 2001). A seguir, serão abordadas as diferentes etapas do ciclo de multiplicação do VACV, o poxvírus melhor estudado, sendo que estas informações podem ser extrapoladas para os demais poxvírus, dada a pouca variabilidade dos genes relacionados às funções essenciais de replicação (revisado por MOSS, 2007) (Figura 4).

2.3.1. Adsorção e penetração

O entendimento dos mecanismos de adsorção e penetração dos poxvírus é dificultado pela existência de diferentes formas infecciosas, que apresentam diferenças marcantes quanto à composição da camada mais externa do vírion (MOSS, 2007).

Apesar da importância de receptores durante a adsorção e penetração dos vírus, nenhum receptor para poxvírus foi identificado até o momento. Proteínas da membrana externa dos IMV, como D8, A27 e H3, foram identificadas como facilitadoras da ligação do IMV a glicosaminoglicanas (GAG) na superfície da célula hospedeira (revisado por MOSS, 2006; MOSS, 2007). Entretanto, a ligação de IMV a GAGs parece ser célula-específica e não essencial à penetração (CARTER *et al.*, 2005). Além do mais, outro obstáculo ao estudo de possíveis receptores é dificultado pelo fato dos poxvírus adsorverem e penetrarem numa grande variedade de células em cultivo, sendo que o bloqueio da multiplicação viral em células não permissivas frequentemente acontece em uma etapa pós-penetração (revisado por MOSS, 2006).

Apesar de ainda haver controvérsias acerca do mecanismo de penetração dos poxvírus na célula hospedeira, está estabelecido que ocorre a fusão entre a membrana externa do IMV e membranas celulares, com a liberação do cerne contendo o genoma viral no citoplasma da célula hospedeira (revisado por MOSS, 2006). Assim, a penetração ocorreria através da fusão direta da membrana externa do IMV com a membrana plasmática em pH neutro (CARTER *et al.*, 2005). Já a internalização do EEV ocorreria por endocitose e, após o rompimento do envelope induzido por pH baixo, a

membrana externa do IMV liberado se fundiria à membrana endossômica, liberando o cerne no citoplasma (VANDERPLASSCHEN *et al.*, 1998).

Contudo, foi demonstrado que ambas as formas, IMV e EEV, penetram na célula hospedeira por fusão da membrana externa com a membrana plasmática. Neste caso, ocorreria a dissolução do envelope do EEV em etapa anterior, através de um mecanismo não fusogênico (LAW *et al.*, 2006). Recentemente, dois estudos corroboraram a via endocítica de penetração, apesar de discordarem quanto ao exato mecanismo pelo qual isto ocorreria. Ambos os estudos mostraram que o IMV liga-se a protrusões citoplasmáticas ou filopódios e desloca-se via actina até o corpo celular, onde é internalizado por endocitose de fase fluida, independente da via mediada por clatrina ou cavéola (HUANG *et al.*, 2008), ou por macropinocitose (MERCER & HELENIUS, 2008).

Diante destes resultados contrastantes, é provável que mais de uma via de penetração seja utilizada, como ocorre com os herpesvírus e que, como já foi evidenciado, ocorram variações de acordo com a amostra de vírus ou a linhagem celular utilizadas no estudo (revisado por MOSS, 2006; MOSS, 2007; WHITBECK *et al.*, 2009).

Um provável complexo de penetração/fusão foi identificado e é composto por nove proteínas transmembrana de IMV, a saber, A16, A21, A28, G3, G9, H2, J5, L1 e L5. Estas proteínas são necessárias para a penetração, mas não para a morfogênese, nem para a adsorção à célula hospedeira, desde que a infecção com vírus mutantes para estas proteínas gera partículas morfologicamente normais, porém não infecciosas (revisado por MOSS, 2006; MOSS, 2007; BISHT *et al.*, 2008).

2.3.2. Expressão gênica

As partículas infecciosas dos poxvírus albergam um sistema de transcrição completo, composto de RNA polimerase dependente de DNA, o fator de transcrição precoce viral (VETF) e outras enzimas e fatores envolvidos na síntese e na modificação dos mRNAs virais. Assim, a expressão gênica viral inicia 20 min após a penetração, quando o cerne é liberado no citoplasma e transportado, via microtúbulos, até o sítio de transcrição (revisado por

BROYLES, 2003; MOSS, 2007). Os mRNAs precoces recém-sintetizados são então liberados do cerne para o citoplasma para a tradução dependente da maquinaria de síntese proteica celular (SCHRAMM & LOCKER, 2005).

Os poxvírus coordenam sua transcrição gênica temporalmente ao longo do ciclo de multiplicação, sendo identificadas três classes de genes: genes precoces, genes intermediários e genes tardios (MOSS, 2007).

Os genes precoces codificam proteínas envolvidas na replicação do DNA, biossíntese de nucleotídeos e transcrição de genes intermediários, além de proteínas envolvidas na evasão da resposta imune do hospedeiro. Sob condições normais, o desnudamento do cerne e a consequente liberação do genoma resultam no fim da transcrição dos genes precoces e no início da transcrição dos genes intermediários, que codificam principalmente fatores de transcrição para os genes tardios. A necessidade de replicação do DNA para o início da transcrição dos genes intermediários provavelmente se deve à inacessibilidade do genoma dentro do cerne aos fatores de transcrição recém-sintetizados. Os genes tardios, por sua vez, codificam proteínas envolvidas na morfogênese, bem como as proteínas requeridas para a transcrição dos genes precoces e que são empacotadas nas novas partículas virais para serem utilizadas na próxima infecção (revisado por BROYLES, 2003; MOSS, 2007).

A transição entre as três classes de genes durante o ciclo de multiplicação dos poxvírus é regulada em parte pela elevada taxa de degradação de mRNA verificada após a infecção, em um processo mediado pelas proteínas virais D9 e D10 (PARRISH & MOSS, 2006 e 2007). Este mecanismo, além de permitir a terminação da transcrição de uma determinada classe de genes, também exerce uma importante função na inibição da tradução de mRNAs celulares (PARRISH & MOSS, 2006; revisado por MCLENNAN, 2007).

2.3.3. Replicação do genoma

A replicação do genoma dos poxvírus se inicia entre 1 e 2 h após a infecção e leva à geração de cerca de 10.000 cópias do genoma por célula, sendo que aproximadamente metade deste número será empacotada em vírions ao final do ciclo de multiplicação. Os poxvírus codificam todas as

proteínas consideradas essenciais para replicação de DNA viral, como DNA polimerase, nucleosídeo trifosfatase e DNA glicosilase, sendo que muitos poxvírus também codificam proteínas envolvidas na biossíntese de nucleotídeos (MOSS, 2007).

A liberação do DNA viral no citoplasma ocorre apenas após a síntese das proteínas precoces, sem a qual não há o desnudamento do cerne. Entretanto, ainda não foram identificados os fatores virais e/ou celulares envolvidos neste processo (revisado por SCHRAMM & LOCKER, 2005).

A replicação do DNA dos poxvírus ocorre inteiramente no citoplasma, em sítios específicos denominados “fábricas virais” (MOSS, 2007). Cisternas individuais do retículo endoplasmático são recrutadas para o sítio de replicação, onde se fundem para formarem um envelope, composto de duas bicamadas lipídicas, dentro do qual se procede a replicação do DNA viral. Morfologicamente, este envelope lembra a membrana nuclear sendo, por isso, denominado “mininúcleo” por alguns autores (TOLONEN *et al.*, 2001; revisado por SCHRAMM & LOCKER, 2005). Entretanto, esta denominação tem sido contestada, já que foi demonstrado recentemente que além de sítio de replicação, as fábricas virais também são sítios de transcrição e tradução de proteínas virais, o que deve aumentar significativamente a eficiência da multiplicação viral e contribuir para a usurpação da maquinaria celular pelo vírus (KATSAFANAS & MOSS, 2007).

Em nível molecular, a replicação parece começar com a introdução de pequenas quebras nas extremidades do genoma, sem a necessidade de origem de replicação, seguida por deslocamento de DNA fita simples e síntese pelo mecanismo de fita atrasada, com a necessidade de iniciador de RNA (MOSS, 2007). A replicação do DNA dos poxvírus leva à formação de concatêmeros, que são posteriormente separados com a participação da proteína viral A22, que atua como uma resolvase do tipo HJ (Junção Holliday) (GARCIA & MOSS, 2001; MOSS, 2007). Este modelo de replicação do DNA viral tem sido questionado atualmente devido à identificação de uma proteína viral (D5) com atividade de DNA primase (DE SILVA *et al.*, 2007; DE SILVA *et al.*, 2009). Desta maneira, o modelo atual envolveria a síntese de iniciadores de RNA pela proteína D5 para a síntese da fita líder de DNA ao invés da clivagem da extremidade do DNA viral.

2.3.4. Morfogênese e liberação

A montagem das partículas dos poxvírus inicia nas fábricas virais. As primeiras estruturas identificadas são as crescentes, que consistem de uma membrana, com a superfície convexa com aspecto de favos de uma colméia e a concavidade preenchida por material granular (HEUSER, 2005; MOSS, 2007). Contudo, a natureza da membrana das crescentes ainda é controversa, havendo dúvida se é sintetizada *de novo* ou derivada do retículo endoplasmático, e também se as crescentes são constituídas por apenas uma ou múltiplas membranas (revisado por SMITH & LAW, 2004 e SCHRAMM & LOCKER, 2005).

Posteriormente, surgem os vírions imaturos (IV), quando a membrana das crescentes se fecha dando origem a estruturas circulares preenchidas por uma massa nucleoprotéica densa. O empacotamento do genoma no interior dos IV ocorre após a resolução dos concatêmeros em um processo envolvendo uma ATPase e proteínas teloméricas virais (GARCIA & MOSS, 2001; MOSS, 2007). Também ocorre o empacotamento da maquinaria de transcrição viral, incluindo VETF (HU *et al.*, 1998).

Com a progressão da morfogênese, verifica-se a transição de IV para IMV, com uma marcante mudança na forma da partícula, de esférica para o formato de tijolo ou barril característico dos poxvírus. Durante o processo de transição, os IV perdem o arcabouço formado pela proteína viral D13, que lhes confere o formato esférico e serve como sítio de ancoragem para os componentes do vírion durante a morfogênese (HEUSER, 2005), e diversas proteínas da membrana externa e do cerne sofrem processamento proteolítico, aparentemente mediado pela protease codificada pelo gene I7L (MOSS, 2007). Após a morfogênese, os IMV são transportados das fábricas virais até o centro organizador de microtúbulos (MTOC) (revisado por SMITH *et al.*, 2002).

Os IMV de alguns poxvírus, a saber, *Cowpox virus*, *Ectromelia virus*, *Raccoonpox virus* e *Fowlpox virus*, são oclusos em uma matriz proteica densa no citoplasma, denominadas de inclusões do tipo acidófilo (ATI). Possivelmente, as ATI são liberadas no ambiente após a degeneração das células infectadas. A principal proteína das ATI de *Cowpox virus* apresenta

cerca de 160 kDa, sendo que algumas amostras de VACV também codificam uma proteína homóloga truncada, mas a mesma não forma ATI em células infectadas (revisado por SMITH & LAW, 2004; MOSS, 2007).

Parte dos IMV gerados é transportada via microtúbulos a partir do MTOC e adquire mais duas membranas derivadas de vesículas da rede *trans*-Golgi ou endossomos, dando origem à forma IEV. Algumas proteínas virais exclusivas das formas IEV e EEV são incorporadas nas membranas destes compartimentos, tais como F12, F13, A33, A34, A36, A56 e B5, sendo que as proteínas F12 e A36 estão ausentes nos EEV. Os IEV são transportados via microtúbulos até a superfície da célula, onde o envelope externo de IEV se funde à membrana plasmática, liberando uma parte dos vírions no meio extracelular como EEV, enquanto a outra parte permanece associada à célula hospedeira como CEV (revisado por SMITH *et al.*, 2002 e SMITH & LAW, 2004).

Os CEV induzem a polimerização de actina sob o vírion, processo responsável pela formação das “caudas de actina”, que propõem a partícula em direção às células vizinhas. A proteína A36, presente no envelope externo de IEV, concentra-se na membrana plasmática sob CEV após a fusão, onde é fosforilada pelas tirosina quinases celulares. A fosforilação de A36 induz o recrutamento de outras proteínas celulares envolvidas na polimerização de actina, o que leva à formação das caudas de actina (revisado por MÜNTER *et al.*, 2006). A liberação do CEV da cauda de actina também requer a atividade de tirosina quinases celulares (REEVES *et al.* 2005).

2.4. Patogênese

As infecções pelo *Orthopoxvirus* podem ser classificadas como sistêmicas ou localizadas (no sítio de entrada do vírus). A entrada do vírus no organismo do hospedeiro ocorre através da pele (via contato) ou através do trato respiratório. Inicialmente, o vírus se multiplica no sítio primário de infecção podendo ou não atingir os linfonodos da região acometida, o que determinará se a infecção será sistêmica ou localizada, respectivamente. Após atingir os linfonodos regionais, o vírus chega à corrente sanguínea causando a viremia primária. Em seguida, o vírus se multiplica no baço, fígado, medula óssea e

outros órgãos reticuloendoteliais, ocasionando um segundo período de viremia. A viremia secundária é responsável pela disseminação dos vírus para sítios distantes, especialmente a pele, causando as lesões cutâneas generalizadas característica da infecção pelos *Orthopoxvirus* (revisado por DAMON, 2007).

Assim como para a maioria das infecções virais, a resposta inicial às infecções pelos *Orthopoxvirus* inclui a produção de interferons (IFN) e óxido nítrico, e a ativação de células NK (*natural killer*) e macrófagos, antes que a resposta específica mediada pelos linfócitos T e B seja montada. IFN- γ , granzimas A e B, perforina, linfócitos T CD4 e CD8, e anticorpos foram identificados como importantes para a eliminação da infecção primária. (revisado por DAMON, 2007).

3. Interação Poxvírus-Hospedeiro: Balanço entre Fatores Celulares e Produtos Gênicos Virais

Diante da sua limitada capacidade codificadora gênica, os vírus dependem da maquinaria de síntese celular para completarem seu ciclo de multiplicação e gerarem a progênie viral. Desta forma, ao longo da co-evolução com seus hospedeiros, os vírus desenvolveram estratégias altamente eficientes para cooptar fatores celulares, modificar o ambiente intracelular e escapar das respostas antivirais do hospedeiro, a fim de garantir o sucesso da sua replicação (revisado por GREBER, 2002; LUDWIG *et al.*, 2003; BONJARDIM, 2005; MÜNTER *et al.*, 2006).

Os poxvírus, dado o seu grande genoma, codificam muitas proteínas envolvidas na interação vírus-hospedeiro, principalmente no que tange à evasão da resposta imune. Mesmo assim, os poxvírus requerem muitos fatores celulares, que são cooptados pelo vírus durante a infecção, a fim de garantir a geração da progênie viral (revisado MCFADDEN, 2005). Dentre as proteínas codificadas pelos poxvírus com papel de modular as funções celulares e evadir às respostas do hospederios pode se citar homólogos de fatores de crescimento, proteínas regulatórias do sistema complemento, homólogos de receptores de citocinas, homólogos de citocinas e quimiocinas, serpinas (inibidores de serina proteases), proteínas antiapoptóticas, entre outras (revisado por JOHNSTON & MCFADDEN, 2003).

As vias de transdução do sinal desempenham um papel central na regulação das mais diversas funções celulares, como sobrevivência, crescimento, apoptose, migração e tráfego intracelular. Desta forma, não é surpresa que os vírus interfiram com a ativação destas vias de sinalização de modo a alterar o ambiente intracelular e o tornar mais propício à geração e disseminação virais (revisado por GREBER, 2002; LUDWIG *et al.*, 2003 e MÜNTER *et al.*, 2006).

Durante anos, estudos realizados pelo Grupo de Transdução do Sinal da UFMG vêm demonstrando o envolvimento de vias sinalizadoras celulares durante a infecção pelos *Orthopoxvirus* VACV e *Cowpox virus* (CPXV). A ativação sustentada da via MEK/ERK durante a infecção pelo VACV e pelo CPXV leva à expressão do fator de transcrição EGR-1, sendo que a via MEK/ERK/EGR-1 mostrou-se essencial para a multiplicação de VACV, desde que a sua inibição causou uma significativa redução da progênie viral, mas não para o CPXV. Entretanto, a via MEK/ERK/EGR-1 regula a liberação das formas envelopadas de ambos os vírus (DE MAGALHÃES *et al.*, 2001; ANDRADE *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2006; BRASIL, 2010). Durante a infecção pelo VACV, ativação da via MEK/ERK parece ser desencadeada pela proteína viral VGF (ANDRADE *et al.*, 2004).

Contrariamente ao efeito promotor da multiplicação do VACV, durante a infecção pelo *Myxoma virus* (MYXV), a ativação de MEK/ERK leva à fosforilação do fator de transcrição IRF-3 (fator regulatório de IFN 3), que induz a expressão de IFN- β , responsável pela inibição da replicação viral em fibroblastos embrionários murinos, tornando-os não permissivos ao MYXV (WANG *et al.*, 2004a).

A via MKK/JNK também é ativada durante a infecção por VACV e CPXV, segundo estudos realizados pelo Grupo de Transdução do Sinal. Estes estudos mostraram que, apesar da inibição de JNK não provocar redução da multiplicação, esta via regula a liberação das partículas envelopadas de VACV, através da modulação da dinâmica do citoesqueleto de actina e de microtúbulos durante a infecção (SOARES, 2007; PEREIRA *et al.*, submetido). Outro estudo demonstrou que a interação da quinase viral B1 com a proteína adaptadora JIP-1 aumenta a estabilidade da ligação de MKK-7, TAK-1 e JNK fosforilada à JIP1, contribuindo para a fosforilação de c-Jun em resposta a este

complexo (SANTOS *et al.*, 2006). Durante a infecção pelo VACV, a fosforilação do fator de transcrição c-Jun é temporalmente regulada por ERK e JNK e exerce importante papel na geração e disseminação da progênie viral (PEREIRA, 2007; LEITE, F.G.G. & BONJARDIM, C.A., dados não publicados).

PAK-1 (quinase ativada por p21¹) e Raf-1 são outras duas serina-treonina quinases importantes durante a infecção pelos poxvírus. Durante a infecção pelo MYXV, a fosforilação de PAK-1 e Raf-1 parece influenciar a permissividade celular à replicação viral (JOHNSTON *et al.*, 2003). Estudos realizados pelo Grupo de Transdução do Sinal também evidenciaram o envolvimento de PAK-1 durante a infecção pelo VACV e pelo CPXV, na qual é requerida para a regulação da disseminação das formas EEV e CEV (ANDRADE, 2008).

A ativação da via PI3K/Akt também é observada durante a infecção por VACV e CPXV, sendo requerida para a transmissão de sinais antiapoptóticos, para tradução de proteínas virais e para a morfogênese (SOARES *et al.*, 2009; ZABOROWSKA & WALSH, 2009). A ativação de Akt também ocorre durante a infecção pelo MYXV, desempenhando um papel crucial na determinação da permissividade celular à infecção viral. A proteína viral M-T5 associa-se à Akt aumentando sua atividade de quinase, que exerce importantes funções celulares, tais como sobrevivência, apoptose, proliferação e crescimento (WANG *et al.*, 2006; revisado por WERDEN & MCFADDEN, 2008). M-T5 também interage com a proteína celular Culina-1, formando um complexo responsável pela ubiquitinação de p27^{Kip1} e sua subsequente degradação proteossômica, o que promove a progressão do ciclo celular e a eficiente multiplicação viral (JOHNSTON *et al.*, 2005; revisado por WERDEN & MCFADDEN, 2008).

Algumas das vias sinalizadoras ativadas pela infecção pelos poxvírus estão envolvidas com as profundas alterações no citoesqueleto observadas durante a infecção, tais como reorganização dos microtúbulos, perda da integridade e da função do centrossomo, perda das fibras de estresse de actina, estímulo da migração celular, perda de adesão e formação das caudas de actina (revisado por MÜNTER *et al.*, 2006). A estimulação da migração celular durante a infecção pelo VACV é mediada pela inibição da via GTPase RhoA/mDia, importante na regulação da dinâmica do citoesqueleto de actina e

de microtúbulos, que são necessários durante a liberação das formas envelopadas de VACV (VALDERRAMA *et al.*, 2006; ARAKAWA *et al.*, 2007).

Durante a formação das caudas de actina, tirosina quinases celulares das famílias Src e Abl são ativadas pela proteína viral B5 e fosforilam a proteína A36 do envelope externo de IEV, promovendo o desligamento de A36 de cinesina-1, interação responsável pelo movimento intracelular de VACV via microtúbulos até a superfície da célula (NEWSOME *et al.*, 2004; NEWSOME *et al.*, 2006). A36 fosforilada induz o recrutamento de diversas proteínas celulares, tais como Nck, N-WASP, WIP, Arp-2/3 e Grb-2, que formam um complexo que desencadeia o processo de polimerização de actina sob a partícula, responsável pela propulsão do CEV da célula infectada (MOREAU *et al.*, 2000; SCAPLEHORN *et al.*, 2002; revisado por MÜNTER *et al.*, 2006). A liberação do CEV da cauda de actina, por sua vez, é dependente apenas das proteínas tirosina quinases da família Abl (REEVES *et al.*, 2005).

Os TLRs (receptores do tipo Toll) compõem uma família de receptores encarregados de detectar patógenos virais, bacterianos e fúngicos, e desencadear uma cascata de sinalização que culmina com a ativação de MAPK e fatores de transcrição como NF- κ B e IRF-3, levando à expressão dos IFN (interferons) e de citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-6), além de outros mediadores da resposta do hospedeiro à infecção (revisado por BONJARDIM *et al.*, 2009). Os poxvírus codificam diversas proteínas que interceptam a transmissão do sinal dos TLRs impedindo assim a ativação de NF- κ B e IRF-3. Exemplos incluem as proteínas de VACV A46 (STACK *et al.*, 2005), A52 (HARTE *et al.*, 2003), M2 (GEDEY *et al.*, 2006) e N1 (DIPERNA *et al.*, 2004).

Os IFNs constituem uma das mais poderosas armas do hospedeiro contra as infecções virais e os poxvírus contrapõem a ação dos IFNs através da expressão de proteínas que ligam a IFN- α/β (IFN- α/β -BP) e de homólogos dos receptores de IFN- γ (IFN- γ -R), que atuam sequestrando estas citocinas e impedindo-as de regular a resposta imune contra a infecção viral. Proteínas com estas propriedades são codificadas por VACV, MYXV, CPXV, *Ectromelia virus*, *Fowlpox virus* e *Camelpox virus* (revisado por JOHNSTON & MCFADDEN, 2003; MOSS, 2007). Os poxvírus também interferem com as cascatas de sinalização desencadeadas em resposta aos IFNs, via JAK (quinase Janus)/STAT (transdutor do sinal e ativador da transcrição). O gene

H1L de VACV codifica uma fosfatase que, dentre outras funções, é responsável pela desfosforilação de STAT (NAJARRO *et al.*, 2001).

Além da proteína B8, homóloga de IFN- γ -R, e B19, homóloga de IFN- α/β -BP, VACV codifica outras duas proteínas, E3 e K3, que inibem a ação de PKR (proteína quinase dependente de RNA), um dos principais efetores da resposta celular ao IFN. PKR é ativada por intermediários de RNA fita dupla que se formam durante a infecção viral, sendo um de seus substratos o fator de iniciação da tradução eIF-2 α , cuja fosforilação inibe drasticamente a síntese proteica. Como E3 liga-se a RNA fita dupla e K3 é um homólogo não funcional de eIF-2 α , estas proteínas inibem a atividade de PKR por competir por ativadores e substratos, respectivamente (revisado por JOHNSTON & MCFADDEN, 2003; MOSS, 2007).

A apoptose consiste em outro importante mecanismo disposto pelo sistema imune do hospedeiro para a eliminação de células infectadas por vírus, e é extensivamente regulada por uma complexa rede de vias sinalizadoras. Portanto, não é surpresa que os poxvírus também disponham de estratégias para interferir com estas vias sinalizadoras responsáveis pela regulação da apoptose (revisado por TAYLOR & BARRY, 2006).

O receptor do fator de necrose tumoral (TNFR) e Fas, quando estimulados, são importantes indutores de apoptose pela via extrínseca, que depende da ativação de caspase-8. Proteínas homólogas ao TNFR são codificadas por diversos poxvírus, tais como MYXV, VACV, CPXV, *Ectromelia virus* e *Variola virus*. Os homólogos virais de TNFR são secretados durante a infecção e sequestram TNF, inibindo assim a apoptose induzida por esta citocina em resposta à infecção viral (revisado por TAYLOR & BARRY, 2006). Dentre as diversas proteínas com efeito antiapoptótico codificadas pelos poxvírus também encontram-se cinco serpinas: SPI-1, SPI-2 (B13 ou CrmA) e SPI-3, codificadas pelos *Orthopoxvirus*, e Serp-1 e Serp-2, codificadas pelo MYXV. A proteína CrmA de CPXV, por exemplo, possui efeito inibitório sobre caspase-1, caspase-8, caspase-3 e granzima B, participando tanto da inibição da apoptose quanto do processamento de citocinas pró-inflamatórias (revisado por TAYLOR & BARRY, 2006).

A família de proteínas Bcl-2 desempenha um papel central na regulação da via mitocondrial ou intrínseca de apoptose, reunindo tanto proteínas

antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1) como pró-apoptóticas (Bak, Bax, Bid, Bad, Bim, Puma, Noxa). A apoptose por sinais intrínsecos induz disfunção mitocondrial, levando à liberação de proteínas pró-apoptóticas no citoplasma, como o citocromo c, que iniciam a ativação da cascata de caspases iniciando pela caspase-9 (revisado por TAYLOR & BARRY, 2006). As proteínas M11 de MYXV e FPV039 de *Fowlpox virus* são homólogas de Bcl-2 capazes de inibir a apoptose pela via mitocondrial, através da interação com Bak (WANG *et al.*, 2004b; BANADYGA *et al.*, 2007), sendo que M11 também é capaz de interagir de maneira independente com Bax (SU *et al.*, 2006). De maneira semelhante, a proteína F1 de VACV, não homóloga de Bcl-2, é capaz de inibir, independentemente, a ativação de Bak, Bax e Bim, que levam à apoptose por desencadear a liberação de citocromo c da mitocôndria (WASILENKO *et al.*, 2005; TAYLOR *et al.*, 2006). A proteína N1 de VACV também apresenta propriedades antiapoptóticas e interage com Bad, Bax e Bid durante a infecção (COORAY *et al.*, 2007).

É importante salientar que estas diferentes estratégias de interação com o hospedeiro não atuam separadamente, mas de modo cooperativo e finamente regulado ao longo da infecção. Por exemplo, Postigo *et al.* mostraram que a ativação da via VGF/MEK/ERK coopera com a proteína F1 na inibição da apoptose induzida durante a infecção pelo VACV.

4. Vias Sinalizadoras Celulares e os Vírus

4.1. PI3K(fosfatidilinositol 3-quinase)/Akt

As fosfatidilinositol 3-quinases (PI3K) consistem em uma família de enzimas que fosforilam a posição 3'-OH do anel inositol de fosfatidilinosítídeos (PI) localizados na membrana plasmática. Estes PIs fosforilados atuam como mensageiros secundários, recrutando diferentes proteínas sinalizadoras para a membrana, a partir da qual transmitem o sinal recebido de receptores (revisado por KATSO *et al.*, 2001 e COORAY, 2004) (Figura 5).

As PI3K são heterodímeros compostos por uma subunidade catalítica (p110) e uma subunidade regulatória (p85, p55 ou p50). A subunidade regulatória desempenha o papel de recrutar a subunidade catalítica para a

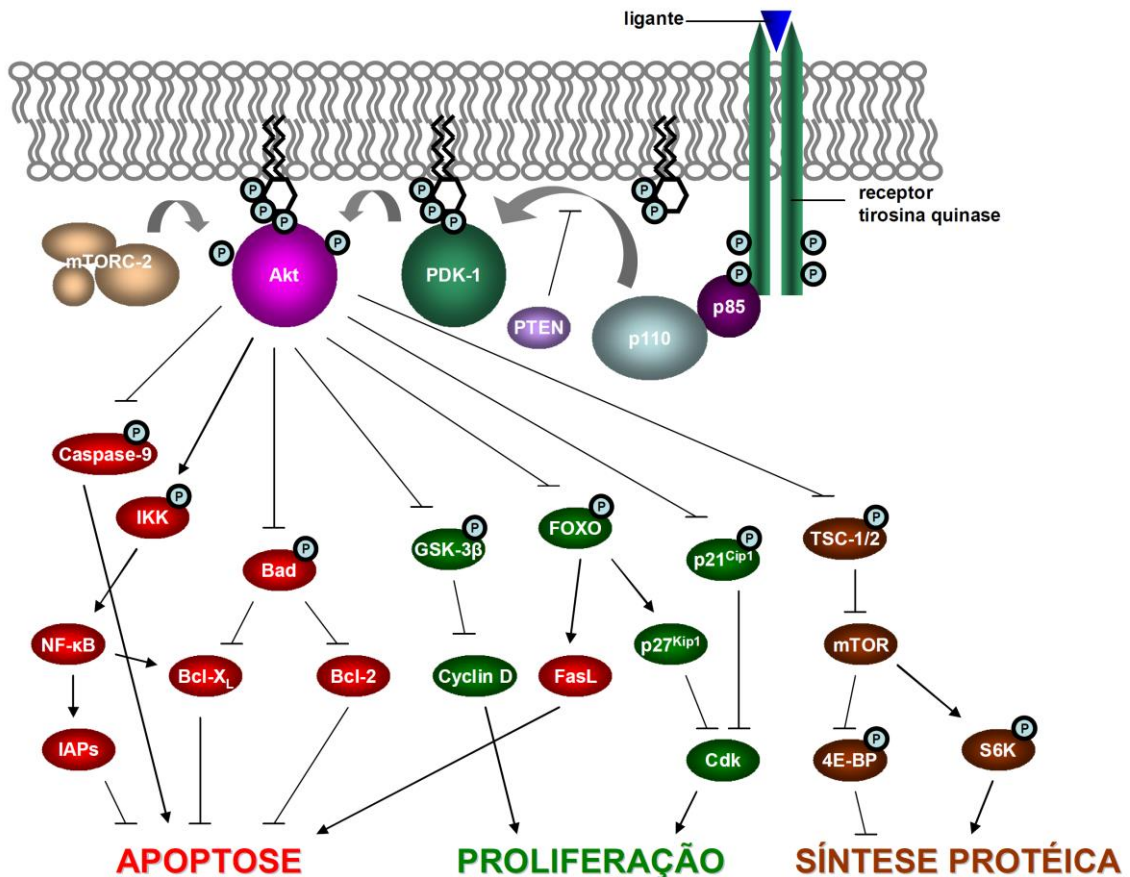


Figura 5. Visão geral da regulação e dos alvos da via sinalizadora PI3K/Akt (modificado de COORAY, 2004).

Em resposta a estímulos extracelulares, as subunidades regulatória (p85) e catalítica (p110) de PI3K (fosfatidilinositol-3-quinase) são recrutadas, pela ligação a resíduos de fosfotirosina, para a membrana plasmática. Na membrana, PI3K fosforila lipídios na posição 3' do anel inositol, originando fosfatidilinositol (PI). PIs funcionam como mensageiros secundários que recrutam outras proteínas sinalizadoras para a membrana, tais como PDK-1 e Akt. PDK-1 fosforila Akt no resíduo Thr308; Akt também é fosforilada no resíduo Ser473 por mTORC-2. Depois de ativada, a serina-treonina Akt transmite sinais antiapoptóticos e envolvidos na regulação da proliferação e da síntese proteica.

membrana plasmática, através da ligação a resíduos de tirosina fosforilados em receptores tirosina quinases ou receptores acoplados a tirosina quinases citoplasmáticas. Uma vez na membrana plasmática, a subunidade catalítica fosforila PI (revisado por KATSO *et al.*, 2001 e HAWKINS *et al.*, 2006). Estruturalmente, as subunidades regulatórias p85 apresentam diferentes domínios que permitem a elas interagirem não somente com proteínas contendo resíduos de tirosina fosforilados (domínio SH2 – homologia à Src 2), mas também com proteínas com regiões ricas em prolina (domínio SH3 – homologia à Src 3) ou GTPases (domínio BH – homologia à Bcl-2), o que confere diferentes especificidades ou maneiras de regulação à via sinalizadora desencadeada por PI3K (revisado por KATSO *et al.*, 2001).

As proteínas transmissoras e/ou efetoras do sinal gerado pela ativação de PI3K apresentam como característica comum o domínio PH (homologia à Pleckstrin), um domínio de ligação a lipídios. O domínio PH é responsável pelo recrutamento destas proteínas para a membrana plasmática, através da ligação aos PIs fosforilados, resultando na colocalização de enzimas e seus substratos e na transmissão do sinal à montante de PI3K (revisado por KATSO *et al.*, 2001). Estas proteínas efetoras incluem serina-treonina quinases, proteínas tirosina quinases, proteínas ativadoras de GTPases (GAP), fatores trocadores de nucleotídeos de guanina (GEF), proteínas adaptadoras e proteínas do citoesqueleto. As respostas celulares desencadeadas pelo recrutamento e ativação destas proteínas incluem proliferação, sobrevivência, migração, além de processos biológicos mais abrangentes como desenvolvimento embrionário, homeostase metabólica e transformação (revisado por KATSO *et al.*, 2001).

Os PIs fosforilados gerados com a ativação de PI3K podem ser desfosforilados pela fosfatase PTEN (homólogo de fosfatase e tensina deletado no cromossomo 10), na posição 3' e SHIP (fosfatase de inositol contendo domínio SH2), na posição 5'. PTEN e SHIP parecem atuar tanto na terminação do sinal gerado por PI3K assim como na geração de outros sinais a partir dos PIs gerados após a desfosforilação (revisado por HAWKINS *et al.*, 2006).

A serina-treonina quinase Akt é uma das principais proteínas ativadas em resposta à ativação de PI3K estimulada por receptores de fatores de crescimento e desempenha papel central na regulação do crescimento,

proliferação e sobrevivência celulares (revisado por COORAY, 2004 e HAWKINS *et al.*, 2006). Akt é ativada através da fosforilação da treonina 308, por PDK-1 (quinase dependente de 3-fosfoinosítídeo 1) e da serina 473, pelo complexo mTOR 2 (mTORC-2). Tanto Akt quanto PDK-1 são recrutadas para a membrana plasmática via ligação a PIs 3'-fosforilados gerados por PI3K (revisado por COORAY, 2004 e HAWKINS, 2006) (Figura 5).

Entre os principais alvos de Akt estão proteínas pró-apoptóticas, como Bad e caspase-9, que são inativadas quando fosforiladas por Akt. Akt também regula a sobrevivência celular através do controle da transcrição de genes pró- e antiapoptóticos, mediante a ativação de fatores de transcrição, como NF- κ B, que controla a transcrição de inibidores de apoptose em resposta aos interferons ou fatores de crescimento (revisado por COORAY, 2004).

Os efeitos da ativação de Akt sobre a proliferação celular são, em parte, mediados pela fosforilação e inativação dos fatores de transcrição FOXO, que controlam a expressão de p27^{Kip-1}, um inibidor de CDK (quinases dependentes de ciclina), responsáveis por regular a progressão do ciclo celular. Outro inibidor de CDK, p21^{Cip-1}, é diretamente inativado por Akt, através de fosforilação. Os fatores de transcrição FOXO também interferem com a regulação da sobrevivência celular, pois controlam a expressão do ligante de Fas, uma proteína pró-apoptótica (revisado por KATSO *et al.*, 2001).

Akt também é responsável pela ativação de uma cascata sinalizadora que culmina com a ativação do complexo mTOR 1 (mTORC-1), composto por outras proteínas além da quinase mTOR, e que possui um importante papel na manutenção da síntese proteica e na regulação do crescimento celular. Uma vez ativada, mTOR fosforila S6K (quinase da proteína ribossômica S6), ativando-a, e 4E-BP (proteína de ligação à eIF4E), inativando-a. Juntos estes eventos estimulam a formação de complexos de iniciação da tradução (revisado por BUCHKOVICH *et al.*, 2008).

4.1.1. PI3K/Akt e os vírus

Diante do papel central da via sinalizadora PI3K/Akt na regulação da sobrevivência e apoptose da célula, os vírus desenvolveram diferentes

estratégias de manipular a atividade dos componentes desta via ao longo da coevolução com seus hospedeiros (revisado por COORAY, 2004).

Como exemplos de vírus que ativam com a via PI3K/Akt a fim de otimizar seu sucesso replicativo, pode se citar *Epstein-Barr virus* (EBV) (DAWSON *et al.*, 2003), *Human cytomegalovirus* (HCMV) (JOHNSON *et al.*, 2001), *Human papillomavirus* (HPV) (ZHANG *et al.* 2002), *Human immunodeficiency virus 1* (HIV-1) (LINNEMANN *et al.*, 2002), *Coxsackievirus B3* (CVB3) (ESFANDIAREI *et al.* 2004), *Respiratory syncytial virus* (RSV) (THOMAS *et al.* 2002), *Hepatitis C virus* (HCV) (HE *et al.*, 2002), *Rubella virus* (COORAY *et al.*, 2005), *Dengue virus* (LEE *et al.*, 2005), *Influenza A virus* (EHRHARDT *et al.*, 2007), *Rotavirus* (HALASZ *et al.*, 2008), VACV e CPXV (SOARES *et al.*, 2009).

No caso de vírus que causam infecção aguda, a ativação de PI3K/Akt induzida pelo vírus durante a infecção é responsável principalmente pela transmissão de sinais anti-apoptóticos, como no caso de RSV, CVB3, *Rubella virus*, *Dengue virus*, *Influenza A virus*, *Rotavirus*, VACV e CPXV (THOMAS *et al.* 2002; ESFANDIAREI *et al.* 2004; COORAY *et al.*, 2005; LEE *et al.*, 2005; EHRHARDT *et al.*, 2007; HALASZ *et al.*, 2008; SOARES *et al.*, 2009). Já no caso de vírus que estabelecem infecção latente ou crônica, como EBV, HPV e HCV, a ativação de PI3K/Akt parece contribuir significativamente para a transformação das células infectadas, mediante o estímulo da sobrevivência celular (HE *et al.*, 2002; ZHANG *et al.* 2002; DAWSON *et al.*, 2003).

A despeito do seu papel na transdução de sinais antiapoptóticos, a ativação de PI3K/Akt pode desempenhar outras funções durante diferentes etapas do ciclo de multiplicação, dependendo do vírus em questão. Durante a infecção com HCMV, a inibição de PI3K não induz apoptose, mas interfere na replicação do DNA e expressão de proteínas virais, mediante a via pi3K/Akt/mTOR (JOHNSON *et al.*, 2001; KUDCHODKAR *et al.*, 2006). Durante a infecção pelo VACV e pelo CPXV, a atividade de PI3K também é requerida em diferentes etapas da infecção, tais como penetração, síntese proteica e morfogênese (MERCER & HELENIUS, 2008; ZABOROWSKA & WALSH, 2009; SOARES *et al.*, 2009).

Para alguns vírus, o mecanismo responsável pela ativação de PI3K/Akt durante a infecção já foi identificado. A proteína NS1 do *Influenza A virus* ativa

a via PI3K/Akt através da interação direta com a subunidade regulatória p85 de PI3K (EHRHARDT *et al.*, 2007; SHIN *et al.*, 2007a; SHIN *et al.*, 2007b). EBV também expressa duas proteínas capazes de ativar PI3K/Akt: LMP1, que também interage diretamente com p85 (DAWSON *et al.*, 2003), e LMP2A, que ativa proteínas tirosinas quinases responsáveis pela ativação de PI3K (SWART *et al.* 2000). Outras proteínas virais capazes de ativar PI3K/Akt incluem NS5A de HCV (HE *et al.*, 2002), E5 de HPV (ZHANG *et al.* 2002) e Nef de HIV-1 (LINNEMANN *et al.*, 2002).

Contrariamente ao seu papel no favorecimento da multiplicação viral, durante a infecção por alguns vírus, a ativação de PI3K/Akt é responsável por desencadear mecanismos de resposta da célula contra a infecção. Um exemplo bastante interessante é o papel bivalente desempenhado por PI3K/Akt durante a infecção pelo *Influenza A virus*, pois além do seu papel anti-apoptótico favorável à multiplicação viral (EHRHARDT *et al.*, 2007), PI3K/Akt também participa da resposta celular contra a infecção, levando à expressão de IFN- β , através da ativação de IRF-3 (EHRHARDT *et al.*, 2006). PI3K/Akt também é responsável pela indução da expressão de IFN em resposta à infecção pelo *Vesicular stomatitis virus* (VSV), sendo que a inibição farmacológica de PI3K causa um significativo aumento na progênie viral (SCHABBAUER *et al.*, 2008).

4.2. MAPK (proteínas quinases ativadas por mitógenos)

A família das MAPKs (proteínas quinases ativadas por mitógenos) está envolvida nos mais diferentes mecanismos de regulação celular e reúne seis grupos distintos de proteínas: (i) ERK-1/2 (quinases reguladas por sinal extracelular), (ii) JNK-1/2/3 (quinase do NH₂-terminal de Jun), (iii) p38- $\alpha/\beta/\gamma/\delta$, (iv) ERK-7/8, (v) ERK-3/4 e (vi) ERK-5. As MAPK são ativadas por diversos estímulos, tais como fatores de crescimento, hormônios, citocinas e estresse ambiental. Estes sinais são transmitidos através de receptores tirosina quinases, receptores acoplados à proteína G (GPCR), receptores de citocinas e receptores serina-treonina quinases, e coordenam diversas atividades celulares como expressão gênica, ciclo celular, metabolismo, motilidade, sobrevivência,

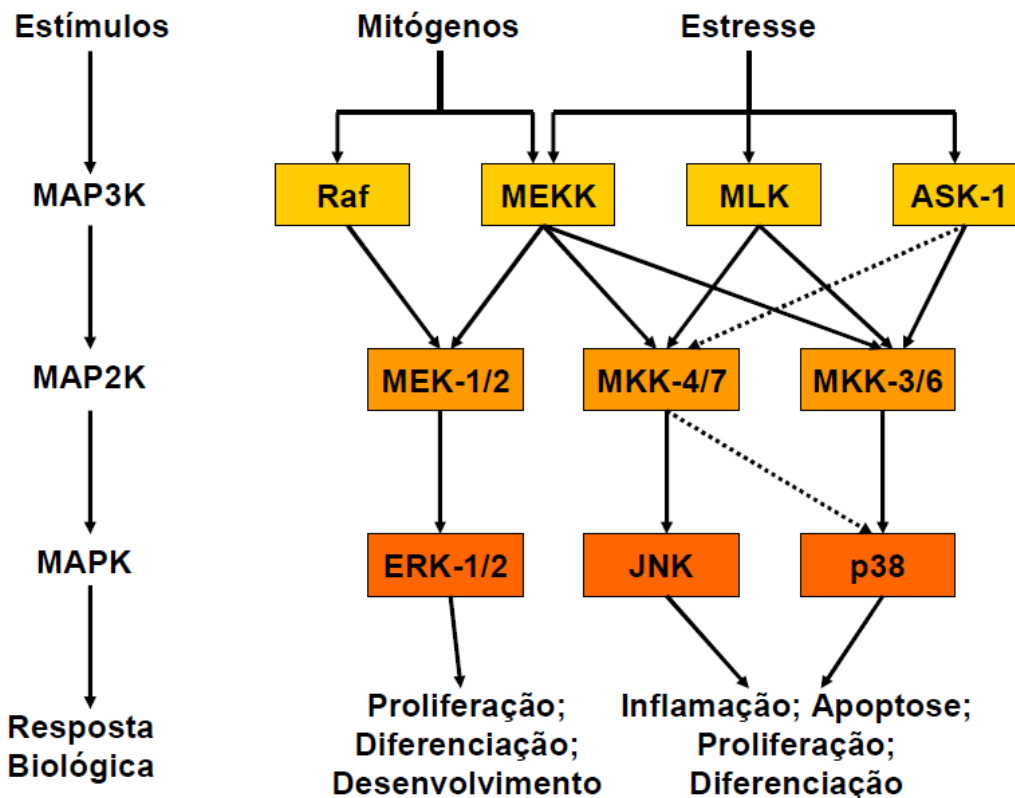


Figura 6. Visão geral das vias sinalizadoras das MAPKs ERK, JNK e p38 (modificado de YANG *et al.*, 2003).

O sinal transmitido via MAPKs (proteínas quinases ativadas por mitógenos) em resposta a estímulos extracelulares está organizado em módulos (MAP3K, MAP2K, MAPK) constituídos por proteínas evolutivamente conservadas. Uma vez ativada, uma MAP3K (MAPK quinase quinase) fosforila uma MAP2K (MAPK quinase) que, por sua vez, fosforila uma MAPK, que é responsável por desencadear a resposta biológica ao sinal externo. As MAPKs regulam os diversos processos celulares, tais como proliferação, diferenciação, inflamação e apoptose.

apoptose e diferenciação (revisado por KRISHNA & NARANG, 2008).

Um aspecto característico das vias sinalizadoras das MAPKs é que são organizadas em módulos compostos por três quinases evolucionariamente conservadas e que atuam em sequência: (i) uma MAPK, (ii) uma MAP2K (MAPK quinase) e (iii) uma MAP3K (MAPK quinase quinase) (Figura 6). As MAP3K são serina-treonina quinases ativadas através de fosforilação e/ou interação com GTPases monoméricas em resposta a estímulos extracelulares. Uma vez ativada, a MAP3K fosforila e ativa uma MAP2K. As MAP2Ks são quinases de dupla especificidade, isto é, são capazes de fosforilar MAPK tanto nos resíduos de treonina quanto de tirosina na região conservada Thr-Xaa-Tyr responsável pela ativação das MAPKs. Após a ativação, as MAPK fosforilam seus substratos em resíduos de serina ou treonina apenas quando estes são seguidos por resíduos de prolina. Os substratos das MAPKs incluem fatores de transcrição, MKs ou MAPKAPKs (proteínas quinases ativadas por MAPK) ou outras proteínas, como proteínas do citoesqueleto (revisado por KRISHNA & NARANG, 2008).

A seguir, será abordada brevemente cada uma das três principais vias sinalizadoras das MAPKs, enfatizando-se principalmente aspectos que porventura possam ser importantes no contexto das infecções virais. No último tópico, serão apresentadas algumas maneiras utilizadas pelos vírus para subverter o sinal transmitido pelas MAPKs e também como as MAPKs são importantes na resposta celular às infecções virais.

ERK foi a primeira das MAPKs a ter a via sinalizadora elucidada. A cascata sinalizadora de ERK é ativada por uma grande variedade de estímulos extracelulares, assim como por vários eventos intracelulares, e desempenha um papel central na indução de processos como proliferação, desenvolvimento e diferenciação. Sob certas condições, também atua na regulação de sobrevivência, apoptose, migração, determinação da morfologia celular e transformação (revisado por SHAUL & SEGER, 2007).

Geralmente, o sinal responsável pela ativação de ERK é transmitido via GTPases monoméricos (por exemplo, Ras), que recrutam a MAP3K Raf para a membrana plasmática, onde é ativada. Outras MAP3Ks que podem ativar ERK são c-Mos, TPL-2 e MEKK-1/2/3. Uma vez ativadas, todas estas MAP3Ks

transmitem o sinal através da fosforilação de MEK (quinase da MAPK ERK). ERKs parecem ser os únicos substratos fisiológicos de MEK, que desta forma atuam como importantes determinantes da especificidade do sinal transduzido via ERK (revisado por SHAUL & SEGER, 2007 e KRISHNA & NARANG, 2008).

Após a fosforilação dos resíduos de treonina e tirosina regulatórios, ERK passa a agir como uma potente serina-treonina quinase, fosforilando uma enorme variedade de substratos, que incluem proteínas do citosol ou da membrana (PLA-2, CD-120a, Syk, calnexina), proteínas nucleares (SRC-1, Pax-6, NFAT, Elk-1, MEF-2, c-Fos, c-Jun, c-Myc, STAT-3, Ets-1/2, p53) e proteínas do citoesqueleto (neurofilamentos, paxilina) (revisado por SHAUL & SEGER, 2007 e KRISHNA & NARANG, 2008). Dentre as MAPKs fosforiladas por ERK destacam-se RSKs (quinases da proteína ribossômica S6), MSKs (quinases ativadas por mitógenos e estresse) e MNKs (quinases que interagem com MAPK), que por sua vez são responsáveis por fosforilar um conjunto distinto de substratos (revisado por SHAUL & SEGER, 2007).

Muitos dos componentes da via sinalizadora de ERK, que incluem muitos fatores de transcrição como c-Myc, c-Fos, SRF, CREB e AP-1, estão relacionados com o controle da proliferação celular. Muitos substratos de RSK, MSK e MNK também são fatores de transcrição e estão envolvidos neste processo. Já o controle de ERK sobre a progressão do ciclo celular é desencadeada através da modulação tanto em nível de transcrição quanto pós-transcrição da atividade de ciclinas e CDKs (revisado por KRISHNA & NARANG, 2008 e CHAMBARD *et al.*, 2007). Diversos estudos também têm mostrado o envolvimento de ERK tanto na indução de apoptose como na sobrevivência celular, principalmente através da modulação de proteínas da família Bcl-2 e de p53 (revisado por KRISHNA & NARANG, 2008).

As outras duas MAPKs, JNK e p38 são também denominadas SAPKs (proteínas quinases ativadas por estresse), pois são ativadas em resposta a citocinas (TNF- α , IL-1, TGF- β), a estresse ambiental (estresse osmótico, estresse oxidativo, radiação) e a ativação dos TLRs. O sinal transmitido via JNK ou p38 regula diversos processos fisiológicos tais como proliferação, metabolismo, inflamação, apoptose, migração celular e diferenciação (revisado por DAVIS, 2000; HUANG, JACOBSON, SCHALLER, 2004; CUENDA &

ROUSSEAU, 2007; KRISHNA & NARANG, 2008; e WAGNER & NEBREDA, 2009).

JNK e p38 compartilham diversas MAP3Ks, que incluem MEKK-1-4, MLK-2/3, DLK, TAK-1 e ASK-1/2. Já as MAP2K são mais específicas. Ao passo que as MAP2K implicadas na ativação de JNK são MKK-4 e MKK-7, p38 é ativada via MKK-3 e MKK-6. Em resposta a alguns estímulos, p38 também pode ser ativada por MKK-4 (revisado por KRISHNA & NARANG, 2008). Por sua vez, o sinal responsável pela ativação das MAP3Ks varia conforme o estímulo e inclui GTPases da família Rho, proteínas tirosina quinases, GPCRs e proteínas adaptadoras TRAFs (revisado por DAVIS, 2000).

JNK possui papel essencial no controle da atividade do complexo ativador da transcrição de AP-1, pois é capaz de fosforilar diversos componentes deste complexo ativador da transcrição, tais como c-Jun, JunD, JunB, ATF-2 e c-Fos, assim como outros fatores de transcrição (Elk-1, c-Myc, p53, NFAT, STAT, Pax) (revisado por KRISHNA & NARANG, 2008). Entretanto, é por modular a atividade da família Jun, cujos membros são importantes reguladores da progressão do ciclo celular, que JNK exerce seu papel sobre a proliferação celular (revisado por WAGNER & NEBREDA, 2009).

Já os substratos de p38 podem ser agrupados em dois grandes grupos: os fatores de transcrição e as proteínas quinases. Os fatores de transcrição incluem p53, ATF, Elk-1, MEF, NFAT, GADD e C/EBP- β . Já entre as proteínas quinases encontram-se MAPKAPK-2/3, MSK-1 e MNK-1/2 (revisado por KRISHNA & NARANG, 2008 e WAGNER & NEBREDA, 2009). Contudo, diferente de ERK e JNK, que normalmente ativam a proliferação celular, p38 comumente exerce regulação negativa sobre a progressão do ciclo celular nas etapas de transição G1/S e G2/M, principalmente através da repressão de ciclinas, indução de inibidores de CDK e modulação da atividade de p53. A regulação negativa da via JNK/c-Jun também contribui para o papel antiproliferativo de p38. Por essa característica, p38 é considerada um supressor de tumor por muitos autores. Entretanto, p38 também pode regular positivamente a proliferação celular, função que está relacionada ao nível de ativação e à interação com outras vias sinalizadoras (revisado por THORNTON & RINCON, 2009 e WAGNER & NEBREDA, 2009).

A indução de apoptose é outro evento classicamente associado à ativação de p38 e JNK em resposta ao estresse. Este papel pode ser mediado tanto no nível de transcrição como pós-tradução, envolvendo membros pró- e antiapoptóticos da família Bcl-2, e p53 (revisado por SUMBAYEV & YASINSKA, 2006 e WAGNER & NEBREDA, 2009). Contudo, em resposta a determinados estímulos, p38 e JNK também podem transmitir sinais antiapoptóticos (revisado por KRISHNA & NARANG, 2008 e WAGNER & NEBREDA, 2009).

A inflamação é um processo fisiológico modulado por p38, principalmente através da regulação da expressão de mediadores e citocinas pró-inflamatórias, tais como COX-2 (ciclo-oxigenase 2), IL-1, IL-6 e TNF- α , tanto no nível de transcrição (via NF- κ B, por exemplo) como pós-tradução, por regular a estabilidade do mRNA (via MAPKAPK-2) e a tradução de proteínas (via MNK-1) (revisado por CUENDA & ROSSEAU, 2007 e WAGNER & NEBREDA, 2009).

As MAPKs também podem atuar sobre a migração celular de diferentes maneiras. ERK, JNK e p38 são capazes de fosforilar paxilina, importante componente das adesões focais, cuja montagem e desmontagem são reguladas por fosforilação e cruciais para a migração celular. JNK possui dois alvos também envolvidos com a migração celular são: (i) Spir, proteína envolvida na reorganização de actina, e (ii) MAPs (proteínas associadas a microtúbulos), que, quando fosforiladas por JNK, aumentam a sua afinidade a microtúbulos, promovendo a sua polimerização. Já MAPKAPK-2, quando ativada por p38, fosforila Hsp27, que na forma não fosforilada é capaz de inibir a polimerização de actina e a formação de fibras de estresse (revisado por HUANG *et al.*, 2004).

A inativação do sinal gerado pelas MAPKs é alcançada principalmente através da desfosforilação do resíduos de treonina e tirosina regulatórios por serina-treonina fosfatases (PP2A, PP2C), proteínas tirosina fosfatases (PTPs, PTP-SL) ou fosfatases de dupla especificidade [MKPs (fosfatases de MAPK)] (revisado por KRISHNA & NARANG, 2008).

4.2.1. MAPK e os vírus

Diante do papel central das MAPKs ERK, JNK e p38 na regulação de processos celulares como proliferação, sobrevivência, apoptose, metabolismo,

migração e inflamação, não é surpresa que os vírus interfiram na atividade destas proteínas sinalizadoras durante a sua manipulação do ambiente intracelular com vistas à geração e disseminação da progênie, bem como à evasão das respostas antivirais do hospedeiro.

Diversos autores já relataram a ativação das MAPK durante a infecção por diferentes vírus e, para muitos deles, a relevância para multiplicação também foi observada. Alguns exemplos de vírus que ativam pelo menos uma das MAPKs durante a infecção incluem *Herpes simplex virus 1* (DIAO *et al.*, 2005), EBV (DAWSON *et al.*, 2008), HCMV (CHEN & STINSKI, 2002), *Human herpesvirus 8* (HHV-8) (NARANATT *et al.*, 2003; PAN *et al.*, 2006), *Hepatitis B virus* (CHIN *et al.*, 2007), *Enterovirus 71* (TUNG *et al.*, 2010), *Dengue virus* (CEBALLOS-OLVERA *et al.*, 2010), *Influenza virus* (PLESCHKA *et al.*, 2001), CVB3 (LUO *et al.*, 2002), CPXV (SOARES, 2007) e VACV (PEREIRA *et al.*, em preparação a).

A modulação da atividade do complexo AP-1 constitui um dos principais alvos da ativação das MAPKs durante as infecções virais. Por exemplo, durante a infecção primária pelo HHV-8, as três MAPK, ERK, JNK e p38, são requeridas para a ativação do complexo AP-1, que regula por sua vez a atividade do promotor viral RTA, sendo que a inibição farmacológica destas vias acarreta em menor infecciosidade e multiplicação viral (PAN *et al.*, 2006). A reativação da infecção pelo HHV-8 também requer a ativação das MAPKs ERK, JNK e p38 (XIE *et al.*, 2008).

Como mencionado anteriormente, estudos realizados pelo Grupo de Transdução do Sinal também mostraram a ativação das MAPKs ERK, JNK e p38 durante a infecção pelo VACV e pelo CPXV (DE MAGALHÃES *et al.*, 2001; SILVA *et al.*, 2006; SOARES, 2007). O sinal transmitido pela via MEK/ERK mostrou-se necessário para a multiplicação do VACV, mas não para o CPXV (ANDRADE *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2006). Já JNK não é requerida para a multiplicação de ambos os vírus (PEREIRA *et al.*, em preparação a; SOARES, 2007). Entretanto, durante a infecção pelo VACV, a via MKK/JNK regula a migração e contração celulares induzidas pelo vírus, bem como a liberação das formas envelopadas do vírus (CEV e EEV) (PEREIRA *et al.*, em preparação a). Fatores de transcrição regulados por ERK e/ou JNK durante a infecção pelo VACV e CPXV, tais como EGR-1, c-Fos e c-Jun, também são requeridos para

a liberação das formas envelopadas destes vírus (OLIVEIRA, 2009; BRASIL, 2010; LEITE, F.G.G. & BONJARDIM, C.A., dados não publicados).

A ativação das MAPKs também pode contribuir na resposta do hospedeiro à infecção. Durante a infecção por alguns vírus, tais como HIV-1 e *Influenza virus*, a ativação de p38, via ASK-1, culmina com a indução de apoptose da célula hospedeira, evidenciando o papel de p38 na resposta do hospedeiro contra as infecções virais (MARUOKA *et al.*, 2003; PERFETTINI *et al.*, 2005; revisado por SUMBAYEV & YASINSKA, 2006). Já para outros vírus, como *Murine coronavirus* e *Varicella-zoster virus*, a inibição de p38 durante a infecção acarreta em redução significativa da multiplicação viral (BANERJEE *et al.*, 2002; RAHAUS *et al.*, 2004).

II. JUSTIFICATIVA

Os vírus dependem extensivamente das funções celulares de seus hospedeiros durante a infecção. Desta forma, para completarem seu ciclo de multiplicação, os vírus precisam modificar o meio intracelular a fim de torná-lo propício à multiplicação e disseminação virais e, ao mesmo tempo, escapar da resposta imune do hospedeiro contra a infecção viral. Para tal, as vias de sinalização responsáveis por regular aspectos centrais da fisiologia celular, como proliferação, sobrevivência e apoptose, são comumente cooptadas pelos vírus durante a infecção (revisado por GREBER, 2002; BONJARDIM, 2005; MÜNTER *et al.*, 2006).

Os poxvírus são caracterizados por apresentarem um grande genoma e, assim codificarem inúmeras proteínas envolvidas na interação vírus-hospedeiro. Mesmo assim, os poxvírus também manipulam importantes vias sinalizadoras celulares durante a infecção com o objetivo de completar seu ciclo de multiplicação e disseminar sua progênie eficientemente. Além disso, as vias sinalizadoras da célula hospedeira desempenham importante papel na determinação do tropismo viral e da susceptibilidade do hospedeiro à infecção pelos poxvírus (revisado por MCFADDEN, 2005).

Durante anos, o Grupo de Transdução do Sinal da UFMG vem estudando esta intrincada interação poxvírus-célula hospedeira, através da análise da ativação e da relevância biológica de vias de sinalização durante a infecção pelos *Orthopoxvirus* VACV e CPXV. Os resultados obtidos a partir destes estudos mostram que as vias MEK/ERK e MKK/JNK são ativadas durante a infecção por ambos os vírus, levando a ativação de importantes fatores de transcrição como c-Fos, EGR-1 e c-Jun. Estas vias sinalizadoras parecem desempenhar importantes papéis em diferentes etapas da biologia viral, afetando ora a multiplicação, ora a liberação das formas envelopadas, ora ambas (DE MAGALHÃES *et al.*, 2001; ANDRADE *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2006; ANDRADE, 2008; PEREIRA *et al.*, submetido; BRASIL, 2010; LEITE, F.G.G. & BONJARDIM, C.A., resultados não publicados). Estudos realizados pelo Grupo de Transdução do Sinal também demonstraram que a via PI3K/Akt é ativada durante infecção por VACV e CPXV, sendo importante para inibição da apoptose induzida pela infecção viral, além de promover a multiplicação

através da regulação da síntese proteica e da morfogênese (SOARES *et al.*, 2009).

Visto que as vias sinalizadoras celulares desempenham um papel central na biologia viral e, conseqüentemente, na patogênese da infecção e da doença, isso implica que o estudo das vias sinalizadoras requeridas pelos poxvírus durante a infecção pode revelar novos alvos terapêuticos, assim como contribuir para o aperfeiçoamento das tentativas de aplicação dos poxvírus como vetores vacinais ou agentes oncolíticos (revisado por MCFADDEN, 2005).

A busca de novos alvos terapêuticos para os poxvírus também é particularmente importante diante do aumento do número de infecções por estes vírus em humanos nos últimos anos (LEWIS-JONES, 2004). No Brasil, há muitos registros de infecções zoonóticas por poxvírus em bovinos e em humanos. Destes surtos foram isolados diversas amostras de VACV geneticamente e biologicamente divergentes. Passatempo, Araçatuba, Guarani P1, Guarani P2 e Cantagalo são algumas destas amostras (DAMASO *et al.*, 2000; TRINDADE *et al.*, 2003; LEITE *et al.*, 2005; TRINDADE *et al.*, 2006). Amostras de VACV também tem sido isoladas de roedores, e estes incluem BeAn 58058, SPAn 232 e Belo Horizonte (FONSECA *et al.*, 1998; FONSECA *et al.*, 2002; TRINDADE *et al.*, 2004). Estudos realizados no Laboratório de Vírus mostraram diferenças significativas quanto à virulência destas amostras que correlacionaram com as diferenças genéticas das mesmas, sendo o VBH considerado o mais virulento (FERREIRA *et al.*, 2008; TRINDADE *et al.*, 2007).

Grandes dúvidas ainda existem acerca da origem destas amostras assim como dos seus reservatórios naturais (TRINDADE *et al.*, 2007; ABRAHÃO *et al.*, 2009), e acredita-se que uma investigação mais acurada sobre a interação vírus-hospedeiro durante a infecção por estas amostras brasileiras de VACV, aliadas a abordagens *in vivo*, genômicas e ecológicas, pode ajudar a responder estes intrigantes questionamentos. Assim, a disponibilidade destas amostras no Laboratório de Vírus constitui uma ferramenta valiosa, pois essas foram isoladas de infecções naturais, diferentemente de amostras de referência como VACV-WR, que foi isolada após sucessivas passagens da amostra vacinal NYCBH (New York City Board of Health) em cérebros de camundongos neonatos (revisado por TRINDADE *et al.*, 2007).

Diante do exposto, o trabalho ora apresentado propôs-se a estudar a ativação e o envolvimento de vias sinalizadoras celulares das MAPK e de PI3K/Akt durante a infecção pelo VBH, um BR-VACV, em comparação ao VACV-WR. Assim, este trabalho certamente contribuirá para a melhor compreensão da biologia do VACV e da intrincada interação poxvírus-hospedeiro durante a infecção.

III. OBJETIVOS

1. Objetivo Geral

Investigar a ativação e o envolvimento de vias sinalizadoras celulares durante a infecção pelo *Vaccinia virus* Belo Horizonte (VBH), em comparação com o *Vaccinia virus* Western Reserve (VACV-WR).

2. Objetivos Específicos

2.1. Verificar se ocorre a ativação da via sinalizadora PI3K/Akt e das MAPK ERK, p38 e JNK em células A31 durante a infecção pelo VBH;

2.2. Verificar a relevância biológica da via sinalizadora PI3K/Akt/mTOR e das MAPK ERK, p38 e JNK durante a infecção pelo VBH;

2.3. Verificar o efeito da inibição farmacológica de PI3K, por LY294002, sobre a expressão de proteínas virais precoces e tardias durante a infecção pelo VBH;

2.4. Verificar a ocorrência de apoptose durante a infecção pelo VBH em presença do inibidor farmacológico de PI3K;

2.5. Avaliar o impacto da inibição farmacológica de caspases, por zVAD.fmk, sobre multiplicação do VBH;

2.6. Determinar as sequências de três genes relacionados à evasão da apoptose (B13R, F1L e N1L) a partir do genoma do VBH.

2.7. Avaliar a permissividade de macrófagos ($M\Phi$) intraperitoniais de camundongos induzidos por tioglicolato e de células RAW 264.7 ao VBH e ao VACV-WR;

2.8. Avaliar a expressão do mRNA de citocinas inflamatórias, em MΦ e em células RAW 264.7 durante a infecção pelo VBH e pelo VACV-WR.

IV. MATERIAL E MÉTODOS

1. Células

1.1. Células BSC-40

As células BSC-40, linhagem contínua de células epiteliais derivadas de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*), foram gentilmente cedidas pelo Dr. Bernard Moss (National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Bethesda, Maryland, Estados Unidos), e foram cultivadas em meio mínimo essencial (MEM) autoclavável, suplementado com 6% de soro fetal bovino (SFB), antibióticos (gentamicina a 40 µg/mL e penicilina a 200 U/mL) e antifúngico (anfotericina B a 1,5 µg/mL). Estas células foram mantidas a 37°C, sob atmosfera de CO₂ a 5%, assim como as demais células que serão utilizadas durante este trabalho.

A linhagem BSC-40 foi utilizada para a produção de VACV-WR e VBH, e para os ensaios de titulação viral.

1.2. Células A31

As células A31, linhagem contínua de fibroblastos 3T3 derivados de camundongos BALB/c, foram gentilmente cedidas pelos Drs. Hugo A. Armelin e Mari C. Sogayar (Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, USP) e foram cultivadas em meio mínimo essencial modificado por Dulbecco (DMEM), suplementado com 7,5% de SFB e o mesmo coquetel de antibióticos e antifúngico utilizado para as células BSC-40.

1.3. Células WT e *jnk-1/2*^{-/-}

Fibroblastos embrionários murinos (MEF) selvagens (WT) e deficientes em JNK-1/2 (*jnk-1/2*^{-/-}) foram gentilmente cedidas pelo Dr. Roger Davis (Howard Hughes Medical Institute, University of Massachusetts Medical School, Worcester, Massachusetts, Estados Unidos). O meio de cultivo utilizado foi

DMEM suplementado com 7% de SFB, gentamicina a 40 µg/mL e penicilina a 200 U/mL.

1.4. Células RAW 264.7

A linhagem de células RAW 264.7, macrófagos transformados pelo vírus da leucemia murina Abelson, foi gentilmente cedida pelo Dr. Aristóbolo Mendes da Silva (Departamento de Morfologia, ICB/UFMG) e cultivada em DMEM, suplementado com 7,5% de SFB e o mesmo coquetel de antibióticos e antifúngico utilizado para as células BSC-40 e A31.

1.5. Macrófagos intraperitoniais de camundongos

O cultivo primário de macrófagos (MΦ) intraperitoniais foi obtido através da injeção intraperitoneal de tioglicolato a 4% estéril em camundongos C57BL/6 fêmeas com 6 semanas de idade. Foi utilizado 1,5 mL de tioglicolato por animal e os mesmos foram mantidos no biotério do Departamento de Microbiologia; com livre acesso à ração e água, e sob ciclo claro/escuro. Passadas 96 h, os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical, seguindo as recomendações do Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG (CETEA). Após desinfecção com etanol 70%, o peritônio de cada animal foi lavado com 5 mL de DMEM gelado sem SFB e suplementado com gentamicina a 40 µg/mL. Os lavados foram coletados em tubos de 50 mL e centrifugados a 1.200 rpm por 10 min a 4°C. O precipitado celular foi suspenso em DMEM suplementado com SFB a 5% e gentamicina a 40 µg/mL, e as células viáveis foram contadas pelo método de exclusão de azul de Tripán.

Os MΦ foram semeados em placas de seis cavidades ($2,0 \times 10^6$ células por cavidade) e incubados por 3 h a 37°C, sob atmosfera de CO₂ a 5%, para a adesão das células ao substrato. Após este período, as células foram lavadas com DMEM sem soro e foi adicionado DMEM suplementado com SFB a 5% e gentamicina. Passadas 24 h, os MΦ foram utilizados para a realização dos experimentos.

2. Vírus

O *Vaccinia virus* Belo Horizonte (VBH) foi isolado de amostras clínicas, durante um surto de varíola murina em camundongos do Centro de Bioterismo da UFMG. O isolamento viral foi feito através de inoculação em MCA e culturas de células Vero (linhagem contínua de células epiteliais de macaco verde africano). Após o isolamento, o vírus foi propagado e titulado em células Vero (DINIZ *et al.*, 2001). Para a realização deste trabalho, o vírus foi submetido à purificação de placa em células BSC-40, a fim de garantir a sua homogeneidade genética, e sua autenticidade foi verificada através de amplificação do gene *ati* e seqüenciamento dos genes A56R e B19R.

O *Vaccinia virus* Western Reserve (VACV-WR) foi cedido pelo Dr. Flávio Guimarães da Fonseca (Departamento de Microbiologia, ICB/UFMG).

Os estoques virais de VBH e VACV-WR foram obtidos após a infecção de células BSC-40 e purificação dos vírus produzidos em gradiente de sacarose.

2.1. Produção dos estoques virais

Células BSC-40 foram cultivadas em garrafas de 150 cm² até atingirem a confluência, quando foram infectadas com VACV-WR ou VBH, utilizando-se MOI (multiplicidade de infecção) de 0,01 pfu (unidades formadoras de placa), em meio sem SFB, e foram mantidas por 1 h a 37°C para a adsorção viral. Após a adsorção, meio suplementado com 1% de SFB foi adicionado e as células foram mantidas e monitoradas, ao microscópio óptico invertido, até o aparecimento de 90% de efeito citopático (ECP). Após o aparecimento de ECP, as células foram lavadas com PBS (solução tamponada de fosfato pH 7,4), desprendidas das garrafas com o auxílio de um raspador de células, coletadas, centrifugadas a 2.500 rpm por 15 min a 4°C (rotor A384 – Sorvall RT6000B) e, então, congeladas a -20°C para posterior purificação.

2.2. Purificação viral

A purificação dos estoques virais foi realizada de acordo com metodologia descrita por Joklik (1962). Sucintamente, as células coletadas foram submetidas à lise mecânica com o auxílio de um macerador (“douncer”), em tampão de lise ($MgCl_2$ 1 mM; Tris-HCl 10 mM pH 7,0; KCl 10 mM), e centrifugadas a 2.500 rpm por 15 min a 4°C (rotor A384 – Sorvall RT6000B). O sobrenadante, contendo os vírus e restos celulares, foi coletado e centrifugado em colchão de sacarose a 36% a 14.000 rpm por 2 h a 4°C (rotor AH 629 Sorvall), para a remoção dos restos celulares. O sedimento foi suspenso em tampão Tris-HCl 10 mM pH 8,0, e submetido a sonicação por 2 ciclos de 30 s (Sonic Desmembrator-50, Fisher Scientific). A seguir, a suspensão viral foi centrifugada em gradiente de sacarose, variando de 25 a 40%, a 12.000 rpm por 45 min a 4°C (rotor AH 629 Sorvall). A banda inferior formada após a centrifugação, correspondente às partículas virais completas e infecciosas do tipo IMV, foi coletada e centrifugada em tampão Tris-HCl 10 mM pH 8,0 a 20.000 rpm por 1 h a 4°C (rotor AH 629 Sorvall), para a remoção da sacarose. O sedimento resultante foi então coletado, suspenso no mesmo tampão, distribuído em alíquotas e congelado a -70°C, para posterior titulação e uso nos experimentos.

2.3. Titulação viral

A titulação dos estoques virais obtidos e dos experimentos descritos nos itens 4 e 6 foi realizada de acordo com metodologia proposta por Campos & Kroon (1993). Resumidamente, células BSC-40 foram cultivadas em placas de seis cavidades (cavidade - 9,6 cm²), por 16h, até atingirem cerca de 100% de confluência. Duzentos microlitros de uma série de diluições decimais da suspensão contendo o vírus a ser titulado foram inoculados às culturas de células. Uma cultura foi falsamente infectada e mantida como controle celular. Após 1 h de adsorção viral, foi adicionado meio contendo 1% de SFB. A revelação foi realizada após 48 h de infecção através da fixação das culturas com formaldeído a 10% por 30 min e coloração com solução de cristal violeta a 1% (p/v) em etanol 20%, por 15 min. As culturas contendo entre 10 e 100

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

3. Análise das Vias de Sinalização durante a Infecção pelo *Vaccinia Virus* Belo Horizonte

3.1. Anticorpos e Drogas

Os anticorpos anti-fosfo-Akt (Ser473), anti-caspase-3 clivada (Asp175), anti-PARP (poli-ADP-ribose polimerase), anti-fosfo-ERK-1/2 (Thr202/Tyr204), anti-fosfo-JNK (Thr 183/Tyr185), anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase (Cell Signaling Technology), anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase anti- β -actina (Sigma-Aldrich) foram utilizados nos ensaios de transferência “Western” nas diluições recomendadas pelos fabricantes. O anticorpo anti-fosfo-p38 (Thr180/Tyr182) foi gentilmente doado pela Dra. Lirlândia P. Sousa (Colégio Técnico/UFMG). Os anticorpos para as proteínas virais H3, F18, D8 (gentilmente cedidos pelo Dr. Bernard Moss, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Bethesda, Maryland, Estados Unidos) e CrmA/SPI-2/B13 (gentilmente cedido pelo Dr. David Pickup, Duke University Medical Center, Estados Unidos) também foram utilizados.

Os inibidores de PI3K (LY294002 – 2-(4-morfolinil)-8-fenil-4H-1-benzopirano-4-ona) e MEK (UO126 – 1,4-diamino-2,3-diciano-1,4-bis(2-aminofeniltio)-butadieno) foram adquiridos da Cell Signaling Technology. Os inibidores de caspases (zVAD.fmk – benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethylketone), rapamicina e genisteína foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Os inibidores de JNK (SP600125 ou JNK inhibitor II – 1,9-pirazoloantrona e JNK inhibitor VIII – N-(4-amino-5-ciano-6-etoxipiridin-2-il)-2-(2,5-dimetoxifenil)-acetamida) foram adquiridos da Calbiochem. Os inibidores de Akt (Akt inhibitor IV – derivado de benzimidazol) e de p38 (SB202190 – 4-(4-fluorofenil)-2-(4-hidroxifenil)-5-(4-piridil)-1H-imidazol), e a toxina pertussis foram gentilmente cedidos pela Dra. Lirlândia P. de Sousa (Colégio Técnico/UFMG). Os inibidores foram utilizados de acordo com as recomendações do fabricante, em concentrações ótimas para a inibição específica de seus respectivos alvos, sem causar nenhum efeito tóxico às células.

3.2. Infecção

Células A31 foram cultivadas em garrafas de 25 cm² até atingirem 90% de confluência, quando foram carenciadas em meio DMEM suplementado com 1% de SFB, por no mínimo 12 h. O objetivo do carenciamento é minimizar o estímulo mitogênico exercido pelos componentes do SFB, sincronizando as células no estado quiescente (fase G₀ do ciclo celular). As células foram infectadas com VACV-WR ou VBH a MOI de 10, em meio sem SFB e mantidas por 1 h, sob agitação intermitente, para a adsorção viral. A seguir, o inóculo viral foi removido, DMEM contendo 1% de SFB foi adicionado e as células foram incubadas por tempos variando de 1 h a 24 h. Quando inibidores farmacológicos foram utilizados, as células foram pré-tratadas 30 min antes da infecção, e os mesmos foram mantidos no meio de cultura durante todo o tempo de infecção.

3.3. Extração de Proteínas Totais

Após o tempo de infecção, as células foram lavadas duas vezes com PBS, adicionando-se, posteriormente, 150 µL/garrafa de solução de lise [Triton X-100 1%; Tris-HCl 100 mM pH 8,0; EDTA 0,2 mM; glicerol 20% (v/v); NaCl 200 mM; NaVO₃ (ortovanadato de sódio) 1 mM; NaF (fluoreto de sódio) 50 mM PMSF (fenilmetilsulfonilfluoreto) 1 mM; aprotinina 5 µg/mL; leupeptina 2,5 µg/mL; DTT (1,4-ditiotreitol) 1 mM]. As células foram mantidas no gelo por 20 min e, a seguir, raspadas e coletadas em tubos de 1,5 mL. O lisado foi clarificado através de centrifugação a 13.000 rpm por 20 min a 4°C em microcentrífuga (Eppendorf 5417R), para eliminação dos restos celulares. O sobrenadante foi coletado e a concentração de proteínas totais foi determinada por espectrofotometria, utilizando o kit Bio-Rad Assay (Bio-Rad Laboratories). Após, as proteínas foram distribuídas em alíquotas e mantidas a -20°C.

3.4. Transferência “Western”

Tampão LB (“loading buffer”) 5× [Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; β-mercaptoetanol 5%; azul de bromofenol 0,1% (p/v); glicerol 20% (p/v)] foi

adicionado a alíquotas de 30 µg/amostra das proteínas totais, que foram, então, desnaturadas por 5 min a 99°C. As amostras foram submetidas a fracionamento em gel de poliacrilamida/dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) a 10%. Após o fracionamento, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose Hybond ECL (GE Healthcare), conforme protocolo do kit Bio-Rad Transference (Bio-Rad Laboratories). Após a transferência, as membranas foram coradas com Ponceau 1% para a verificação da eficiência da mesma, além da informação sobre a equivalência das quantidades de proteínas utilizadas.

A seguir, as membranas foram bloqueadas em solução de leite em pó desnatado a 5% (p/v) e Tween-20 a 0,1% (v/v) em PBS. Após 1 h a temperatura ambiente, as membranas foram lavadas três vezes em PBS/Tween-20 a 0,1% e incubadas com o anticorpo primário desejado por 24 h a 4°C, na diluição recomendada pelo fabricante, em albumina sérica bovina (BSA) a 5% (p/v) em PBS/Tween-20. As membranas foram novamente lavadas três vezes em PBS/Tween-20 e incubadas, por 1 h a temperatura ambiente, com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase, na diluição recomendada pelo fabricante em leite em pó desnatado a 5% (p/v) em PBS/Tween-20. Após as membranas serem novamente lavadas em PBS/Tween-20, as mesmas foram incubadas em solução reveladora ECL ou ECL Plus (GE Healthcare) pelo tempo recomendado pelo fabricante, expostas contra filme Hyperfilm ECL (GE Healthcare) e reveladas com revelador e fixador (Kodak), de acordo com as instruções do fabricante.

As membranas reutilizadas para sondagem com diferentes anticorpos foram incubadas com tampão de remoção (β -mercaptoetanol 100 mM; SDS 2%; Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8), por 30 min a 56°C. Após este tempo, as membranas foram lavadas repetidamente (cerca de cinco vezes) em PBS/Tween-20, coradas com Ponceau 1%, bloqueadas e incubadas com os anticorpos, como descrito acima.

4. Análise da Relevância Funcional de Vias Sinalizadoras Celulares para a Biologia do *Vaccinia Virus* Belo Horizonte

Células A31 ou MEF WT e *jnk-1/2*^{-/-} foram cultivados em placas de seis cavidades até atingirem 90% de confluência e carenciadas em meio DMEM

suplementado com 1% de SFB, por no mínimo 12 h. Antes da infecção, as células A31 foram pré-tratadas com os inibidores, por 30 min, e os mesmos foram mantidos ao longo de toda a infecção. As células foram infectadas com VACV-WR ou VBH a MOI de 10 em meio sem SFB e mantidas por 1 h, sob agitação intermitente, para a adsorção viral. A seguir, foi adicionado DMEM contendo 1% de SFB. Após 24 h, as células mais o meio de cultura foram congelados e descongelados três vezes para promover a lise celular e liberação da progênie viral. O lisado celular foi clarificado por centrifugação a 2.500 rpm por 3 min a 4°C em microcentrífuga (Eppendorf 5417R) e o sobrenadante contendo as partículas virais foi utilizado para a determinação dos títulos virais em células BSC-40, conforme descrito no item 2.3.

4.1. Titulação de EEV (vírus envelopados extracelulares)

MEF WT e *jnk-1/2*^{-/-} foram cultivados em placas de seis cavidades até atingirem 90% de confluência e carenciadas em meio DMEM suplementado com 1% de SFB, por no mínimo 12 h. As células foram infectadas com VACV-WR ou VBH a MOI de 10 em meio sem SFB e mantidas por 1 h, sob agitação intermitente, para a adsorção viral. A seguir, foi adicionado DMEM contendo 1% de SFB. Após 48 h de infecção, os sobrenadantes foram coletados e clarificados por centrifugação a 2.500 rpm por 3min a 4°C em microcentrífuga (Eppendorf 5417R). Os sobrenadantes clarificados foram, então, submetidos à soroneutralização com soro anti-IMV produzido em coelho, por 30 min a 37°C sob agitação. Após a soroneutralização, as amostras foram submetidas a titulação em células BSC-40, conforme descrito anteriormente. Este procedimento permite a determinação do título de EEV na amostra já que os IMV são neutralizados pelo soro e impedidos de infectar as células.

5. Microscopia Eletrônica de Transmissão

Células A31 foram cultivadas em garrafas de 150 cm² até atingirem 90% de confluência, quando foram carenciadas com DMEM contendo 1% de SFB carenciadas por no mínimo 12 h. As células foram pré-tratadas ou não com LY294002 por 30 min e infectadas com VBH a MOI de 2 em meio sem SFB e

mantidas por 1 h, sob agitação intermitente, para a adsorção viral. A seguir, foi adicionado DMEM contendo 1% de SFB com ou sem inibidor, respectivamente. Após 18 h de infecção, as células foram lavadas com DMEM sem soro e fixadas em glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 por 1 h a temperatura ambiente. Em seguida, as células foram gentilmente raspadas e sedimentadas por centrifugação. As células foram então lavadas com tampão cacodilato, pós-fixadas com tetróxido de ósmio a 1%, desidratadas em acetona e processadas para microscopia eletrônica de transmissão convencional. Os cortes ultrafinos foram visualizados em microscópio eletrônico de transmissão Tecnai G2 20 (FEI), do Centro de Microscopia da UFMG. Todo o processamento das amostras para microscopia eletrônica foi realizado pelos técnicos do Centro de Microscopia da UFMG.

6. Análise da Permissividade e da Expressão do mRNA de Citocinas durante a Infecção de Macrófagos pelos *Vaccinia Virus* Belo Horizonte e Western Reserve

Os MΦ obtidos conforme descrito no item 1.5 foram infectados com VBH ou VACV-WR a MOI de 10 em meio sem SFB e mantidas por 1h, sob agitação intermitente, para a adsorção viral. A seguir, foi adicionado DMEM contendo 1% de SFB, e as células foram incubadas por tempos de 3, 12, 24 e 30 h. Para a avaliação da multiplicação viral, após os diferentes tempos de infecção, as células mais o meio de cultura foram congelados e descongelados três vezes para promover a lise celular e liberação da progênie viral. O lisado celular foi clarificado por centrifugação a 2.500 rpm por 3 min a 4°C em microcentrífuga (Eppendorf 5417R) e o sobrenadante foi utilizado para a determinação dos títulos virais em células BSC-40, conforme descrito no item 2.3.

Para a análise dos níveis de mRNA de citocinas durante a infecção pelo VBH e pelo VACV-WR, após os diferentes tempos de infecção, as células foram lavadas duas vezes em PBS e submetidas à extração do RNA total conforme descrito no item seguinte. O tempo de 30 hpi foi excluído, pois não se obteve RNA total suficiente e em qualidade adequada para as análises.

As células RAW 264.7 foram submetidas a procedimento semelhante ao descrito acima, exceto que, para a obtenção de $2,0 \times 10^6$ células por cavidade

no momento da infecção, foram semeadas $6,0 \times 10^5$ células por cavidade, 24 h antes do experimento.

6.1. Extração do RNA Total

O RNA total foi obtido através de extração com o reagente Trizol (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, 1 mL de Trizol foi adicionado diretamente a cada cavidade da placa de cultivo, e o lisado celular foi homogeneizado com o auxílio de uma pipeta, transferido para um tubo de 1,5 mL e mantido por 5 min a temperatura ambiente. A seguir, adicionaram-se 200 μ L de clorofórmio a cada tubo. Os tubos foram agitados manualmente por 15 s e incubados por 3 min a temperatura ambiente. Após centrifugação a 11.400 rpm por 15 min a 4°C, a fase aquosa contendo o RNA foi coletada e transferida para um novo tubo de 1,5 mL. O RNA foi precipitado com 500 μ L de isopropanol por tubo. Os tubos foram mantidos por 10 min a temperatura ambiente e centrifugados a 11.400 rpm por 10 min a 4°C. Os precipitados de RNA foram lavados com 1 mL de etanol a 75%. Os tubos foram agitados em vórtex e centrifugados a 8.900 rpm por 5 min a 4°C. Os precipitados de RNA foram secos ao ar por 10 min, suspensos em água tratada com DEPC (dietilpirocarbonato) e quantificados em espectrofotômetro Nano Drop (Thermo Scientific).

6.2. Transcrição Reversa

Para a síntese do cDNA (DNA complementar), 1-2 μ g de RNA foram adicionados à mistura de reação a seguir: tampão da transcriptase reversa (Tris-HCl pH 8,3 50 mM; KCl 75mM; MgCl₂ 3 mM; DTT 10 mM), oligonucleotídeo dT 0,4 μ M, dNTP (deoxiribonucleotídeo trifosfato) 500 μ M, 200 U de transcriptase reversa MMLV (vírus da leucemia murina Moloney) (Promega) e água deionizada tratada com DEPC q.s.p. 25 μ L. Antes de serem adicionados à mistura de reação, o RNA, o oligonucleotídeo dT e água deionizada tratada com DEPC q.s.p. 15 μ L foram desnaturados a 70°C por 5 min e, posteriormente, mantidos no gelo por 2 min. A reação de transcrição reversa foi realizada por 1 h a 37°C, em termociclador (Eppendorf).

6.3. PCR em Tempo Real

A análise dos níveis de expressão de citocinas foi realizada por PCR em tempo real, utilizando-se o equipamento Step ONE Real Time PCR System (Applied Biosystems). Os oligonucleotídeos utilizados são mostrados na Tabela 1 e a mistura de reação foi a seguinte: 5 µL de Master Mix SYBR Green (Applied Biosystems), 0,2 µM de cada iniciador (*forward* e reverso), 2 µL de cDNA diluído 1:3 e água deionizada q.s.p. 10 µL. As condições de reação foram desnaturação inicial de 10 min a 95°C seguida de 40 ciclos de 15 s a 95°C e 1 min a 60°C. Os iniciadores utilizados são mostrados na Tabela 1. Após o fim da reação, a especificidade dos produtos amplificados foi confirmada através da curva de dissociação, observando-se a temperatura específica de dissociação (T_m) para cada um dos alvos.

O método utilizado para a análise dos níveis de expressão do mRNA de citocinas foi a comparação dos valores de C_T , utilizando-se como controle endógeno o mRNA da enzima HPRT (hipoxantina guanina fosforibosiltransferase) e como amostra de referência, células falsamente infectadas (*mock*) 3 hpi, à qual foi atribuída o valor 1. Para o cálculo dos níveis de expressão de mRNA foram aplicadas as fórmulas abaixo:

$$(i) \quad \text{Expressão relativa} = 2^{-\Delta\Delta C_T}, \text{ onde:}$$

$$(ii) \quad \Delta\Delta C_T = \Delta C_T (\text{Amostra}) - \Delta C_T (\text{Referência}), \text{ onde:}$$

$$(iii) \quad C_T = C_T (\text{Citocina}) - C_T (\text{HPRT})$$

7. Sequenciamento

7.1. PCR

Para a obtenção das sequências dos genes B13R, F1L e N1L os mesmos foram primeiramente submetidos à amplificação por PCR, utilizando-se iniciadores desenhados com base no genoma do VACV-WR (número de

Tabela 1. Iniciadores utilizados para a avaliação da expressão do mRNA de citocinas inflamatórias em macrófagos de camundongo infectados pelo VBH e pelo VACV-WR.

Iniciador	Sequência 5'-3'	Alvo	Tamanho do Produto (bp)
F ^a	TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA	IFN-	171
R ^b	GTACTTTTAGGACGTCTCGGT		
F	CATCTTCTCAAATTTCGAGTGACAA	TNF-	174
R	CCCAACATGGAACAGATGAGGGT		
F	ACAGGAGAAGGGACGCCAT	IL-4	95
R	GAAGCCCTACAGACGAGCTCA		
F	ACGGCCTTCCCTACTTCACA	IL-6	124
R	CCACGATTTCCCAGAGAACA		
F	GGTTGCCAAGCCTTATCGGA	IL-10	191
R	ACCTGCTCCACTGCCTTGCT		
F	GTTGGATACAGGCCAGACTTTGTTG	HPRT	142
R	CGGATTCTACTCGCGTTCAACTTAG		

^aforward; ^breverso

acesso no GenBank: AY243312) para amplificar a ORF completa dos genes (Tabela 2). A mistura de reação foi a seguinte: Tampão da *Taq* DNA polimerase (Tris-HCl pH 8,4 20 mM; KCl 50 mM), MgCl₂ 2 mM, dNTP 200 nM, 200 nM de cada iniciador (*forward* e reverso), 0,3 µL de *Taq* DNA polimerase, e água deionizada q.s.p. 20 µL. Como molde para a PCR foi utilizado 2 µL de DNA extraído pelo método de fenol-clorofórmio a partir de células infectadas pelo VBH ou VACV-WR, como controle positivo. As condições de reação para todos os genes foram: desnaturação inicial a 95°C por 7 min, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 s, pareamento dos iniciadores a 49°C por 30 s e extensão a 72°C por 1 min, e extensão final a 72°C por 10 min. Os produtos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% e corados com Gel Red (Uniscience), e visualizados através de exposição à luz ultravioleta.

Os produtos de PCR obtidos a partir do genoma do VBH foram submetidos a sequenciamento direto após precipitação com PEG (polietilenoglicol). No caso do gene B13R, a sequência também foi obtida após ligação do produto de PCR em vetor plasmidial pGEM-T Easy (Promega), seguida de transformação de bactérias *Escherichia coli* DH5α quimiocompetentes, seleção de clones positivos através da resistência à ampicilina, confirmação por PCR e purificação do DNA plasmidial pelo kit Wizard Plus SV Minipreps (Promega).

7.2. Precipitação de DNA para sequenciamento

Cinquenta microlitros de produto de PCR foram misturados a igual volume de PEG 8000 20% em NaCl 2,5 M e incubados por 15 min a 37°C. Após centrifugação a 14.000 rpm por 15 min, os sobrenadantes foram descartados e adicionou-se 125 µL de etanol 75% gelado a cada tubo. Os tubos foram novamente centrifugados a 14.000 rpm por 2 min. O etanol foi descartado e o procedimento anterior repetido mais uma vez. Após descartar o etanol, os tubos foram submetidos à centrifugação rápida (“spin”) e secos em estufa a 37°C por 5 min. O DNA foi suspenso em 10 µL de água deionizada, os tubos foram agitados em vórtex por 15 s e incubados a 37°C por 15 min. Em

Tabela 2. Iniciadores utilizados para a amplificação por PCR dos genes B13R, F1L e N1L de VACV.

Iniciador	Sequência 5'-3'	ORF-alvo	Tamanho do produto (bp) ^a
B13R-F	GTGTGGTAGTGTTACGGATA	B13R	1.168
B13R-R	ATTGGAAGAATAACGACCTG		
F1L-F	ACGTTAGCATTCTATATCCG	F1L	745
F1L-R	GGATCAACAGGACTTAGATA		
N1L-F	TACTCATTATCATTCCGCA	N1L	468
N1L-R	AGCGGTGTACTAATTGATTT		

^abaseado no genoma do VACV-WR

seguida, o DNA purificado foi quantificado em espectrofotômetro Nano Drop (Thermo Scientific) e a sua integridade atestada após eletroforese de 1 μ L em gel de agarose a 1%.

7.3. Obtenção das sequências

O sequenciamento foi realizado pelo método de didesoxinucleotídeo descrito por Sanger e colaboradores (1977), em sequenciador automático capilar MegaBACE 1000 (GE Healthcare), utilizando o kit DYEnamic ET Dye Terminator (GE Healthcare), obedecendo as condições de reação e leitura indicadas pelo fabricante.

Aproximadamente 50-100 ng de produto de PCR ou 200-400 ng de plasmídeo foram utilizados em cada reação de sequenciamento, na qual foram utilizados iniciadores específicos de cada gene ou os iniciadores universais do fago M13, respectivamente. A reação de sequenciamento foi realizada em placa de 96 poços, em termociclador, sob as condições seguintes: 36 ciclos de desnaturação a 95°C por 25 s, pareamento do iniciador a 50°C por 15 s e extensão a 60°C por 3 min. Em seguida, o produto da reação foi purificado através de precipitação com acetato de amônio e etanol e homogeneizado em tampão de aplicação.

7.4. Análise das sequências

Para montagem e visualização das sequências finais, os cromatogramas obtidos foram analisados utilizando os programas Chromas Lite (Technelysium Pty Ltd), Phred (EWING *et al.*, 1998; EWING & GREEN, 1998), Cross-match, Phrap (GORDON *et al.*, 1998; GORDON & GREEN, 2001) e CAP3 (HUANG & MADAN, 1999), disponíveis na *home page* da Embrapa (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária) em <http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>. Para a montagem da sequência final, foram consideradas as bases que apresentaram valor de qualidade igual ou superior a 40.

As sequências obtidas foram comparadas com sequências depositadas no GenBank, utilizando os programas BLASTN e BLASTX (ALTSCHUL *et al.*, 1990) disponíveis em www.ncbi.nlm.nih.gov/blast. Sequências de nucleotídeos

e de aminoácidos, relativas genes analisados neste estudo, das amostras WR e CTGV de VACV foram obtidas do GenBank (Números de acesso: AY243312, EF488960, EF488962).

Os alinhamentos das sequências de nucleotídeos e sequências inferidas de aminoácidos foram construídos com o auxílio dos programas Clustal W versão 1.6 implementado no pacote MEGA 4.1 (THOMPSON *et al.*, 1994; KUMAR *et al.*, 2004; <http://megasoftware.net>).

V. RESULTADOS

1. Morfogênese do *Vaccinia Virus* Belo Horizonte

Baseados em estudos filogenéticos, Trindade *et al.* concluíram que o *Belo Horizonte virus*, isolado de camundongos doentes do Centro de Bioterismo da UFMG, tratava-se de uma amostra de VACV (TRINDADE *et al.*, 2004). Posteriormente, estudos realizados no Laboratório de Vírus por Ferreira e colaboradores caracterizaram a virulência desta e de outras amostras de BR-VACV, mostrando o VBH foi o mais virulento após a infecção intranasal de camundongos BALB/c (FERREIRA *et al.*, 2008). Com vistas a dar continuidade a esta caracterização do VBH, realizou-se uma análise ultraestrutural de células infectadas com o VBH por microscopia eletrônica de transmissão. Conforme pode ser observado na Figura 8, as etapas principais da morfogênese dos poxvírus foram visualizadas.

Na Figura 7A, observam-se estruturas com o formato de crescentes que se formam a partir dos virossomos, que são subdomínios da fábrica viral, sítio de replicação do DNA viral dentro da célula. As crescentes aumentam em tamanho, mas mantêm a curvatura, até se tornarem esferas, denominadas IV (vírus imaturos) (Figura 7A). Na Figura 8A também estão indicados três crescentes em estágios diferentes de formação, antes de darem origem aos IV. As crescentes, os virossomos e os IV são preenchidos por um material de densidade uniforme, o viroplasma. O diâmetro dos IV mediu em torno de 350 nm, conforme descrito anteriormente (revisado por CONDIT *et al.*, 2006).

Após o processamento proteolítico de diversas proteínas do vírion, o IV sofre uma profunda alteração morfológica e dá origem ao IMV (vírus maduro intracelular), como pode ser visto na Figura 7B. A maior parte dos IMV é encontrada em aglomerados periféricos à fábrica viral (revisado por CONDIT *et al.*, 2006). Um aglomerado de IMV é mostrado na Figura 8B e o cerne bicôncavo é destacado em um dos IMV. Os IMV mediram cerca de 300 nm, o que também está de acordo com o descrito anteriormente, apesar das medições variarem conforme a técnica aplicada (revisado por CONDIT *et al.*, 2006).

Uma parte da progênie de IMV adquire duas membranas adicionais derivadas de cisternas trans-Golgi, formando os IEV, que são transportados até a superfície celular, onde a membrana mais externa se funde à membrana plasmática, liberando os EEV (vírus envelopado extracelular) no meio extracelular (revisado por MOSS, 2007). IEV e EEV foram visualizados como indicado nas Figuras 7C e 7D, respectivamente. Na Figura 8C, merecem destaque as duas unidades de membrana adicionais que caracterizam o IEV (revisado por CONDIT *et al.*, 2006).

As micrografias eletrônicas apresentadas aqui e na Figura 12 mostram artefatos da técnica, devido à precipitação de cristais de uranila durante a preparação das amostras para a microscopia eletrônica. Estes experimentos serão repetidos para a confirmação dos dados e obtenção de melhores imagens. Mesmo assim, decidiu-se apresentar as imagens obtidas, a despeito da baixa qualidade, para enriquecimento dos resultados apresentados e corroboração de dados obtidos através de outras metodologias.

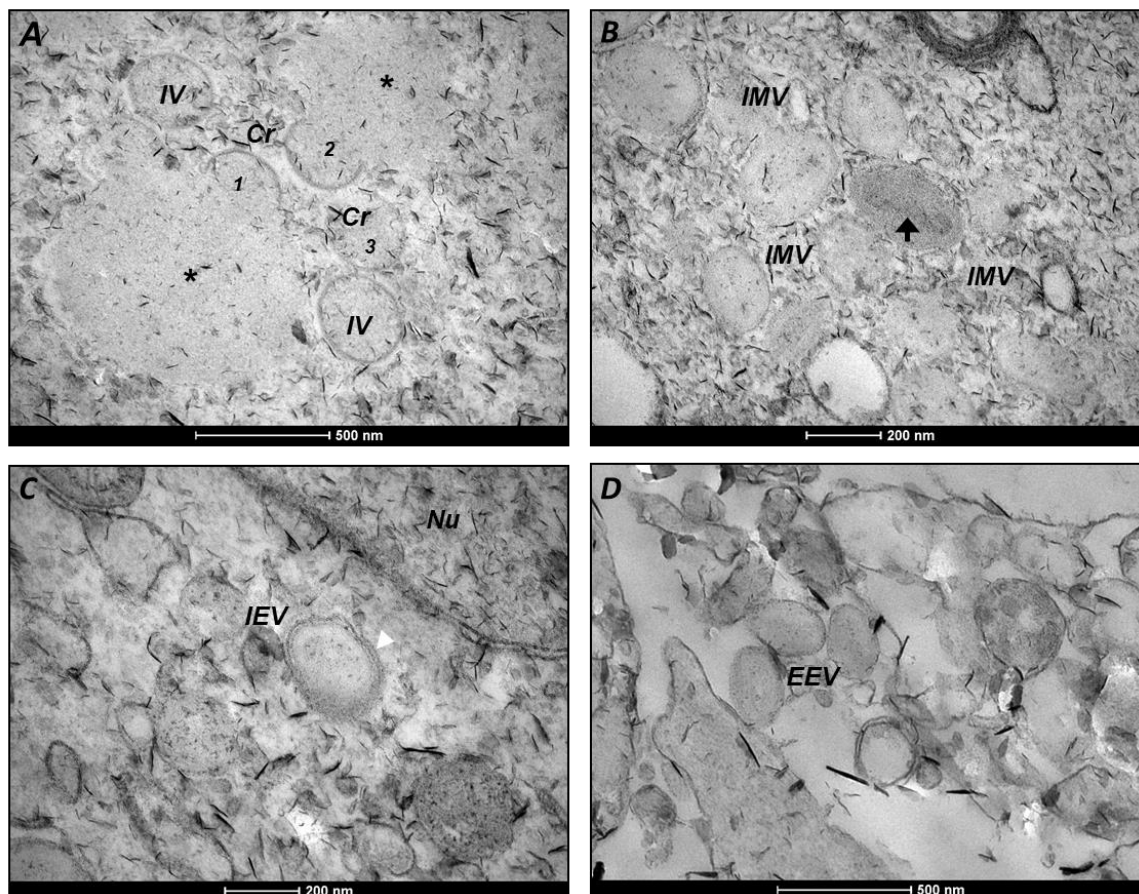


Figura 7. Microscopia eletrônica de transmissão mostrando a morfogênese do VBH em fibroblastos murinos.

Células A31 foram infectadas com VBH a MOI de 2. Após 18 h, as células foram lavadas com meio sem SFB, fixadas com glutaraldeído a 2,5% e processadas para microscopia eletrônica de transmissão.

A. Cr, crescente. IV, vírus imaturo. Os números 1, 2 e 3 indicam etapas subsequentes de formação das crescentes. Os asteriscos indicam os virossomos. **B.** IMV, vírus maduro intracelular. A seta aponta para o cerne bicôncavo de um IMV. **C.** IEV, vírus envelopado intracelular. Nu, núcleo. **D.** EEV, vírus envelopado extracelular.

2. O *Vaccinia Virus* Belo Horizonte Regula Temporamente a Ativação das Vias Sinalizadoras das MAPK ERK, JNK e p38, e de PI3K/Akt ao Longo da Infecção

Estudos prévios realizados pelo Grupo de Transdução mostraram que, durante a infecção, o VACV-WR regula temporalmente a ativação das vias sinalizadoras MEK/ERK, MKK/JNK e PI3K/Akt (DE MAGALHÃES *et al.*, 2001; ANDRADE *et al.*, 2004; SOARES *et al.*, 2009; PEREIRA *et al.*, submetido). Desta forma, decidiu-se verificar a ativação destas vias sinalizadoras durante a infecção pelo VBH, em comparação ao VACV-WR.

Conforme pode ser observado na Figura 8, as células infectadas pelo VBH apresentaram cinéticas de fosforilação das proteínas sinalizadoras analisadas comparáveis às células infectadas pelo VACV-WR. As MAPK ERK-1/2 e JNK-1/2 foram fosforiladas ao longo de toda infecção por ambos os vírus. ERK-1/2 apresentou níveis mais elevados de fosforilação em tempos precoces de infecção, a saber, 1, 3 e 6 hpi (Figura 8, Canaletas 1, 2, 3, 6, 7 e 8), antes de sofrer redução nos tempos tardios. A fosforilação de ERK-1/2 durante a infecção por ambos os vírus depende de MEK, pois o sinal foi abolido em presença de UO126 (dados não mostrados). Já JNK-1/2 apresentou níveis crescentes de fosforilação ao longo da infecção, atingindo o máximo em 24 hpi (Figura 8, Canaletas 5 e 10). Em relação à p38, foi possível observar sua fosforilação evidente em tempos tardios da infecção, isto é, em 12 hpi para o VBH e em 12 e 24 hpi, para o VACV-WR (Figura 8, Canaletas 4, e 9 e 10, respectivamente). Nos tempos precoces de infecção (1-3 hpi) também foi possível observar um aumento nos níveis de fosforilação de p38, quando comparados ao Mock (Figura 8, comparar Canaletas 1, 2 e 3, e 6, 7 e 8, com 11, 12 e 13).

Durante a infecção pelos *Orthopoxvirus* VACV e CPXV, a ativação de PI3K/Akt precocemente durante a infecção é crucial para a transmissão de sinais que regulam a replicação viral e a sobrevivência da célula hospedeira, antes que as proteínas antiapoptóticas virais sejam sintetizadas (SOARES *et al.*, 2009). Durante a infecção pelo VBH, Akt foi fosforilada na Ser473 em momentos precoces da infecção (3 hpi, Figura 8, Canaleta 2). Durante a infecção pelo VACV-WR, também se observou a ativação de Akt em momentos

precoces da infecção, com o máximo em 6hpi (Figura 8, Canaletas 7 e 8). Assim como para o VACV-WR, a fosforilação de Akt (Ser473) durante a infecção pelo VBH foi dependente de PI3K, pois o sinal foi abolido quando a infecção foi realizada em presença de LY294002 (dados não mostrados).

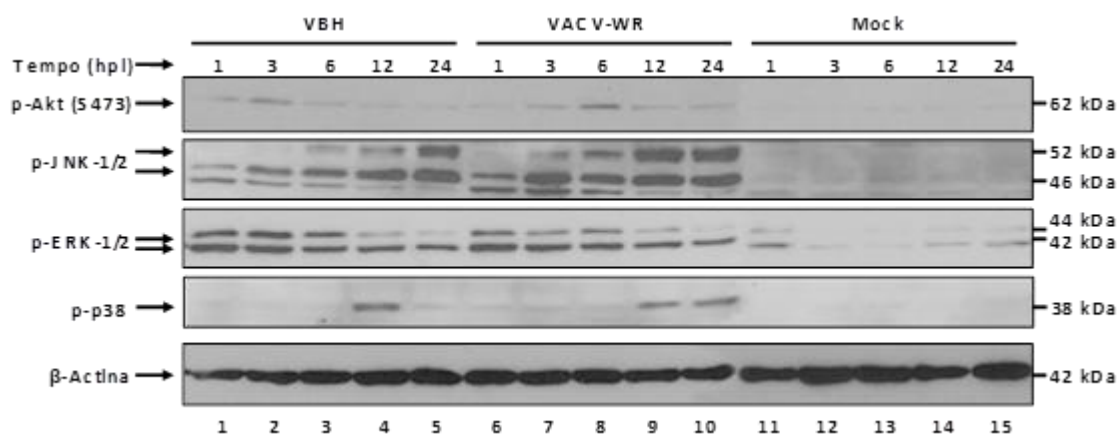


Figura 8. A ativação das MAPK ERK, JNK e p38, e da serina-treonina quinase Akt é temporalmente regulada de modos similares durante a infecção pelo VBH e pelo VACV-WR.

Extratos proteicos totais (30 ou 60 µg) de células A31 infectadas ou não pelo VBH ou VACV-WR a MOI de 10, em diferentes tempos, foram submetidos a fracionamento eletroforético seguida de transferência para membrana de nitrocelulose. Após bloqueio de sítios inespecíficos, as membranas foram incubadas com anticorpo primário (diluição 1:1000), seguido de incubação com anticorpo secundário conjugado à peroxidase (diluição 1:3000) e revelação. O controle interno das quantidades de proteínas foi feito pelo uso do anticorpo primário anti-β-actina (diluição 1:3000). As massas moleculares das proteínas são indicadas na direita da figura. Estes resultados foram repetidos pelo menos duas vezes.

3. Efeito da Inibição Farmacológica de Vias Sinalizadoras Celulares Sobre a Multiplicação do *Vaccinia Virus* Belo Horizonte

Estudos do Grupo de Transdução do Sinal e de outros grupos de pesquisa evidenciaram o importante papel que a ativação de diferentes vias sinalizadoras celulares desempenha durante a infecção pelo VACV, interferindo nas mais diferentes etapas do ciclo de multiplicação viral, tais como sobrevivência da célula hospedeira, geração e liberação da progênie, alteração do citoesqueleto, dentre outras (DE MAGALHÃES *et al.*, 2001; ANDRADE *et al.*, 2004; NEWSOME *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2006; VALDERRAMA *et al.*, 2006; SOARES *et al.*, 2009; PEREIRA *et al.*, submetido).

Diante disso, testou-se a habilidade de diferentes inibidores de vias sinalizadoras celulares em afetar a multiplicação do VBH em comparação ao VACV-WR. A Tabela 3 apresenta estes inibidores, seus alvos celulares e as concentrações utilizadas para cada um, bem como os resultados obtidos.

A primeira via sinalizadora analisada foi PI3K/Akt/mTOR. O inibidor de PI3K, LY294002, inibiu a multiplicação do VBH em 54%, aproximadamente duas vezes menos que o efeito sobre a multiplicação do VACV-WR, que foi inibida em 75%. Rapamicina, inibidor de mTORC-1, também inibiu menos a multiplicação do VBH quando comparada ao VACV-WR (32% *versus* 53%, respectivamente). Entretanto, estes níveis de inibição apresentados pela rapamicina não são considerados significativos pela maioria dos estudos em virologia, que normalmente aceitam valores inibição próximos ou superiores a 90%, no mínimo (*e.g.* LOCKER *et al.*, 2000; ANDRADE *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2006; DUNN *et al.*, 2009; SOARES *et al.*, 2009; ZABOROWSKA & WALSH, 2009). Já o inibidor de Akt, Akt inhibitor IV diminuiu significativamente a multiplicação tanto do VBH, quanto do VACV-WR em cerca de 90%.

A seguir, foram testados inibidores das MAPK JNK, ERK e p38. Os dois inibidores de JNK testados, SP600125 e JNK inhibitor VIII, apresentaram resultados discrepantes. Ao passo que SP600125 inibiu significativamente a multiplicação do VBH e do VACV-WR em quase 99%, JNK inhibitor VIII reduziu a multiplicação de ambos os vírus apenas pela metade (Tabela 3). O inibidor de MEK, MAP2K responsável pela ativação de ERK, UO126, inibiu a multiplicação do VBH em apenas 25% quando comparada à inibição de 81%

sobre a multiplicação do VACV-WR (Tabela 3). Já com o inibidor de p38- α/β , SB202190, observou-se o contrário. A multiplicação do VBH foi reduzida em 91% em presença de SB202190, enquanto a multiplicação do VACV-WR foi afetada em apenas 29% (Tabela 3).

Proteínas tirosina quinases são importantes componentes de diversas vias sinalizadoras celulares e são sabidamente requeridas durante a infecção pelo VACV (ANDRADE *et al.*, 2004; RAHBAR *et al.*, 2006; NEWSOME *et al.*, 2006). Desta forma, testou-se um inibidor inespecífico de proteínas tirosinas quinases, a genisteína. A infecção em presença de genisteína acarretou em redução de cerca de 90% na progênie tanto do VBH quanto do VACV-WR.

Diversos receptores, quando ativados por estímulos extracelulares, transmitem o sinal para dentro da célula através da proteína G ou GTPase trimérica. Sendo assim, testamos o efeito da toxina pertussis (PTX), um inibidor de GPCR (receptores acoplados à proteína G), sobre a multiplicação do VBH e do VACV-WR. Como mostrado na Tabela 3, PTX não afetou significativamente a multiplicação do VBH e ocasionou um aumento na progênie do VACV-WR. Entretanto, este experimento necessita ser confirmado.

Tabela 3. Efeito de inibidores farmacológicos de vias sinalizadoras celulares sobre a multiplicação do VBH, em comparação ao VACV-WR.

Composto	Alvo	Concentração do Composto (μM)	Inibição da Multiplicação Viral ^a	
			VBH	VACV-WR
LY294002	PI3K	20	54%*	75%***
Akt inibitor IV	Akt	15	94%***	89%***
Rapamicina	mTORC-1	0,05	32%*	53%*
SP600125	JNK	40	98%***	97%***
JNK inibitor VIII	JNK	4	46%**	50%*
UO126	MEK	15	25%	81%**
SB202190	p38- α/β	20	91%***	29%
Genisteína	PTK	100	89%***	91%***
Toxina Pertussis	GPCR	0,005 ^b	9%	-57%

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; ^aOs valores de inibição são expressos como a razão entre a diferença dos títulos virais na presença e na ausência do inibidor sobre os títulos virais na ausência do inibidor, multiplicada por 100; ^b500 ng/mL.

Células A31 pré-tratadas por 30 min com os inibidores farmacológicos nas concentrações indicadas foram infectadas pelo VBH ou VACV-WR, a MOI de 10, em presença do inibidor durante toda a infecção. Após 24 h, as células mais o meio foram congelados e descongelados três vezes e os sobrenadantes clarificados contendo as partículas virais foram titulados em células BSC-40. Estes resultados foram repetidos pelo menos duas vezes, exceto com a toxina pertussis.

4. A Geração da Progênie e a Liberação de Vírus Envelopados Extracelulares Não São Afetadas em Células *jnk-1/2*^{-/-} Infectadas pelo *Vaccinia Virus* Belo Horizonte

Pereira e colaboradores mostraram que ocorre um aumento na liberação de EEV em células deficientes em JNK-1/2 infectadas com VACV-WR sem, contudo, haver alteração na progênie de IMV (PEREIRA *et al.*, submetido).

De modo semelhante ao VACV-WR, a multiplicação do VBH não foi afetada em células *jnk-1/2*^{-/-} (Figura 9A). Entretanto, a concentração de EEV no sobrenadante de células *jnk-1/2*^{-/-} infectadas com o VBH foi comparável à do sobrenadante de células WT, ao passo que houve um aumento de cerca de 1log₁₀ no número de EEV no sobrenadante de células *jnk-1/2*^{-/-} infectadas com o VACV-WR, conforme observado anteriormente (Figura 9B; PEREIRA *et al.*, submetido).

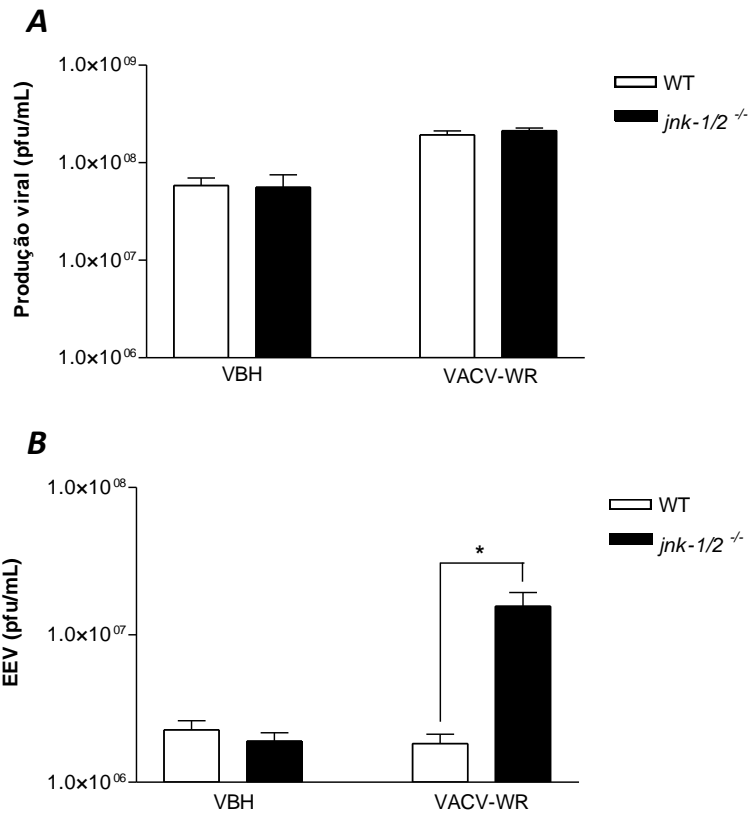


Figura 9. A liberação de EEV não é afetada em células *jnk-1/2*^{-/-} infectadas pelo VBH.

MEF WT e *jnk-1/2*^{-/-} foram infectados pelo VBH ou VACV-WR a MOI de 10, em duplicata. Numa réplica, as células mais o meio foram congelados e descongelados três vezes e os sobrenadantes clarificados foram titulados em células BSC-40. Na outra réplica, os sobrenadantes foram coletados, clarificados e submetidos à soroneutralização com soro de coelho anti-IMV. Após soroneutralização, os EEV foram titulados em células BSC-40 **A**. Produção viral total. **B**. EEV. Esses experimentos foram repetidos duas vezes.

*P<0,05

5. A Multiplicação do *Vaccinia Virus* Belo Horizonte assim como o Acúmulo de Proteínas Virais Tardias São Retardados em Presença do Inibidor de PI3K, LY294002

A via PI3K/Akt desempenha um papel crucial durante infecção pelos *Orthopoxvirus* VACV e CPXV, e a inibição farmacológica e genética da mesma leva ao bloqueio ou intensa inibição da síntese de proteínas virais tardias, bem como ao bloqueio da morfogênese no estágio de IV (SOARES *et al.*, 2009). Frente ao fato do VBH ser cerca de duas vezes menos sensível à inibição de PI3K (Tabela 3), decidiu-se investigar os efeitos de LY294002 em outras etapas do ciclo de multiplicação do VBH.

Ao analisar a curva de crescimento em ciclo único do VBH em presença de LY294002 (Figura 10), percebe-se uma inibição da multiplicação viral no tempo de 6 hpi ($>1 \log_{10}$) quando comparado ao mesmo período de infecção na ausência de LY294002. Esta diferença diminuiu no tempo de 12 hpi, sendo que, nos tempos seguintes, a multiplicação do VBH em ambas as condições apresentou valores semelhantes. Portanto, o crescimento do VBH parece ser retardado quando PI3K é inibida. O mesmo não é observado durante a infecção pelo VACV-WR e pelo CPXV em presença de LY294002, onde a inibição de cerca de $1 \log_{10}$ permanece ao longo de todo o ciclo de multiplicação (SOARES *et al.*, 2009).

Em relação ao acúmulo de proteínas virais tardias, LY294002 inibiu apenas parcialmente o acúmulo das proteínas H3, F18 e D8 do VBH quando comparado ao VACV-WR (Figura 11). Durante a infecção pelo VACV-WR, LY294002 foi capaz de suprimir a síntese das proteínas H3 e F18 e de inibir sensivelmente a síntese da proteína D8, ao passo que durante a infecção pelo VBH em presença de LY294002, os níveis destas proteínas nos tempos de 24 e 36 hpi foram comparáveis aos níveis da infecção pelo VBH sem inibidor (Figura 11). O acúmulo da proteína precoce B13 foi ligeiramente inibido durante a infecção por ambos os vírus em presença de LY294002 e apresentou uma cinética de acúmulo retardada quando comparado à infecção na ausência de LY294002 (dados não mostrados).

E, finalmente, diferente do observado por Soares *et al.* (2009) para VACV-WR, LY294002 não bloqueou a morfogênese do VBH no estágio de IV.

Como indicado na Figura 12, IMV foram encontrados no citoplasma de células infectadas pelo VBH, tanto na ausência, como na presença de LY294002.

Analisados em conjunto, estes dados sugerem que o VBH, diferentemente do VACV-WR, não requer a via PI3K/Akt funcional para a sua multiplicação em fibroblastos de camundongo, apesar da ativação da mesma precocemente durante a infecção (Figura 8).

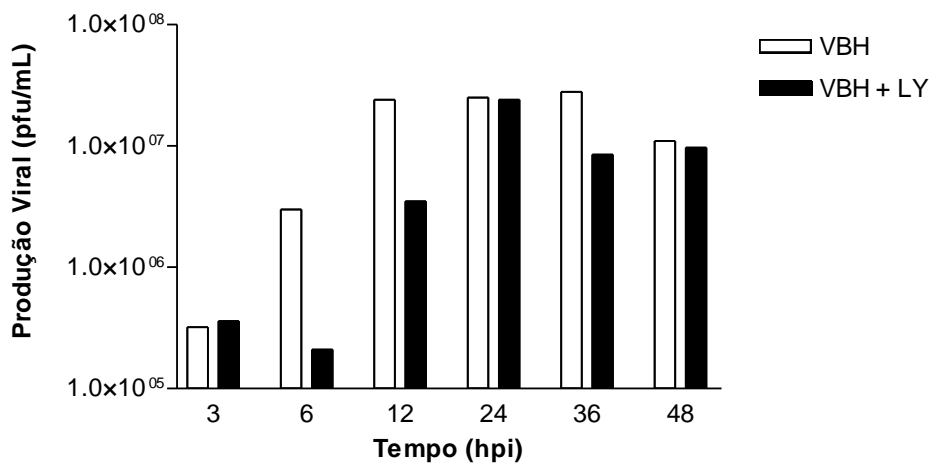


Figura 10. Curva de crescimento em ciclo único do VBH em presença de LY294002, inibidor de PI3K.

Células A31 pré-tratadas ou não com LY294002 por 30min foram infectadas com VBH a MOI de 10. Após diferentes tempos de infecção, as células mais o meio foram congeladas e descongeladas três vezes e os sobrenadantes clarificados foram titulados em células BSC-40. Esses resultados foram observados duas vezes.

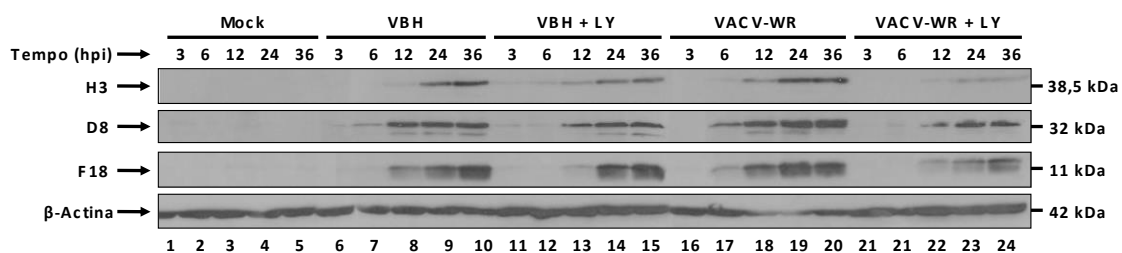


Figura 11. O acúmulo das proteínas tardias do VBH é retardado em presença de LY294002, inibidor de PI3K.

Extratos proteicos totais (30 µg) de células A31 infectadas com VBH ou VACV-WR (MOI 10), em ausência ou presença de LY294002, em diferentes tempos, foram submetidos a fracionamento eletroforético seguido de transferência para membrana de nitrocelulose. Após bloqueio de sítios inespecíficos, as membranas foram incubadas com anticorpo primário (diluição 1:1000), seguido de incubação com anticorpo secundário conjugado à peroxidase (diluição 1:3000) e revelação. O controle interno das quantidades de proteínas foi feito pelo uso do anticorpo primário anti-β-actina (diluição 1:3000). As massas moleculares das proteínas são indicadas na direita da figura. Esses resultados foram observados duas vezes.

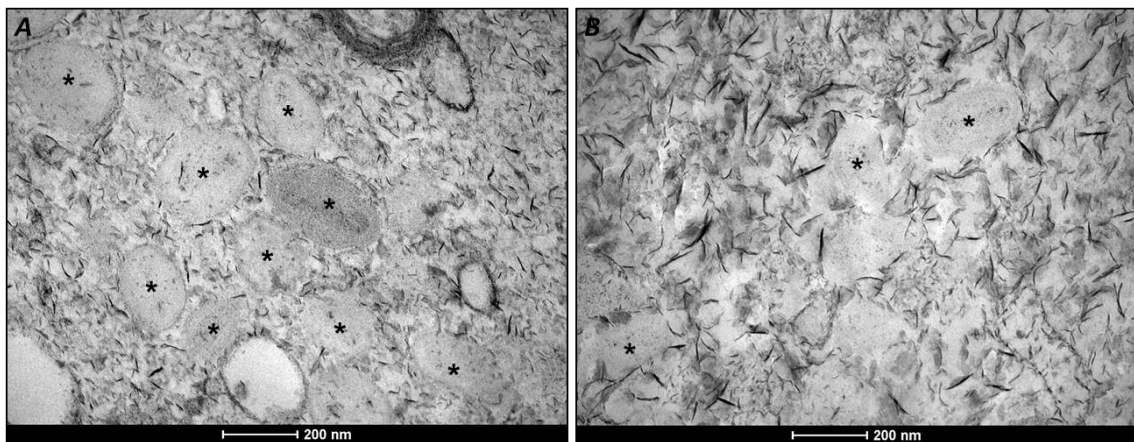


Figura 12. Morfogênese do VBH não é afetada por LY294002.

Células A31, pré-tratadas ou não com LY294002, foram infectadas com VBH a MOI de 2. Após 18 h, as células foram lavadas com meio sem SFB, fixadas com glutaraldeído a 2,5% e processadas para microscopia eletrônica de transmissão. **A.** Células não tratadas e infectadas com VBH. **B.** Células tratadas com LY294002 e infectadas com VBH. Os asteriscos indicam IMV.

6. Apoptose É Desencadeada durante a Infecção pelo *Vaccinia virus* Belo Horizonte

Além do seu papel exercido durante a replicação do VACV-WR e do CPXV, a ativação precoce de PI3K/Akt durante a infecção desencadeia sinais antiapoptóticos requeridos para a sobrevivência da célula hospedeira. Sendo assim, durante a infecção pelo VACV-WR e pelo CPXV em presença de LY294002, ocorre a ativação de caspase-3 e clivagem de PARP, dois indicadores de apoptose (SOARES *et al.*, 2009; Figura 13, Canaletas 24 e 25).

Durante a infecção pelo VBH foi possível observar a ativação de caspase-3 e clivagem de PARP nos tempos de 12 e 24 hpi, independentemente da inibição de PI3K (Figura 13, Canaletas 11 e 12). Contudo, quando a infecção pelo VBH foi realizada em presença de LY294002, a ativação de caspase-3 e clivagem de PARP foram aumentadas e atingiram níveis comparáveis aos encontrados durante a infecção pelo VACV-WR em presença de LY294002 (Figura 13, comparar Canaletas 15 e 24). Como observado anteriormente, não foi detectada ativação de caspase-3 nem clivagem de PARP durante a infecção pelo VACV-WR na ausência de LY294002 (SOARES *et al.*, 2009; Figura 13).

A fim de avaliar se a ocorrência de apoptose durante a infecção pelo VBH desempenharia algum papel na sua multiplicação, realizou-se a infecção na ausência e na presença de zVAD.fmk, inibidor farmacológico geral de caspases. Como pode ser observado na Figura 14, zVAD.fmk não inibiu significativamente a multiplicação tanto do VBH quanto do VACV-WR (inibição de 22% *versus* 41%, respectivamente).

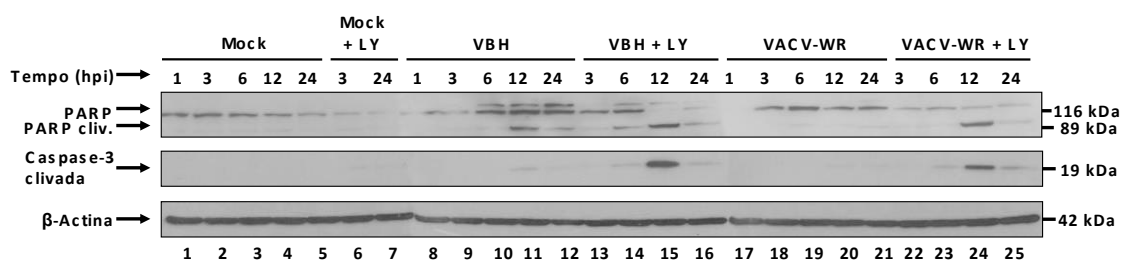


Figura 13. Apoptose é desencadeada durante a infecção pelo VBH.

Extratos proteicos totais (30 µg) de células A31 infectadas com VBH ou VACV-WR (MOI 10), em ausência ou presença de LY294002, em diferentes tempos, foram submetidos a fracionamento eletroforético seguido de transferência para membrana de nitrocelulose. Após bloqueio de sítios inespecíficos, as membranas foram incubadas com anticorpo primário (diluição 1:1000), seguido de incubação com anticorpo secundário conjugado à peroxidase (diluição 1:3000) e revelação. O controle interno das quantidades de proteínas foi feito pelo uso do anticorpo primário anti-β-actina (diluição 1:3000). As massas moleculares das proteínas são indicadas na direita da figura. Esses experimentos foram repetidos pelo menos duas vezes.

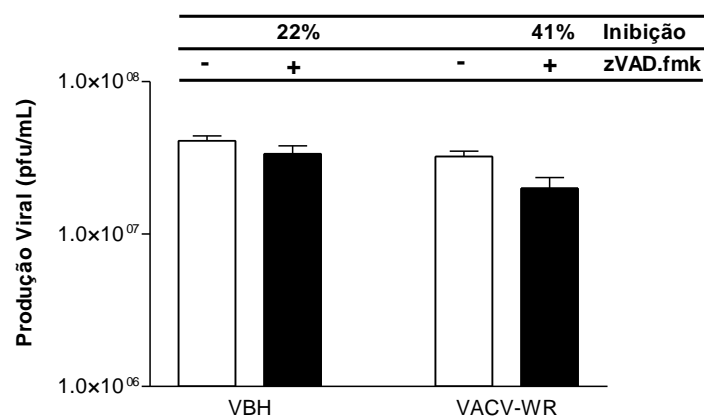


Figura 14. Efeito da inibição de caspases, por zVAD.fmk, sobre a multiplicação do VBH e do VACV-WR.

Células A31 pré-tratadas por 30 min com o inibidor de caspases, zVAD.fmk, a 40µM foram infectadas pelo VBH ou VACV-WR, a MOI de 10, em presença do inibidor durante toda a infecção. Após 24 h, as células mais o meio foram congelados e descongelados três vezes e os sobrenadantes clarificados contendo as partículas virais foram titulados em células BSC-40. Esses experimentos foram repetidos duas vezes.

7. Caracterização dos Genes B13R, F1L E N1L do *Vaccinia Virus* Belo Horizonte

Supôs-se que a apoptose durante a infecção pelo VBH ocorreria devido à deficiência em algum produto gênico relacionado à evasão da apoptose conforme descrito para mutantes de VACV-WR ou VACV-COP (amostra Copenhague) com os genes B13R, E3L, F1L e N1L deletados (DOBBELSTEIN & SHENK, 1996; KWON & RICH, 2005; WASILENKO *et al.*, 2005; COORAY *et al.*, 2007). Drumond *et al.* mostrou que o VBH não apresentou diferenças significativas, em relação ao VACV-WR, nas sequências de sete dos dez genes relacionados à virulência e espectro de hospedeiro sequenciados, isto é, A56R, B8R, B18R, C6L, C7L, E3L, K1L, K2L e K3L. Destes, apenas A56R, B18R e K2L apresentaram substituições de aminoácidos pontuais (DRUMOND *et al.*, 2008). Entretanto, até o momento da redação desta dissertação, nenhum destes genes foram implicados na inibição da apoptose durante a infecção pelo VACV.

A fim de obter as sequências de outros genes do VBH que poderiam estar relacionados à ocorrência de apoptose durante a infecção, escolheu-se sequenciar as ORF dos genes B13R, F1L e N1L, cujo papel na inibição da apoptose havia sido caracterizado para o VACV-WR ou VACV-COP em estudos anteriores (DOBBELSTEIN & SHENK, 1996; WASILENKO *et al.*, 2005; COORAY *et al.*, 2007).

Após amplificação por PCR, usando iniciadores desenhados com base no genoma do VACV-WR, os produtos de PCR apresentaram o tamanho previsto quando se utilizou o DNA do VBH como molde, em comparação ao DNA do VACV-WR (dados não mostrados, Tabela 2). Isto indica que o genoma do VBH possui regiões similares aos iniciadores feitos para os genes B13R, F1L e N1L do VACV-WR. Após sequenciamento destes produtos de PCR obtidos, pode se observar que B13R, F1L e N1L não apresentaram polimorfismos, tanto na sequência de nucleotídeos (dados não mostrados), como na sequência de aminoácidos (Figura 15). Para efeito de comparação, foram incluídas as sequências dos genes F1L e N1L do CTGV, outra amostra brasileira de VACV. A sequência de B13R do CTGV não foi incluída no alinhamento porque ela codifica para um produto não funcional devido a mutações que alteram a fase de leitura da ORF.

A	VACV-WR	MDIFREIASS	MKGENVFISP	ASISSVLTLI	YYGANGSTAE	QLSKYVEKEE	NMDKVS AQNI	
	VBH	
	VACV-WR	SFKSINKVYG	RYSAVFKDSF	LRKIGDKFQT	VDFTDCRTID	AINKCVDIFT	EGKINPLLDE	
	VBH	
	VACV-WR	PLSPDTCLLA	ISAVYFKAKW	LTPFEKEFTS	DYPFYVSPTE	MVDVSMMSMY	GKAFNHASVK	
	VBH	
VACV-WR	ESFGNFSIIE	LPYVGDTSMM	VILPKIDGL	ESIEQNLTDT	NFKKWCNSLE	ATFIDVHIPK		
VBH		
VACV-WR	FKVTGSYNLV	DTLVKSGLTE	VFGSTGDYSN	MCNSDVS VDA	MIHKTYIDVN	E EYTEAAAAT		
VBH		
VACV-WR	CALVSDCAST	ITNEFCVDHP	FIYVIRHVDG	KILFVGRYCS	PTTNC*			
VBH			
B	VACV-WR	MLSMFMCNNI	VDYVDDIDNG	IVQDIEDEAS	NNVDHDYVYP	LPENMVYRFD	KSTNILDYLS	
	VBH	
	CTGV	
					BH3			
	VACV-WR	TERDHVMAV	RYYMSKQRLD	DLYRQLPTKT	RSYIDIINIY	CDKVSNDYNR	DMNIMYDMAS	
	VBH	
	CTGVN...	N.....	
				BH1				
	VACV-WR	TKSFTVYDIN	NEVNTILMDN	KGLGVRLATI	SFITELGRRC	MNPVETIKMF	TLLSHTICDD	
	VBH	
	CTGVK.....K.....	
		BH2						
VACV-WR	YFVDYITDIS	PPDNTIPNTS	TREYLKLI	TAIMFATYKT	LKYMIG*			
VBH			
CTGV	C..N.....C.....			
C	VACV-WR	MRTLLIRYIL	WRNDNDQTY	NDDFKKLMLL	DELVDDGDVC	TLIKMRMTL	SDGPLLDRLN	
	VBH	
	CTGV	
	VACV-WR	QPVNNIEDAK	RMIAISAKVA	RDIGERSEIR	WEESFTILFR	MIETYFDDL	IDLYGEK*	
	VBH	
	CTGV	

Figura 15. Os genes B13R, F1L e N1L do VBH não apresentam polimorfismos quando comparado ao VACV-WR.

Após amplificação por PCR com iniciadores desenhados com base no genoma do VACV-WR, os fragmentos obtidos utilizando o DNA do VBH como molde foram purificados e submetidos a seqüenciamento direto. Os alinhamentos apresentados mostram as seqüências dos genes B13R (**A**), F1L (**B**) e N1L (**C**) do VBH, do VACV-WR (Número de acesso no Genbank: AY243312) e do CTGV (número de acesso no Genbank: EF488960, EF488962). BH – domínio de similaridade à Bcl-2.

8. Expressão de Citocinas em Macrófagos Infectados pelos *Vaccinia Virus* Belo Horizonte e Western Reserve

Decidiu-se verificar também se a ocorrência de apoptose durante a infecção pelo VBH poderia estar relacionada à resposta da célula hospedeira à infecção. Porém, como fibroblastos não produzem citocinas em grandes quantidades, escolheu-se como modelo a infecção de macrófagos de camundongo, isto é, cultivo primário de macrófagos intraperitoniais (MΦ) e a linhagem RAW 264.7 de macrófagos transformados.

Primeiramente, avaliou-se a permissividade dos MΦ e das células RAW à multiplicação do VBH e do VACV-WR. Como mostrado na Figura 16, tanto MΦ quanto as células RAW foram permissivas à multiplicação de ambos os vírus. A multiplicação viral foi maior, para ambos os vírus, nas células RAW que nos MΦ. O VBH aumentou a sua progênie em sete vezes nos MΦ e 14 vezes nas células RAW, ao passo que o VACV-WR aumentou a sua progênie em seis vezes nos MΦ e 40 vezes nas células RAW. É importante salientar que multiplicação do VBH foi ligeiramente adiantada à do VACV-WR no tempo de 12 hpi nos MΦ e nos tempos de 3 e 12 hpi nas células RAW, atingindo valores semelhantes nos tempos finais de infecção (24 e 30 ou 48 hpi) (Figura 16).

A infecção dos MΦ pelo VACV-WR induziu elevados níveis de acúmulo do mRNA das citocinas IFN-β, TNF-α, IL-4, IL-6 e IL-10, principalmente nos tempos de 3 e 12 hpi, antes de declinar em 24 hpi (Figura 17A-E). Já a infecção pelo VBH induziu níveis de acúmulo de mRNA destas citocinas, exceto para IL-4, cerca 2 log₁₀ menores que os observados para VACV-WR nos tempos de 3 e 12 hpi (Figura 17A-E). Esta diferença foi observada para a citocina IL-4 apenas no tempo de 12 hpi (Figura 17B). No tempo de 24 hpi, os níveis de mRNA das citocinas diminuíram e foram semelhantes entre os dois vírus (Figura 17A-E).

Durante a infecção de células RAW pelo VBH e pelo VACV-WR, o acúmulo de mRNA da citocina IL-6 apresentou níveis semelhantes (Figura 17F). Entretanto, vale destacar que o acúmulo de mRNA foi crescente ao longo do tempo, diferentemente do observado com os MΦ. Os níveis de mRNA de IL-6 induzido pela infecção por ambos os vírus também foram cerca de 2 log₁₀ menores que os induzidos nos MΦ.

Os experimentos de infecção de macrófagos ora apresentados foram realizados apenas uma vez, devido à limitação de tempo. Os mesmos ajudaram a interpretar os resultados obtidos anteriormente com a infecção de fibroblastos com o VBH e, por isso, foram incluídos nesta dissertação.

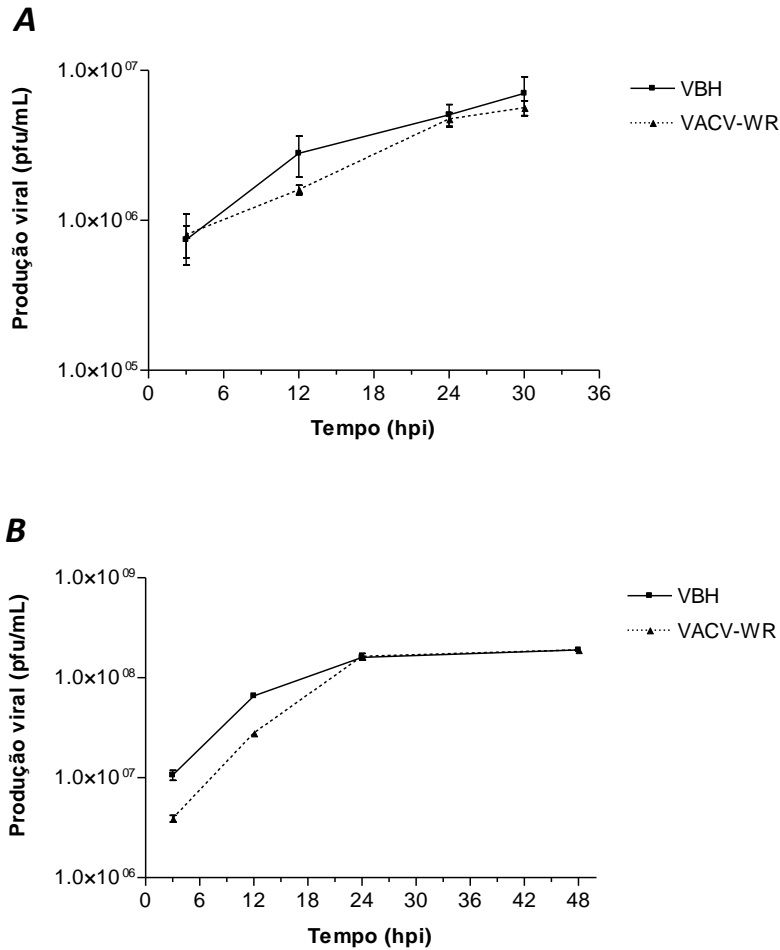


Figura 16. Multiplicação do VBH e do VACV-WR em macrófagos de camundongo.

Macrófagos intraperitoneais de camundongos induzidos por tioglicolato (**A**) ou células RAW 264.7 (**B**) foram infectadas com VBH a MOI de 10. Após diferentes tempos de infecção, as células mais o meio foram congeladas e descongeladas três vezes e os sobrenadantes clarificados foram titulados em células BSC-40. Este experimento foi realizado apenas uma vez.

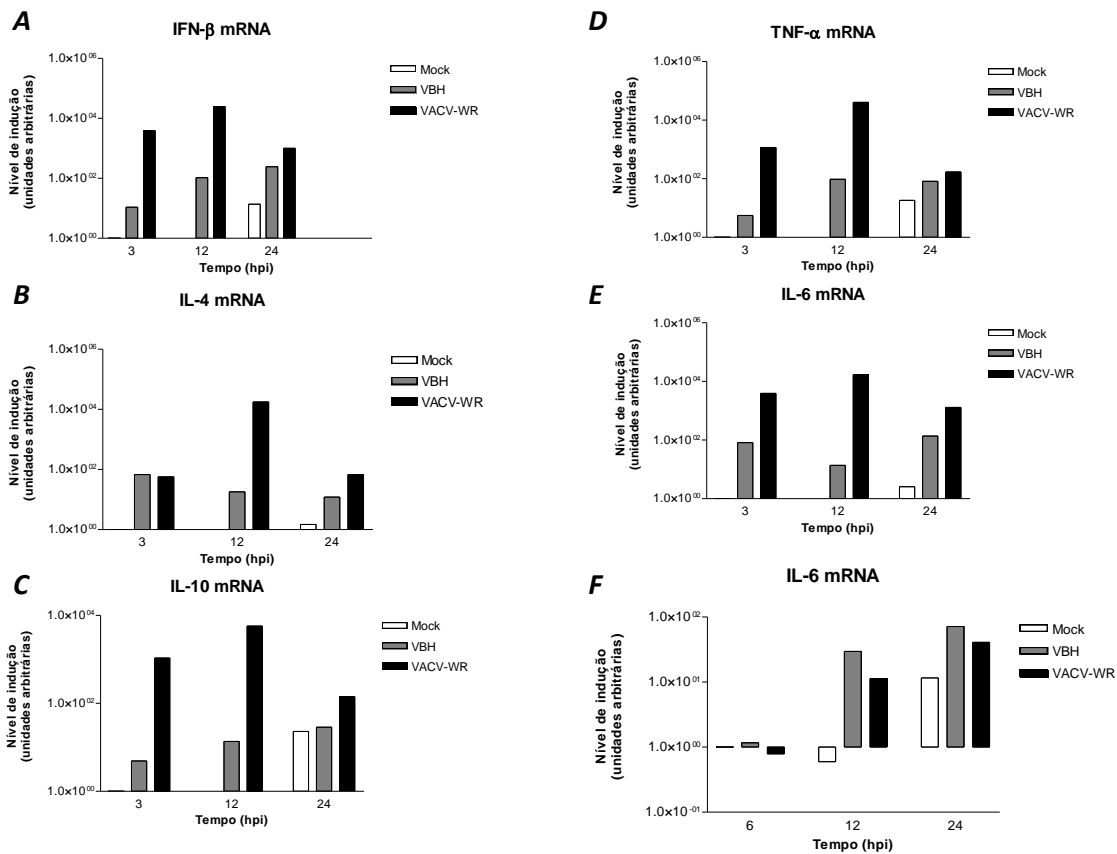


Figura 17. Expressão de mRNA de citocinas durante a infecção de macrófagos de camundongo pelo VBH ou pelo VACV-WR.

RNA total extraído de macrófagos intraperitoneais de camundongo (A, B, C, D, E) ou células RAW 264.7 (F) infectados pelo vbh ou pelo VACV-WR foram submetidos a transcrição reversa seguida de PCR em tempo real para a detecção dos níveis de expressão das citocinas IFN-β (A), IL-4 (B), IL-10 (C), TNF-α (D), IL-6 (E, F). Este experimento foi realizado apenas uma vez.

VI. DISCUSSÃO

Os vírus, como agentes infecciosos intracelulares obrigatórios, dependem da maquinaria biossintética da célula hospedeira para a sua multiplicação. Durante a infecção, os vírus precisam gerar eficientemente sua progênie e, ao mesmo tempo, evadir às respostas antivirais do hospedeiro a fim de garantir a disseminação dentro do organismo do hospedeiro e entre hospedeiros susceptíveis. Os poxvírus, dado o seu grande genoma, codificam diversas proteínas imunomoduladoras que cumprem apropriadamente este papel durante a infecção viral (revisado por JOHNSTON & MCFADDEN, 2003). Entretanto, apesar desta miríade de proteínas imunomoduladoras disposta pelos poxvírus, diversas vias sinalizadoras celulares são usurpadas ao longo da infecção para promover a replicação e disseminação virais (revisado por MCFADDEN, 2005 e MÜNTER *et al.*, 2006).

A maioria dos estudos realizados para compreender a biologia dos poxvírus, assim como a sua interação com o hospedeiro, é realizada com o protótipo da família *Poxviridae*, o *Vaccinia virus*, e mais especificamente com a amostra Western Reserve. O VACV-WR foi obtido através de sucessivas passagens da amostra vacinal NYCBH (New York City Board of Health) em cérebros de camundongos neonatos, o que o tornou altamente neurovirulento (BRONSON & PARKER, 1941). Não se sabe, entretanto, o quanto que este caráter “artificial” do VACV-WR pode levar interpretações equivocadas, especialmente em aspectos da interação vírus-hospedeiro. Desta forma, a disponibilidade no Laboratório de Vírus de diferentes amostras de VACV isoladas a partir de infecções naturais por VACV em diferentes hospedeiros (roedores, bovinos e humanos) constitui uma importante ferramenta no estudo de diferentes aspectos da biologia do VACV e da sua interação com o hospedeiro.

Assim, o objetivo deste trabalho foi realizar uma análise detalhada do possível envolvimento de algumas vias sinalizadoras celulares durante a infecção pelo VBH, uma amostra brasileira de VACV, em comparação ao VACV-WR. Estudos prévios realizados pelo Grupo de Transdução do Sinal caracterizaram a relevância biológica das vias MEK/ERK, MKK/JNK e PI3K/Akt durante a infecção pelo VACV-WR. Os sinais transmitidos por estas vias

mostraram desempenhar diferentes papéis durante a infecção, desde a geração e disseminação da progênie até a regulação da sobrevivência da célula hospedeira (ANDRADE *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2006; SOARES *et al.*, 2009; PEREIRA *et al.*, submetido).

Primeiramente, a fim de complementar os estudos prévios de caracterização do VBH, tanto através de análises genéticas (TRINDADE *et al.*, 2004; MOTA, 2006; DRUMOND *et al.*, 2008) como de virulência *in vivo* (FERREIRA *et al.*, 2008), realizou-se a análise de células infectadas com VBH por microscopia eletrônica de transmissão. Os resultados preliminares mostrados na Figura 7A-D indicam que todas as etapas da morfogênese do VBH são compatíveis com aquelas de um *Orthopoxvirus*. Ou seja, detectou-se a presença de virossomos dos quais brotam crescentes (Figura 7A), que se fecham formando estruturas esféricas, denominadas IV (Figura 7A). Os IV, após um profundo processo morfogenético, dão origem aos IMV (Figura 7B). Alguns IMV são direcionados até o trans-Golgi, onde adquirem duas camadas de membranas celulares, formando os IEV (Figura 7C), que são transportados até a superfície celular, onde a camada membranososa mais externa se funde à membrana plasmática liberando os EEV no meio extracelular (Figura 7D). A análise cuidadosa de micrografias eletrônicas do VBH pode contribuir para a melhor compreensão de alguns aspectos da morfogênese dos poxvírus que ainda geram divergências entre os poxvirologistas (revisado por CONDIT *et al.*, 2006).

A seguir, caracterizou-se a ativação e o possível envolvimento das vias sinalizadoras MEK/ERK, JNK, p38 e PI3K/Akt durante a infecção pelo VBH, em comparação ao VACV-WR.

Estudos prévios do Grupo de Transdução do Sinal mostraram que, durante a infecção pelo VACV-WR ocorre a ativação precoce de um sinal mitogênico que leva à fosforilação das MAPK ERK, JNK e p38 (DE MAGALHÃES *et al.*, 2001). A ativação da via MEK/ERK foi parcialmente dependente de VGF (fator de crescimento do *Vaccinia*) e levou à ativação dos fatores de transcrição de resposta precoce ao crescimento c-Fos e EGR-1, que têm se mostrado importantes na regulação da liberação das formas envelopadas de VACV-WR (DE MAGALHÃES *et al.*, 2001; ANDRADE *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2006; OLIVEIRA, 2009; BRASIL, 2010). Durante a infecção

pelo VBH, a cinética de fosforilação de ERK-1/2 foi semelhante ao VACV-WR (de 1 a 24 hpi, com níveis mais elevados em 1-3 hpi, Figura 8). Entretanto, quando a infecção foi realizada em presença do inibidor farmacológico de MEK (UO126), a multiplicação do VBH foi afetada em apenas 25% quando comparada à redução de 81% observada para o VACV-WR (Tabela 3). Neste aspecto, o VBH foi mais semelhante ao CPXV, que apesar da ativação sustentada da via MEK/ERK durante infecção, não tem a multiplicação afetada em células expressando dominância negativa de MEK ou tratadas com PD98059, outro inibidor de MEK (SILVA *et al.*, 2006).

Estudo recente mostrou que a ativação da via VGF/MEK/ERK coopera com a proteína viral F1L na transmissão de sinais antiapoptóticos na célula infectada pelo VACV-WR (POSTIGO *et al.*, 2009), o que pode contribuir em parte para o efeito da inibição de MEK sobre a multiplicação do VACV-WR (ANDRADE *et al.*, 2004). Já outros autores mostraram que a proteína viral M2 interfere negativamente com a via MEK/ERK/NF- κ B como mecanismo de evasão a resposta inflamatória do hospedeiro à infecção pelo MVA (GEDEY *et al.*, 2006). Esse papel de MEK/ERK na resposta do hospedeiro à infecção pelo MVA pode ser específico dessa amostra que, diferente do VACV-WR, induz a ativação de NF- κ B durante a infecção. Isto pode ser devido ao fato do MVA ser uma amostra atenuada obtida após mais de 500 passagens do VACV Ankara em culturas primárias de fibroblastos embrionários de galinha (CEF), o que acarretou a perda de grandes porções do genoma (cerca de 30kb), principalmente em regiões codificadoras de proteínas relacionadas à interação com o hospedeiro (ANTOINE *et al.* 1998). Desta forma, é possível que o VBH compartilhe com o VACV-WR o mecanismo de ativação sustentada de MEK/ERK, apesar de não depender do seu papel promotor da multiplicação viral e antiapoptótico. Como o gene *vgf* do VBH é mais de 99% similar ao do VACV-WR (TRINDADE *et al.*, 2004), é possível que VGF contribua para a ativação de MEK/ERK durante a infecção.

Assim como para ERK-1/2, observou-se a fosforilação sustentada de JNK-1/2 durante a infecção pelo VBH e pelo VACV-WR (níveis crescentes de fosforilação ao longo da infecção, com máximo em 24 hpi, Figura 8). Pereira e colaboradores mostraram que a via sinalizadora MKK/JNK não é relevante para a replicação do VACV-WR, já que a progênie viral não é afetada em células

deficientes em MKK-4/7 ou JNK-1/2, ou em células tratadas com o inibidor JNK inibitor VIII (PEREIRA *et al.*, submetido). De modo semelhante, observou-se no trabalho ora apresentado, que a multiplicação do VBH não é afetada significativamente pelo inibidor JNK inibitor VIII (Tabela 3) ou em células *jnk-1/2^{-/-}* (Figura 9A).

Contudo, no mesmo estudo apresentado anteriormente, Pereira e colaboradores mostraram que apesar da formação de IMV não ser alterada em células deficientes em JNK-1/2, a liberação das formas envelopadas é alterada. Durante a infecção pelo VACV-WR, a via MKK/JNK regula positivamente a liberação de CEV e, negativamente, a liberação de EEV, através da modulação das alterações de citoesqueleto induzidas pelo vírus durante a infecção (PEREIRA *et al.*, submetido). Sendo assim, testou-se a liberação de EEV de células selvagens e deficientes em JNK-1/2 infectadas pelo VBH. Como mostrado na Figura 9B, o número de EEV no sobrenadante das células *jnk-1/2^{-/-}* é comparável ao das células WT infectadas pelo VBH, diferentemente do do VACV-WR, para o qual a liberação de EEV aumentou cerca de 1 log₁₀ nas células *jnk-1/2^{-/-}* (PEREIRA *et al.*, submetido). Essa representa mais uma diferença biológica entre VBH e VACV-WR e seria interessante investigá-la melhor, já que a liberação das formas envelopadas do VACV representa um dos melhores caracterizados exemplos de interação vírus-hospedeiro, sendo um processo finamente regulado por proteínas virais e celulares (revisado por MÜNTER *et al.*, 2006 e ROBERTS & SMITH, 2008).

Outro inibidor de JNK testado neste estudo foi SP600125. Entretanto, diferentemente do observado com a inibição farmacológica e genética de JNK apresentados anteriormente, SP600125 inibiu intensamente a multiplicação, tanto do VBH, quanto do VACV-WR em quase 2 log₁₀ (Tabela 3). Esses resultados corroboram os obtidos por estudo prévio realizado pelo Grupo de Transdução do Sinal, que mostrou que o SP600125 inibe a multiplicação do VACV-WR e CPXV mesmo em células deficientes em JNK-1/2, indicando o caráter inespecífico deste inibidor (PEREIRA *et al.*, submetido). O forte efeito inibitório do SP600125 sobre a multiplicação destes *Orthopoxvirus* levou à sugestão desse inibidor como antiviral potencial. O fato do SP600125 inibir a multiplicação do VBH, tanto quanto os outros vírus testados, vem a

reforçar essa ideia. Contudo, mais estudos são necessários para atestar a eficiência antiviral do SP600125 *in vivo* (em andamento) bem como para a identificação do alvo celular desse inibidor, que desempenharia papel tão crucial durante a infecção por todos estes *Orthopoxvirus*. O uso de inibidores de vias sinalizadoras como agentes antivirais já havia sido sugerido anteriormente para o tratamento de infecções pelo *Influenza virus*, cuja multiplicação é fortemente inibida por inibidores de MEK (PLESCHKA *et al.*, 2001; LUDWIG *et al.*, 2003).

A ativação da MAPK p38 durante a infecção pelo VBH e pelo VACV-WR também foi avaliada. MAPK p38 apresentou níveis elevados de fosforilação nos tempos tardios de infecção: 12 hpi para o VBH e 12-24 hpi para o VACV-WR (Figura 8). Entretanto, também foi possível observar níveis ligeiramente elevados de fosforilação de p38 nos tempos precoces de 1 a 6 hpi (Figura 8, comparar Canaletas 1, 2 e 3, e 6, 7 e 8 com 11, 12 e 13), durante a infecção por ambos os vírus, o que está de acordo com o observado previamente para o VACV-WR (DE MAGALHÃES *et al.*, 2001). Quando se realizou a infecção em presença do inibidor de p38- α/β , SB202190, a multiplicação do VBH foi reduzida em 91% ao passo que a do VACV-WR foi afetada em apenas 29% (Tabela 3). Esses dados indicam mais uma diferença entre VBH e VACV-WR e apontam para uma via sinalizadora celular, associada ao controle da resposta inflamatória e apoptose, a qual se revelou importante para a replicação do VBH.

Maloney e colaboradores implicaram a proteína A52 de VACV-WR na ativação de p38, através da interação com TRAF-6, importante componente na transmissão do sinal em resposta à ativação dos TLRs (MALONEY *et al.*, 2005). Contudo, a relevância funcional da ativação de p38 por A52 no contexto da infecção viral não foi avaliado. Hipoteticamente, é possível que durante a infecção A52 “filtre” o sinal em resposta à ativação dos TLRs, bloqueando a ativação de NF- κ B, mas permitindo a ativação de p38. Apesar do papel exato de A52, seu papel como fator de virulência é inquestionável, já que VACV-WR com o gene A52R deletado mostrou-se atenuado após a infecção intranasal de camundongos (HARTE *et al.*, 2003).

A ativação de p38 também foi descrita durante a infecção de células humanas pelo VACV-WR, a partir de 3 hpi (WALSH *et al.*, 2008). Esses autores

mostraram que um dos substratos de p38, MNK-1, é requerido para a multiplicação viral. MNK-1 fosforila o fator de iniciação da tradução eIF4E, levando à sua incorporação no complexo eIF4F, o que estimula a tradução da proteínas virais e, em consequência, aumenta a replicação viral (WALSH *et al.*, 2008). Entretanto, no presente estudo, p38 não foi requerida para a multiplicação do VACV-WR em células de camundongo, confirmando o que foi observado anteriormente (DE MAGALHÃES *et al.*, 2001).

Outros dois inibidores de proteínas sinalizadoras testados foram a genisteína, inibidor de proteínas tirosina quinases, e a toxina pertussis, inibidor de GPCR. Diante do fato de tirosina quinases estarem envolvidas em diferentes etapas da infecção pelos poxvírus, desde a penetração (LOCKER *et al.*, 2000; MASTERS *et al.*, 2001; RAHBAR *et al.*, 2006) até a liberação da progênie (NEWSOME *et al.* 2004; STANFORD *et al.*, 2007), não foi surpresa observar que a genisteína inibiu a multiplicação do VBH e do VACV-WR em cerca de 1 log₁₀ (Tabela 3; ANDRADE *et al.*, 2004). Já a toxina pertussis não inibiu a multiplicação do VBH e até causou aumento na multiplicação do VACV-WR (Tabela 3). Outros estudos já haviam mostrado que GPCRs parecem não ser requeridos durante a infecção pelo VACV-WR (LOCKER *et al.*, 2000; ANDRADE *et al.*, 2004).

Estudos do Grupo de Transdução do Sinal também mostraram que o VACV-WR e CPXV, mesmo dispondo de enorme arsenal de proteínas antiapoptóticas, requerem a ativação da via PI3K/Akt precocemente durante a infecção para a transmissão de sinais pró-sobrevivência da célula hospedeira (SOARES *et al.*, 2009). Em presença do inibidor de PI3K, LY294002, a multiplicação do VACV-WR e do CPXV é reduzida em cerca de 1 log₁₀. Essa redução é secundária à inibição ou bloqueio da síntese das proteínas virais tardias, bem como um bloqueio da morfogênese no estágio de IV (SOARES *et al.*, 2009). Em comparação ao VACV-WR, a multiplicação do VBH foi pouco afetada em presença do LY294002 (Tabela 3). Isso refletiu o menor efeito desse inibidor sobre a expressão das proteínas virais tardias, que alcançou níveis de acúmulo similares aos da infecção realizada na ausência de inibidor, nos tempos de 24 e 36 hpi (Figura 11, comparar Canaletas 9 e 10 com 15 e 14). LY294002 também não ocasionou o bloqueio da morfogênese observado para o VACV-WR, sendo que IMVs do VBH foram detectados tanto na

ausência como na presença do inibidor (Figura 12). Esses dados indicam que, diferentemente do VACV-WR, a ativação precoce da via PI3K/Akt (Figura 8) durante a infecção pelo VBH não é necessária para a multiplicação do mesmo. Esse achado é extremamente relevante, uma vez que essa via de sobrevivência/antiapoptótica revelou-se crucial para a biologia de vários vírus [e.g. HIV-1 (LINNEMANN *et al.*, 2002), CVB3 (ESFANDIAREI *et al.* 2004), *Dengue virus* (LEE *et al.*, 2005), *Influenza virus* (EHRHARDT *et al.*, 2007), *Rotavirus* (HALASZ *et al.*, 2008)].

A ativação precoce de PI3K/Akt durante a infecção pelo VBH e pelo VACV-WR (Figura 8), associada ao atraso observado na curva de crescimento em ciclo único do VBH em presença de LY294002 (Figura 10), bem como o atraso no acúmulo das proteínas virais precoces na presença do inibidor (dados não mostrados), aponta para um possível envolvimento desta via sinalizadora na penetração do VBH. O envolvimento de PI3K durante a penetração do VACV-WR por macropinocitose já foi relatado (MERCER & HELENIUS *et al.*, 2008). Nesse caso, a diferença observada nos tempos de 6 e 12 hi na curva diminuiu nos tempos seguintes provavelmente pelo fato dos poxvírus utilizarem mais de um mecanismo para penetrar na célula hospedeira (revisado por MOSS, 2006; HUANG *et al.*, 2008; MERCER & HELENIUS *et al.*, 2008). Essa hipótese, porém, necessita de confirmação experimental.

A fim de corroborar os dados obtidos com o inibidor de PI3K, testou-se também o efeito de um inibidor de Akt, Akt inibitor IV. Surpreendentemente, este inibidor afetou igualmente a multiplicação do VBH e do VACV-WR em cerca de 1 log₁₀ (Tabela 3), não corroborando os dados obtidos com LY294002. Entretanto, já há relato na literatura de que o Akt inibitor IV inibe a multiplicação de VACV-WR, VSV e RSV, independentemente da sua habilidade em inibir a atividade catalítica de Akt (DUNN *et al.*, 2009). Juntos, estes dados indicam que, à maneira de SP600125, o Akt inibitor IV esteja exercendo a sua atividade antiviral através da inibição de um alvo inespecífico, requerido para a multiplicação viral (DUNN *et al.*, 2009).

A via PI3K/Akt/mTOR controla a síntese proteica através da estimulação da formação dos complexos de iniciação da tradução. Quando fosforilado por mTOR, a proteína 4E-BP se desliga do fator de iniciação da tradução eIF4E, permitindo a sua montagem no complexo eIF4F e ativação da síntese proteica.

Apesar do complexo eIF4F estar envolvido na tradução das proteínas virais durante a infecção pelo VACV-WR (WALSH *et al.*, 2008), os dados obtidos neste trabalho mostram que a rapamicina, inibidor de mTOR, não inibiu significativamente a multiplicação tanto do VBH quanto do VACV-WR (inibição de 32% e 53%, respectivamente; Tabela 3). De fato, Zaborowska & Walsh mostraram que a formação dos complexos de iniciação da tradução em células infectadas pelo VACV-WR é insensível ao tratamento com rapamicina, mas dependente de PI3K, e que a multiplicação viral é inibida por LY294002 mas não por rapamicina (ZABOROWSKA & WALSH *et al.*, 2009). É possível, portanto, que sinais dependentes de PI3K e da MAPK p38 regulem a tradução em células infectadas pelo VACV-WR.

A inibição da apoptose durante a infecção pelos *Orthopoxvirus* VACV-WR e CPXV é um dos principais papéis da ativação precoce de PI3K/Akt (SOARES *et al.*, 2009). Como mostrado na Figura 13, durante a infecção pelo VBH e pelo VACV-WR em presença de LY294002, ocorreu intensa ativação de caspase-3 e clivagem de PARP, dois marcadores moleculares de apoptose, especialmente 12 hpi. Isso, claramente, evidencia o papel antiapoptótico de PI3K/Akt durante a infecção por ambos os vírus. Entretanto, independentemente da ocorrência de apoptose, o VBH se multiplica bem na célula hospedeira, provavelmente porque em 12 hpi a curva de crescimento já está alcançando a fase estacionária (Figura 10).

Curiosamente, durante a infecção pelo VBH na ausência de LY294002, ocorreu a ativação de caspase-3 e clivagem de PARP, ao contrário do que foi observado durante a infecção pelo VACV-WR (Figura 13, comparar Canaletas 11 e 12 com 20 e 21). Isso indica que a apoptose é desencadeada durante a infecção pelo VBH, independentemente da ativação de sinal precoce pró-sobrevivência via PI3K/Akt. Apesar dos baixos níveis de ativação de caspase-3 observados nos tempos de 12 e 24hpi da infecção pelo VBH, os níveis de PARP clivada são mais evidentes. Dados similares foram obtidos por outros autores, que verificaram a atividade de caspase-3, clivagem de PARP e fragmentação do DNA em decorrência da apoptose em tempos em que caspase-3 ativa não foi detectada por transferência Western (BOULARES *et al.*, 1999). Também não pode se descartar a hipótese de que a apoptose esteja ocorrendo num número reduzido de células, o que não acarretaria em efeito

significativo sobre a multiplicação viral, como observado para o VBH. A realização da infecção em presença do inibidor de caspases zVAD.fmk mostrou que multiplicação do VBH e do VACV-WR não foi significativamente afetada quando a apoptose foi inibida (Figura 14).

Apesar da pleora de proteínas antiapoptóticas codificadas pelo genoma dos VACV, há registros na literatura sobre a ocorrência de apoptose durante a infecção por VACV, em situações que parecem ser célula- e amostra viral-específicas. A seguir, alguns exemplos são citados. A restrição das células CHO (ovário de *hamster* chinês) à multiplicação por VACV-WR está associada à apoptose, que é detectada 3 hpi. Entretanto, a expressão do gene CHOhr de CPXV pelo VACV-WR suplanta a restrição em células CHO sem inibir a apoptose (RAMSEY-EWING & MOSS, 1998). Durante a infecção de células de coelho RK-13 pelo VACV-WR, a ocorrência de apoptose também não representa um obstáculo à multiplicação viral (CHUNG *et al.*, 1997). A apoptose também é desencadeada durante a infecção de células HeLa pela amostra atenuada de VACV NYVAC, o mesmo não ocorrendo durante a infecção pelo MVA e pelo VACV-WR (GUERRA *et al.*, 2006). A apoptose também foi detectada durante a infecção por outras BR-VACV, CTGV e a amostra vacinal VACV-IOC, e não foi associada com prejuízo à multiplicação viral (REIS *et al.*, 2008). Sendo assim, o VBH torna-se mais um exemplo de VACV que infecta e se multiplica eficientemente independentemente da ocorrência de apoptose durante a infecção.

Neste ponto do trabalho, a questão que se colocou foi a seguinte: estaria a apoptose durante a infecção pelo VBH relacionada à deficiência em algum gene relacionado com inibição da apoptose ou à resposta do hospedeiro à infecção?

Primeiramente, buscou-se por possíveis candidatos dentre os genes do VBH já sequenciados (DRUMOND *et al.*, 2008). Dentre estes genes cuja deficiência poderia estar envolvida na apoptose, tais como C7L, E3L, K1L e K3L (revisado por WERDEN *et al.*, 2008), nenhum apresentou polimorfismos na sequência de aminoácidos da proteína codificada quando o VBH foi comparado ao VACV-WR (DRUMOND *et al.*, 2008). Os genes que apresentaram polimorfismos foram A56R, B18R e K2L e, até o momento nenhum deles foi relacionado à inibição da apoptose (DRUMOND *et al.*, 2008).

Desta forma, três novas sequências de genes do VBH relacionados com inibição da apoptose foram obtidas (Figura 15). Entretanto, as sequências de aminoácidos das proteínas codificadas por B13R, F1L e N1L do VBH também não apresentaram polimorfismos quando comparados ao VACV-WR.

A proteína B13 de VACV-WR é capaz de inibir apoptose induzida pela ativação de TNFR ou Fas, ou seja, pela via extrínseca (DOBBELSTEIN & SHENK, 1996). Um ortólogo de B13R, o gene *crmA* de CPXV, codifica para um produto gênico com funções semelhantes e que mostrou ser um potente inibidor das caspases-1, -3 e -8, além de granzima B (TEWARI *et al.*, 1995; revisado por TAYLOR & BARRY, 2006). Dada a grande similaridade das sequências de B13R e *crmA*, é provável que B13 atue de modo semelhante à CrmA (SMITH *et al.*, 1989; DOBBELSTEIN & SHENK, 1996). Portanto, caspase-3 ativa consegue clivar PARP durante a infecção pelo VBH mesmo em presença de uma proteína B13 sem substituições de aminoácidos que potencialmente afetem a sua atividade inibitória (Figura 15A). Já o fato do CTGV não codificar uma proteína B13 funcional está de acordo com a presença de caspase-3 ativa, clivagem de PARP e a ocorrência de apoptose durante a infecção (REIS *et al.*, 2008).

A proteína F1 de VACV-WR, por sua vez, foi caracterizada por inibir a apoptose induzida pela via intrínseca com envolvimento da mitocôndria (WASILENKO *et al.*, 2003; WASILENKO *et al.*, 2005). F1 inibe as proteínas pró-apoptóticas Bak e Bax através da interação com Bak e Bim, através de domínios BH altamente divergentes, desfazendo o complexo Bak-Mcl-1 (WASILENKO *et al.*, 2005; TAYLOR *et al.*, 2006; CAMPBELL *et al.*, 2009). F1 também inibe caspase-9, a caspase iniciadora da apoptose pela via mitocondrial (ZHAI *et al.*, 2010). Visto que F1 é capaz de bloquear diferentes componentes da apoptose pela via intrínseca e está íntegra no genoma do VBH, é possível que apoptose durante a infecção por este vírus ocorra sem envolvimento da mitocôndria. Como mostrado na Figura 15B, o produto gênico de F1L do CTGV apresenta substituições de aminoácidos dentro dos domínios BH1 e BH2, o que provavelmente está relacionado ao fato da apoptose durante a infecção pelo CTGV ocorrer pela via mitocondrial (REIS *et al.*, 2008).

Por último, a proteína N1L de VACV-WR parece desempenhar duas funções durante a infecção: (i) interagir com membros pró-apoptóticos da

família Bcl-2, como Bax, Bad e Bid, inibindo a apoptose pela via intrínseca (COORAY *et al.*, 2007); e (ii) interagir com componentes do complexo IKK (quinase de I κ B), inibindo a ativação de NF- κ B e IRF-3 via TLR, IL-1R e TNFR (DIPERNA *et al.*, 2004). Como a proteína codificada pelo gene N1L do VBH não apresentou alterações de aminoácidos que pudessem comprometer a sua função (Figura 15C), é possível que N1 e F1 cooperem na inibição da apoptose via mitocôndria, o que reforça a ideia de que a apoptose durante a infecção pelo VBH ocorra sem o envolvimento da mitocôndria.

Em conjunto, estes dados mostram que o VBH guarda muitas semelhanças genéticas com o VACV-WR. Drumond e colaboradores destacaram que o VACV-WR foi isolado a partir da amostra vacinal NYCBH, que foi utilizada durante a campanha de erradicação da varíola no Brasil (DRUMOND *et al.*, 2008). Portanto, é possível que amostras geneticamente relacionadas ao VACV-WR tenham sido introduzidas e se estabelecido na natureza, já que outros BR-VACV além do VBH, como SAV, GP1V e BAV, compartilham muitas semelhanças com NYCBH e VACV-WR (TRINDADE *et al.*, 2007; DRUMOND *et al.*, 2008). Contudo, apesar da grande similaridade genética, as diferenças biológicas entre VBH e VACV-WR apresentadas neste trabalho são marcantes, evidenciando como a interação vírus hospedeiro pode ser complexa. É importante salientar que somente alguns genes do VBH foram analisados e o sequenciamento do genoma completo desse vírus será necessário a verificação da sua relação genética com o VACV-WR.

A fim de avaliar a resposta do hospedeiro à infecção pelo VBH e pelo VACV-WR, decidiu-se realizar a infecção de macrófagos murinos em vez de fibroblastos, que não produzem grandes quantidades de citocinas. Tanto o cultivo primário de macrófagos (M Φ) intraperitoniais quanto os macrófagos transformados (RAW 264.7) foram permissivos à multiplicação do VBH e do VACV-WR. É interessante notar que a curva de crescimento do VBH foi ligeiramente adiantada em relação à do VACV-WR (Figura 16), indicando que o VBH se multiplicaria um pouco mais rapidamente que o VACV-WR. De modo semelhante, o efeito citopático do VBH em fibroblastos é sempre adiantado em relação ao VACV-WR (dados não mostrados). Curiosamente, a expressão do mRNA das citocinas IFN- β , TNF- α , IL-4, IL-6 e IL-10 nos M Φ infectados pelo VBH foi cerca de 2 log₁₀ menor que nos M Φ infectados pelo VACV-WR no

tempo de maior produção de citocinas, 12 hpi (Figura 17A-E). Já a expressão do mRNA de IL-6 nas células RAW 264.7 infectadas pelo VBH e pelo VACV-WR foi semelhante e cinética e quantitativamente diferente do MΦ infectados (Figura 17F), indicando que macrófagos transformados podem não ser bons sistemas celulares para o estudo da resposta do hospedeiro à infecção viral.

O efeito citopático do VACV está diretamente relacionado à expressão dos mRNAs precoces (MOSS, 2007), sendo possível que durante a infecção pelo VBH o acúmulo de mRNAs precoces ocorra mais precocemente ou em níveis mais elevados que para o VACV-WR. Como muitas das proteínas virais relacionadas à evasão da resposta imune, tais como A46, A52, E3 e N1 são precoces, o acúmulo adiantado de mRNAs precoces permitiria ao VBH evadir mais eficientemente que o VACV-WR a montagem da resposta inflamatória pelo hospedeiro, mediante a inibição intensa sobre a expressão de citocinas inflamatórias. Essa hipótese poderia explicar a maior virulência do VBH, em relação ao VACV-WR e às demais BR-VACV, no modelo de infecção intranasal de camundongos (FERREIRA *et al.*, 2008).

A partir dos resultados apresentados até aqui e em estudos que elucidaram os possíveis mecanismos de indução da apoptose em células infectadas por VACV, um mecanismo hipotético para explicar a apoptose durante a infecção pelo VBH foi proposto. Esta proposta é baseada em três constatações.

Em primeiro lugar, o efeito citopático adiantado do VBH em relação ao VACV-WR pode estar relacionado ao acúmulo antecipado dos mRNAs precoces ou mesmo níveis mais elevados dos mesmos em momentos precoces da infecção. Isto se baseia no fato do efeito citopático ser dependente da expressão gênica precoce do vírus (MOSS, 2007). Em segundo lugar, mutantes termossensíveis no gene A18R (*Cts23*) de VACV-WR apresentam um acúmulo aumentado e prolongado de mRNAs precoces, o que está associado ao aparecimento de RNA fita dupla em tempos tardios da infecção (BAYLISS & CONDIT, 1993). E por último, RNA fita dupla desencadeia apoptose dependente de PKR em células infectadas com *Cts23* ou com VACV-WR com o gene E3L deletado (KIBLER *et al.*, 1997). Assim, durante a infecção pelo VBH, o acúmulo de elevados níveis de mRNAs precoces levaria ao aparecimento de grandes concentrações de RNA dupla fita que escapariam ao

controle de E3 e levariam à ativação de PKR e, conseqüentemente, à apoptose. Interessantemente, a apoptose induzida pela ativação de PKR ocorre principalmente pela via extrínseca (revisado por GARCÍA *et al.*, 2007), que foi sugerida acima como rota seguida pela apoptose durante a infecção pelo VBH, já que N1 e F1 estariam bloqueando a ativação da via intrínseca ou mitocondrial. Esta hipótese poderá ser testada rapidamente uma vez que as células deficientes em PKR já estão disponíveis no laboratório.

Apesar do possível envolvimento da MAPK p38 como promotor da multiplicação viral (Tabela 3), não se pode descartar a hipótese do possível envolvimento de p38 na apoptose durante a infecção pelo VBH. Curiosamente, os níveis mais elevados de p38 fosforilados foram encontrados 12 hpi, mesmo tempo em que detectou maior nível de caspase-3 ativa e de clivagem de PARP (Comparar Figura 8, Canaleta 4 com Figura 13, Canaleta 11). A via ASK-1/JNK ou p38 foi implicada como mediadora da apoptose durante a infecção pelo *Influenza virus*, que ocorre em decorrência da ativação de PKR ou do estresse do retículo endoplasmático (MARUOKA *et al.*, 2003; revisado por SUMBAYEV & YASINSKA, 2006). Além disso, Zhang *et al.* mostraram que JNK e p38 são ativadas via PKR em células infectadas por VACV com o gene E3L deletado (ZHANG *et al.*, 2009). Apesar da diferença entre os dados obtidos por Zhang e colaboradores (2009) e os apresentados nesta dissertação, onde encontrou-se que a ativação de JNK e p38 ocorre mesmo durante a infecção com VACV com E3L íntegro, estes resultados sugerem possíveis mecanismos que desencadeariam apoptose durante a infecção pelo VBH. Todavia, esses mecanismos hipotéticos precisam ser verificados experimentalmente.

Na Figura 18, os resultados mostrados e discutidos são representados esquematicamente.

VII. CONCLUSÕES

A partir dos resultados apresentados nesta dissertação, conclui-se que:

(1) O VBH completa um ciclo de multiplicação na célula hospedeira com todas as etapas da morfogênese típicas de um *Orthopoxvirus*, a saber, crescentes, vírus imaturos (IV), vírus imaturos intracelulares (IMV), vírus envelopados intracelulares (IEV) e vírus envelopados extracelulares (EEV);

(2) O VBH regula temporalmente a ativação das vias sinalizadoras das MAPK ERK, JNK e p38, e PI3K/Akt ao longo da infecção de células A31, de modo muito semelhante ao VACV-WR;

(3) Os inibidores farmacológicos de PI3K (LY294002) e de MEK (UO126) não alteram significativamente a multiplicação do VBH, quando comparado com VACV-WR, que é afetado em cerca de 1 log₁₀;

(4) A multiplicação do VBH não é significativamente afetada em presença do inibidor de JNK (JNK inhibitor VIII), bem como em células deficientes em JNK-1/2;

(5) Diferentemente do VACV-WR, a liberação de EEV não é aumentada em células deficientes em JNK-1/2 infectadas com o VBH;

(6) A multiplicação do VBH, ao contrário do VACV-WR, é reduzida em cerca de 1 log₁₀ em presença do inibidor de p38 (SB202190);

(7) Os inibidores farmacológicos de Akt (Akt inhibitor IV) e de JNK (SP600125), sabidamente inespecíficos, inibem significativamente a multiplicação do VBH;

(8) Os inibidores de mTORC-1 (rapamicina) e de GPCR (toxina pertussis) não afetam significativamente a multiplicação do VBH, assim como a do VACV-WR;

(9) A genisteína, inibidor de proteínas tirosina quinases, ocasiona uma redução de cerca de 1 log₁₀ na progênie do VBH, assim como na do VACV-WR;

(10) A curva de crescimento do VBH, assim como o acúmulo das proteínas virais precoces e tardias, são retardados ou parcialmente inibidos em presença do inibidor de PI3K, LY294002;

(11) Diferente do VACV-WR, a morfogênese do VBH se completa em presença de LY294002;

(12) Apoptose é desencadeada durante a infecção pelo VBH e é aumentada em presença do inibidor de PI3K (LY294002);

(13) O inibidor de caspases (zVAD.fmk) não afeta significativamente a multiplicação do VBH, assim como a do VACV-WR;

(14) A apoptose desencadeada durante a infecção pelo VBH não correlaciona com alteração em genes relacionados à interação vírus-hospedeiro, tais como B13R, C6L, C7L, E3L, F1L, K1L, K3L e N1L.

(15) O VBH, assim como o VACV-WR, se multiplica em macrófagos intraperitoniais de camundongo (MΦ) e em macrófagos transformados (RAW 264.7);

(16) A expressão do mRNA das citocinas inflamatórias IFN-β, TNF-α, IL-4, IL-6 e IL-10 é cerca de 2 log₁₀ menor em MΦ infectados pelo VBH, quando comparado com VACV-WR.

PERSPECTIVAS

- Quantificar a apoptose durante a infecção pelo VBH, através do ensaio de TUNEL;
- Investigar o envolvimento de PKR na indução de apoptose durante a infecção pelo VBH;
- Verificar o envolvimento da MAPK p38 na apoptose induzida durante a infecção pelo VBH;
- Avaliar o acúmulo de mRNAs virais ao longo do ciclo de multiplicação do VBH em fibroblastos e macrófagos intraperitoneais de camundongo;
- Sequenciar outros genes do VBH relacionados com interação vírus-hospedeiro, tais como A46R, A52R, K7L e M2L;
- Avaliar o papel desempenhado pela MAPK p38 durante a multiplicação do VBH;
- Avaliar o papel de p38 durante a infecção *in vivo* pelo VBH;
- Avaliar o papel de p38 na expressão de citocinas inflamatórias durante a infecção *in vitro* e *in vivo* pelo VBH.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abrahão, J.S., Guedes, M.I.M., Trindade, G.S., Fonseca, F.G., Campos, R.K., Mota, B.F., Lobato, Z.I.P., Silva-Fernandes, A.T., Rodrigues, G.O.L., Lima, L.S., Ferreira, P.C.P., Bonjardim, C.A., e Kroon, E.G. (2008) One more piece in the VACV ecological puzzle: Could peridomestic rodents be the link between wildlife and bovine vaccinia outbreaks in Brazil? *PLoS ONE* **4**(10), e7428.

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., e Lipman, D.J. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389-3402.

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

Andrade, L.G. (2008) O envolvimento da proteína quinase PAK1 na infecção pelos *Orthopoxvirus Cowpox* e *Vaccinia*. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

Antoine, G., Scheiflinger, F., dorner, F., e Falkner, F.G. (1998) The complete genomic sequence of the modified vaccinia Ankara strain: Comparison with other orthopoxviruses. *Virology* **244**, 365-395.

Arakawa, Y., Cordeiro, J.V., Schleich, S., Newsome, T.P., e Way, M. (2004) The release of vaccinia virus from infected cells requires RhoA-mDia modulation of cortical actin. *Cell Host Microbe* **1**(3), 227-40.

Banadyga, L., Gerig, J., Stewart, T., e Barry, M. (2007) Fowlpox virus encodes a Bcl-2 homologue that protects cells from apoptotic death through interaction with the proapoptotic protein Bak. *J Virol* **81**(20), 11032-45.

Banerjee, S., Narayanan, K., Mizutani, T., e Makino, S. (2002) Murine coronavirus replication-induced p38 mitogen-activated protein kinase activation promotes interleukin-6 production and virus replication in cultured cells. *J. Virol.* **76**(12), 5937-5948.

Bayliss, C.D., e Condit, R.C. (1993) Temperature-sensitive mutants in the vaccinia virus A18R gene increase double-stranded RNA synthesis as a result of aberrant viral transcription. *Virology* **194**, 254-262.

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

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

Boulares, A.H., Yakovlev, A.G., Ivanova, V., Stoica, B.A., Wang, G., Iyer, Smulson, M. (1999) Role of poly(ADP-ribose) polymerase (PARP) cleavage in apoptosis. *J. Biol. Chem.* **274**(33), 22932-22940.

Bronson, L.H., e Parker, R.F. (1941) The neutralization of vaccine virus by immune serum: titration by intracerebral inoculation of mice. *J. Bacteriol.* **41**, 56-57.

Broyles, S.S. (2003) Vaccinia virus transcription. *J Gen Virol* **84**(Pt 9), 2293-303.

Buchkovich, N.J., Yu, Y., Zampieri, C.A., e Alwine, J.C. (2008) The TORrid affairs of viruses: effects of mammalian DNA viruses on the PI3K-Akt-mTOR signalling pathway. *Nat Ver Microbiol* **6**(4), 265-75.

Campbell, S., Hazes, B., Kvansakul, M., Colman, P., e Barry, M. (2009) Vaccinia virus F1L interacts with Bak using highly divergent Bcl-2 homology domains and replaces the function of Mcl-1. *J Biol.Chem.* **285**(7), 4695-4708.

Campos, M.A.S. e Kroon, E.G. (1993) Critical period for irreversible block of Vaccinia virus replication. *Rev Microbiol* **24**, 104-10.

Carter, G.C., Law, M., Hollinshead, M., e Smith, G.L. (2005) Entry of the vaccinia virus intracellular mature virion and its interactions with glycosaminoglycans. *J Gen Virol* **86**(Pt 5), 1279-90.

Ceballos-Olvera, I., Chávez-Salinas, S., Medina, F., Ludert, J.E., Del Andel, E.M. (2010) JNK phosphorylation, induced during dengue virus infection, is important for viral infection and requires the presence of cholesterol. *Virology* **396**, 30-36.

Chen, J., e Stinski, M.F. (2002) Role of regulatory elements and the MAPK/ERK or p38 MAPK pathways for activation of human cytomegalovirus gene expression. *J. Virol.* **76**(10), 4873-4885.

Chin, R., Earnest-Silveira, L., Koeberlein, B., Franz, S., Zentgraf, H., Dong, X., Gowans, E., Bock, C.T., e Torresi, J. (2007) Modulation of MAPK pathways and cell cycle by replicating hepatitis B virus: Factors contributing to hepatocarcinogenesis. *J. Hepatol.* **47**, 325-337.

Chung, C.S., Vasilevskaya, I.A., Wang, S.C., Bair, C.H., e Chang, W. (1997) Apoptosis and host restriction of Vaccinia virus in RK13 cells. *Virus Res.* **52**, 121-132.

Condit, R.C., Moussatche, N., e Traktman, P. In a nutshell: Structure and assembly of the Vaccinia virion. *Adv. Virus Res.* **66**, 31-124.

Cooray, S. (2004) The pivotal role of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt signal transduction in virus survival. *J Gen Virol* **85**(Pt 5), 1065-76.

Cooray, S., Jin, L., e Best, J.M. (2005) The involvement of survival signaling pathways in rubella virus-induced apoptosis. *Virol J* **2**, 1.

Cuenda, A., e Rousseau, S. (2007) p38 MAP-kinases pathway regulation, function and role in human diseases. *Biochim. Biophys. Acta* **1773**, 1358-1375.

Damaso, C.R.A., Esposito, J.J., Condit, R.C., e Moussatché, N. (2000) An emergent poxvirus from humans and cattle in Rio de Janeiro State: Cantagalo virus may derive from Brazilian smallpox vaccine. *Virology* **277**(2), 439-449.

Damon I.K. (2007) Poxviruses. In: Fields Virology, pp. 2947-2975. Editado por D.M. Knipe, P.M. Howley, D.E. Griffin, R.A. Lamb, M.A. Martin, B. Roizman, e S.E. Straus. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

Davis, R.J. (2000) Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* **103**, 239-252.

Dawson, C.W., Tramountanis, G., Eliopoulos, A.G., e Young, L.S. (2003) Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 (LMP1) activates the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway to promote cell survival and induce actin filament remodeling. *J Biol Chem* **278**(6), 3694-704.

Dawson, C.W., Laverick, L., Morris, M.A., Tramoutanis, G., e Young, L. (2008) Epstein-Barr virus-encoded LMP1 regulates epithelial cell motility and invasion via the ERK-MAPK pathway. *J. Virol.* **82**(7), 3654-3664.

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

De Silva, F.S., Lewis, W., Berglund, P., Koonin, E.V., e Moss, B. (2007) Poxvirus DNA primase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**(47), 18724-9.

De Silva, F.S., Paran, N., e Moss, B. Products and substrate/template usage of vaccinia virus DNA primase. *Virology* **383**(1), 136-41.

Diao, L., Zhang, B., Xuan, C., Sun, S., Yang, K., Tang, Y., Qiao, W., Chen, Q., Geng, Y., e Wang, C. (2005) Activation of c-Jun N-terminal kinase (JNK) pathway by HSV-1 immediate early protein iCP0. *Exp. Cell Res.* **308**, 196-210.

Diniz, S., Trindade, G.S., Fonseca, F.G., e Kroon, E.G. (2001) Surto de varíola murina em camundongos suíços em biotério – Relato de caso. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* **53**(2), 1-5.

DiPerna, G., Stack, J., Bowie, A.g., boyd, A., Kotwal, G., Zhang, Z., Arvikar, S., Ilatz, E., Fitzgerald, K.A., e Marshall, W.L. (2004) Poxvirus protein N1L targets the I κ B kinase complex, inhibits signaling to NF- κ B by tumor necrosis factor superfamily of receptors, and inhibits NF- κ B and IRF-3 signaling by Toll-like receptors. *J. Biol. Chem.* **279**(35), 36570-36578.

Drumond, B.P., Leite, J.A., da Fonseca, F.G., dos Santos, Bonjardim, C.A., Ferreira, P.C.P., e Kroon, E.G. (2008) Brazilian Vaccinia virus strains are genetically divergent and differ from the Lister vaccine strain. *Microbes Infect* **10**(2), 185-97.

Dunn, E.F., Fears, R., e Connor, J.H. (2009) Akt inhibitor IV blocks virus replication through an Akt independent mechanism. *J. Virol.* **83**(22), 11665-11672.

Ehrhardt, C., Marjuki, H., Wolff, T., Nürnberg, B., Planz, O., Pleschka, S., e Ludwig, S. (2007) Bivalent role of the phosphatidyl-3-kinase (PI3K) during influenza virus infection and host cell defence. *Cell Microbiol* **8**(8), 1336-48.

Ehrhardt, C., Wolff, T., Pleschka, S., Planz, O., Beermann, W., Bode, J.G., Schmolke, M., e Ludwig, S. (2007) Influenza A virus NS1 protein activates the PI3K/Akt pathway to mediate antiapoptotic signaling responses. *J Virol* **81**(7), 3058-67.

Esfandiarei, M., Luo, H., Yanagawa, B., Suarez, A., Dabiri, D., Zhang, J., e McManus, B.M. (2004) Protein kinase B/Akt regulates coxsackievirus B3 replication through a mechanism which is not caspase dependent. *J Virol* **78**(8), 4289-98.

Ewing, B., Hillier, L., Wendl, M.C., e Green, P. (1998) Base-calling of automated sequencer traces using Phred. I. Accuracy assessment. *Genome Res.* **8**, 175-185.

Ewing, B., e Green, P. (1998) Base-calling of automated sequencer traces using Phred. II. Error probabilities. *Genome Res.* **8**, 186-194.

Ferreira, J.M.S., Drummond, B.P., Guedes, M.I.M.C., Pascoal-Xavier, M.A., Almeida-Leite, C.M., Arantes, R.M.E., Mota, B.E.F., Abrahão, J.S., Alves, P.A., Oliveira, F.M., Ferreira, P.C.P., Bonjardim, C.A., Lobato, Z.I.P., Kroon, E.G. (2008) Virulence in murine model shows the existence of two distinct populations of Brazilian *Vaccinia virus* strains. *PLoS ONE* **3**(8), e3043.

Fonseca, F.G., Lanna, M.C.S., Campos, M.A.S., Kitajima, E.W., Peres, J.N., Golgher, R.R., Ferreira, P.C.P., e Kroon, E.G. (1998) Morphological and molecular characterization of the poxvirus BeAn 58058. *Arch Virol* **143**(6), 1171-86.

Fonseca, F.G., Trindade, G.S., Silva, R.L.A., Bonjardim, C.A., Ferreira, P.C.P., e Kroon, E.G. (2002) Characterization of a vaccinia-like virus isolated in a Brazilian forest. *Arch Virol* **83**(Pt 1), 223-8.

Garcia, A.D. e Moss, B. (2006) Repression of *Vaccinia virus* Holliday junction resolvase inhibits processing of viral DNA into unit-length genomes. *J Virol* **75**(14), 6460-71.

Garcia, M.A., Meurs, E.F., e Esteban, M. (2007) The dsRNA protein kinase PKR: Virus and cell control. *Biochimie* **89**, 799-811.

Gedey, R., Jin, X., Hinthong, O., e Shisler, J.L. (2006) Poxviral regulation of the host NF- κ B response: the Vaccinia virus M2L protein inhibits induction of NF- κ B activation via an ERK2 pathway in virus-infected human embryonic kidney cells. *J Virol* **80**(17), 8676-85.

Gordon, D., Abaijian, C., e Green, P. (1998) Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Res.* **8**, 195-202.

Gordon, D., e Green, P. (2002) Automated finishing with Autofinish. *Genome Res.* **11**, 614-625.

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

Guerra, S., López-Fernández, L.A., Pascual-Montano, A., Nájera, J.L., Zaballos, A., e Esteban, M. (2006) Host response to Attenuated poxvirus vector NYVACV: Upregulation of apoptotic genes and NF- κ B responsive gene in infected HeLa cells. *J. Virol.* **80**(2), 985-998.

Halasz, P., Holloway, G., Turner, S.J., e Coulson, B.S. (2008) Rotavirus replication in intestinal cells differentially regulates integrin expression by a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway, resulting in increased cell adhesion and virus yield. *J Virol* **82**(1), 148-60.

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

Hawkins, P.T., Anderson, K.E., Davidson, K., e Stephens, L.R. (2006) Signalling through class I PI3Ks in mammalian cells. *Biochem Soc Trans* **34**(Pt 5), 647-62.

He, Y., Nakao, H., Tan, S., Polyak, S.J., Neddermann, P., Vijaysri, S., Jacobs, B.L., e Katze, M.G. (2002) Subversion of cell signaling pathways by hepatitis C

virus nonstructural 5A protein via interaction with Grb2 and p85 phosphatidylinositol 3-kinase. *J Virol* **76**(18), 9207-17.

Heuser, J. (2005) Deep-etch EM reveals that the early poxvirus envelope is a single membrane bilayer stabilized by a geodetic “honeycomb” surface coat. *J Cell Biol* **169**(2), 269-83.

Hu, X., Wolffe, E.J., Weisberg, A.S., Carrol, L.J., e Moss, B. (1998) Repression of the A8L gene, encoding the early transcription factor 82-kilodalton subunit, inhibits morphogenesis of Vaccinia virus. *J Virol* **72**(1), 104-12.

Huang, X., e Madan, A. (1999) CAP3: a DNA sequence assembly program. *Genome Res.* **9**, 19-28.

Huang, C., Jacobson, K., Schaller, M.D. (2004) MAP kinases and cell migration. *J. Cell Sci.* **117**, 4619-4628.

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

Jeffree, C.E., Brown, G., Aitken, J., Su-Yin, D.Y., Tan, B., e Sugrue, R.J. (2007) Ultrastructural analysis of the interaction between F-actin and respiratory syncytial virus during virus assembly. *Virology* **369**(2), 309-23.

Johnson, R.A., Wang, X., Ma, X., Huong, S., e Huang, E. (2001) Human cytomegalovirus up-regulates the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) pathway: inhibition of PI3-K activity inhibits virus replication and virus induced signaling. *J Virol* **75**(13), 6022-32.

Johnston, J.B., Barrett, J.W., Chang, W., Chung, C., Zeng, W., Masters, J., Mann, M., Wang, F., Cao, J., e McFadden, G. (2003) Role of the serine-threonine kinase PAK-1 in myxoma virus replication. *J Virol* **77**(10), 5877-88.

Johnston, J.B. e McFadden, G. (2003) Poxvirus immunomodulatory strategies: current perspectives. *J Virol* **77**(11), 6093-100.

Johnston, J.B., Wang, G., Barrett, J.W., Nazarian, S.H., Colwill, K., Moran, M., e McFadden, G. (2005) Myxoma virus M-T5 protects infected cells from the stress of cell cycle arrest through its interaction with host cell Cullin-1. *J Virol* **79**(16), 10750-63.

Joklik, W.K. (1962) The purification of four strains of poxvirus. *Virology* **18**, 9-18.

Katsafanas, G.C. e Moss, B. (2007) Linkage of transcription and translation within cytoplasmic poxvirus DNA factories provides a mechanism to coordinate viral and usurp host functions. *Cell Host Microbe* **2**(4), 221-8.

Katso, R., Okkenhaug, K., Ahmadi, K., White, S., Timms, J., e Waterfield, M.D. (2001) Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. *Annu Rev Cell Dev Biol* **17**, 615-75.

Kibler, K.V., shors, T., Perkins, K.B., Zeman, C.C., Banaszak, M.P., Biesterfeldt, J., Langland, J.O., e Jacobs, B.L. (1997) Double-stranded RNA is a trigger for apoptosis in Vaccinia virus-infected cells. *J. Virol.* **71**(3), 1992-2003.

Krishna, M., e Narang, H. (2008) The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**, 3525-3544.

Kudchodkar, S.B., Yu, Y., Maguire, T.G., e Alwine, J.C. (2006) Human cytomegalovirus infection alters the substrate specificities and rapamycin sensitivities of raptor- and rictor-containing complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**(38), 14182-7.

Kumar, S., Tamura, K., e Nei, M. (2004) MEGA3: integrated software for Molecular Evolucionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinfo.* **5**, 150-163.

Law, M., Carter, G.C., Roberts, K.L., Hollinshead, M., e Smith, G.L. (2006)

Ligand-induced and nonfusogenic dissolution of a viral membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**(15), 5989-94.

Lee, C., Liao, C., e Lin, Y. (2005) Flavivirus activates phosphatidylinositol 3-kinase signaling to block caspase-dependent apoptotic cell death at the early stage of virus infection. *J Virol* **79**(13), 8388-99.

Leite, J.A., Drumond, B.P., Trindade, G.S., Bonjardim, C.A., Ferreira, P.C.P., e Kroon, E.G. (2007) Brazilian Vaccinia virus strains show genetic polymorphism at the *ati* gene. *Virus Genes* **35**(3), 531-9.

Leite, J.A., Drumond, B.P., Trindade, G.S., Lobato, Z.I.P., da Fonseca, F.G., dos Santos, J.R., Madureira, M.C., Guedes, M.I.M.C., Ferreira, J.M.S., Bonjardim, C.A., Ferreira, P.C.P., e Kroon, E.G. (2005) Passatempo virus, a Vaccinia virus strain, Brazil. *Emerg Infect Dis* **11**(12), 1935-1938.

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

Linnemann, T., Zheng, Y.H., Mandic, R., e Peterlin, B.M. (2002) Interaction between Nef and phosphatidylinositol-3-kinase leads to activation of p21-activated kinase and increased production of HIV. *Virology* **294**(2), 246-55.

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

Luo, H., Yanagawa, B., Zhang, J., Luo, Z., Zhang, M., Esfandiarei, M., Carthy, C., Wilson, J.E., Yang, D., e McManus, B.M. (2002) Coxsackievirus B3 replicatin is reduced by inhibition of the extracellular signal-reguated kinase (ERK) signaling pathway. *J. Virol.* **70**(7), 3365-3373.

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

Maruoka, S., Hashimoto, S., Gon, Y., Nishitoh, H., Takeshita, I., Asai, Y., Mizumura, K., Shimizu, K., Ivhijo, H., e Horie, T. (2003) ASK1 regulates influenza virus infection-induced apoptotic cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **307**, 870-876.

Masters, J., Hinek, A.A., Uddin, S., Plataniias, L.C., Zeng, W., McFadden, G., e Fish, E.N. (2001) Poxvirus infection rapidly activates tyrosine kinase signal transduction. *J. Biol. Chem.* **276**(51), 48371-48375.

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

McLennan, A.G. (2007) Decapitation: poxvirus makes RNA lose its head. *Proc Natl Acad Sci USA* **32**(7), 297-9.

Mercer, J. e Helenius, A. (2008) Vaccinia virus uses macropinocytosis and apoptotic mimicry to enter host cells. *Science* **320**(5875), 531-5.

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

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

Moss, B. (2007) *Poxviridae: the viruses and their replication*. In: Fields Virology, pp. 2905-45. Editado por D.M. Knipe, P.M. Howley, D.E. Griffin, R.A. Lamb, M.A. Martin, B. Roizman, e S.E. Straus. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

Mota, B.E.F. (2006) Caracterização molecular de amostras de *Vaccinia virus* circulantes no Brasil e avaliação do estado imune da população contra *Orthopoxvirus*. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

- Münter, S., Way, M., e Frischknecht, F. (2006) Signaling during pathogen infection. *Sci STKE* **2006**(335), re5.
- Najarro, P., Traktman, P., e Lewis, J.A. (2001) Vaccinia virus blocks gamma interferon signal transduction: viral VH1 phosphatase reverses Stat1 activation. *J Virol* **75**(7), 3185-3196.
- Naranatt, P.P., Akula, S.M., Zien, C.A., Krishnan, H.H., Chandram, B., Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus induces de phosphatidylinositol 3-kinase-PKC- ζ -MEK-ERK signaling pathway in target cells early during infection: Implication for infectivity. *J. Virol.* **77**(2), 1524-2539.
- Newsome, T.P., Scaplehorn, N., e Way, M. (2004) Src mediates a switch from microtubule- to actin-based motility of Vaccinia virus. *Science* **306**(5693), 124-129.
- Newsome, T.P., Weisswange, I., Frischknecht, F., e Way, M. (2006) Abl collaborates with Src family kinases to stimulate actin-based motility of vaccinia virus. *Cell. Microbiol.* **8**(2), 233-241.
- Pan, H., Xie, J., Ye, F., Gao, S.J. (2000) Modulation of Kaposi's sarcoma associated herpesvirus infection and replication by MK/ERK, JNK, e p38 multiple mitogen-activated kinase pathways during primary infection. *J. Virol.* **80**(11), 5371-5382.
- Parrish, S. e Moss, B. (2006) Characterization of a Vaccinia virus mutant with a deletion of the D10L gene encoding a putative negative regulator of gene expression. *J Virol* **80**(2), 553-61.
- Parrish, S. e Moss, B. (2007) Characterization of a second Vaccinia virus mRNA-decapping enzyme conserved in poxviruses. *J Virol* **81**(23), 12973-8.
- Perfettini, J.L., Castedo, m., Nardacci, r., Ciccocanti, F., Boya, P., Roumier, T., Larochette, N., Piacentini, M., e Kroemer, G. (2005) Essencial role of p53

phosphorylation by p38 MAPK in apoptosis induction by the HIV-1 envelope. *J. Exp. Med.* **201**, 279-289.

Pleschka, S., Wolff, T., Ehrhardt, C., Hobom, G., Planz, O., Rapp, U.T., e Ludwig, S. *Nat. Cell Biol.* **3**, 301-305.

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

Rahaus, M., Desloges, N., e Wolff, M.H. (2004) Replication of varicella-zoster virus is influenced by the levels of JNK/SAPK and p38/MAPK activation. *J. Gen. Virol.* **85**, 3529-3540.

Rahbar, R., Murooka, T.T., Hinek, A.A., Galligan, C.L., Sassano, A., Yu, C., Srivastava, K., Platanius, L.C., e Fish, E.N. (2006) Vaccinia virus activation of CCR5 invokes tyrosine phosphorylation signaling events that support virus replication. *J. Virol.* **80**(14), 7245-7259.

Ramsey-Ewing, A., e Moss, B. (1998) Apoptosis induced by a postbinding step of Vaccinia virus entry into Chinese hamster ovary cells. *Virology* **242**, 138-149.

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

Reis, S.A., Moussatche, N., e Damaso, C. (2008) Mitochondrial apoptotic pathway triggered by vaccinia virus strain IOC and Cantagalo virus infection. *In: Anais do XIX Encontro Nacional de Virologia, 2008, Caxambu. Virus Reviews and Research* **13**, 76-77.

Roberts, K.L., e Smith, G.L. (2008) Vaccinia virus morphogenesis and dissemination. *Trends Microbiol.* **16**(10) 472-479.

Sanger, F., Nicklen, S., e Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467 .

Santos, C.R., Blanco, S., Sevilla, A., e Lazo, P.A. (2006) Characterization of a Vaccinia virus mutant with a deletion of the D10L gene encoding a putative negative regulator of gene expression. *J Virol* **80**(15), 7667-75.

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

Schabbauer, G., Luyendyk, J., Crozat, K., Jiang, Z., Mackman, N., Bahram, S., e Georgel, P. (2008) TLR4/CD14-mediated PI3K activation is an essential component of interferon-dependent VSV resistance in macrophages. *Mol Immunol* **45**(10), 2790-6.

Sedger, L.M., Osvath, S.R., Xu, X., Li, G., Chan, F.K., Barrett, J.W., e McFadden, G. (2006) Poxvirus tumor necrosis factor receptor (TNFR)-like T2 proteins contain a conserved preligand assembly domain that inhibits cellular TNFR1-induced cell death. *J Virol* **80**(18), 9300-9.

Shaul, Y.D., e Seger, R. (2007) The MEK/ERK cascade: From signaling specificity to diverse functions. *Biochim. Biophys. Acta* **1773**, 1213-1226.

Shin, Y., Liu, Q., Tikoo, S.K., Babiuk, L.A., e Zhou, Y. (2007a) Influenza A virus NS1 protein activates the phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)/Akt pathway by direct interaction with the p85 subunit of PI3K. *J Gen Virol* **88**(Pt 1), 13-8.

Shin, Y., Li, Y., Liu, Q., Anderson, D.H., Babiuk, L.A., e Zhou, Y. (2007b) SH3 binding motif 1 in influenza A virus NS1 protein is essential for PI3K/Akt signaling pathway activation. *J Virol* **81**(23), 12730-9.

Silva, P.N.G., Soares, J.A.P., Brasil, B.S.A.F., Nogueira, S.V., Andrade, A.A., de Magalhães, J.C., Bonjardim, M.B., Ferreira, P.C.P., Kroon, E.G., Bruña-

Romero, O., e Bonjardim, C.A. (2006) Differential role played by the MEK/ERK/EGR-1 pathway in orthopoxviruses vaccinia and cowpox biology. *Biochem J* **398**(1), 83-95.

Smith, G.L., Howard, S.T., e Chan, Y.S. (1989) Vaccinia virus encodes a family of genes with homology to serine proteinase inhibitors. *J. Gen. Virol.* **70**, 2333-2343.

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

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

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

Soares, J.A.P., Leite, F.G.G., Torres, A.A., Andrade, L.G., De Sousa, L.P., Teixeira, Barcelos, L.S., M.M., Ferreira, P.C.P., Kroon, E.G., Souto-Padron, T., e Bonjardim, C.A. (2009) Activation of PI3K/Akt pathway early during Vaccinia and Cowpox virus infections is required for both host survival na viral replication. *J. Virol.* **83**(13), 6883-6899.

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

Su, J., Wang, G., Barrett, J.W., Irvine, T.S., Gao, X., e McFadden, G. (2006) Myxoma virus M11L blocks apoptosis through inhibition of conformational activation of Bax at the mitochondria. *J Virol* **80**(3), 1140-51.

Sumbayev, V.V., e Yasinska, I.M. (2008) Role of MAP kinase-dependent apoptotic pathway in innate immune responses and viral infection. *Scand. J. Immunol.* **63**, 391-400.

Swart, R., Ruf, I.K., Sample, J., e Longnecker, R. (2000) Latent membrane protein 2A-mediated effects on the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *J Virol* **74**(22), 10838-45.

Taylor, J.M., Quilty, D., Banadyga, L., e Barry, M. (2006) The Vaccinia virus protein F1L interacts with Bim and inhibits activation of the pro-apoptotic protein Bax. *J Biol Chem* **281**(51), 39728-39.

Tewari, M., Quan, L.T., o'Rourke, K., Desnoyers, S., Zeng, Z., Beidler, D.R., Poirier, G.G., Salvesen, G.S., e Dixit, V.M. (1995) Yama/ CPP32 β , a mammalian homolog of CED-3, is a CrmA-inhibitavle protease that cleaves the death substrate poly(ADP-ribose) polymerase. *Cell* **81**, 801-809.

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

Thomas, K.W., Monick, M.M., Staber, J.M., Yarovonsky, T., Carter, A.B., e Hunninghake, G.W. (2002) Respiartory syncytial virus inhibits apoptoses and induces NF- κ B activity through a phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway. *J Biol Chem* **277**(1), 492-501.

Thompson, J.D., Higgins, D.G., e Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673-4680.

Thornton, T.M., e Rioncon, M. (2009) Non-classical p38 MAP kinase functions: Cell cycle checkpoints and survival. *Int. J. Biol. Sci.* **5**, 44-51.

Tolonen, N., Doglio, L., Schleich, S., e Locker, J.K. (2001) Vaccinia virus DNA replication occurs in endoplasmic reticulum-enclosed cytoplasmic mini-nuclei. *Mol Biol Cell* **12**(7), 2031-46.

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

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

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

Trindade, G.S., Emerson, G.L., Carroll, D.S., Kroon, E.G., e Damon, I.K. (2007) Brazilian Vaccinia viruses and their origins. *Emerg Infect Dis* **13**(7), 965-72.

Tung, W.H., Hsieh, H.L., e Yang, C.M. (2010) Enterovirus 71 induces cox-2 expression via MAPKs, NF- κ B, and AP-1 in SK-N-SH cells: Role of PGE₂ in viral replication. *Cell.Signal.* **22**, 234-246.

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

Vanderplasschen, A., Hollinshead, M., e Smith, G.L. (1998) Intracellular and extracellular vaccinia virions enter cells by different mechanisms. *J Gen Virol* **79**(Pt 4), 877-87.

Wagner, E.F., e Nebreda, A.R. (2009) Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 537-549.

Walsh, D., Arias, C., Perez, C., Halladin, D., Escandon, M., Ueda, T., Watanabe-Fukunaga, R., Fukunaga, R., e Mohr, I. (2008) Eukaryotic translation initiation factor 4F architectural alterations accompany translation initiation factor redistribution in poxvirus-infected cells. *Mol. Cell. Biol.* **28**(8), 2648-2658.

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

Wang, G., Barrett, J.W., Nazarian, S.H., Everett, H., Gao, X., Breackley, C., Colwill, K., Moran, M.F., e McFadden, G. (2004b) Myxoma virus M11L prevents apoptosis through constitutive interaction with Bak. *J Virol* **78**(13), 7097-111.

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

Wasilenko, S.T., Banadyga, L., Bond, D., e Barry, M. (2005) The Vaccinia virus F1L protein interacts with the pro-apoptotic protein Bak and inhibits Bak activation. *J Virol* **79**(22), 14031-43.

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

Werden, S.J., Rahman, M.M., e McFadden, G. (2008) Poxvirus host range genes. *Adv. Virus Res.* **71**, 135-171.

Weston, C.R., e Davis, R.J. (2007) The JNK signal transduction pathway. *Curr. Op. Cell Biol.* **19**, 142-149.

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

Xie, J., Ajibade, A.O., Ye, f., kuhne, K., e Gao, S.J. (2008) Reactivation of Kaposi's sarcoma associated herpesvirus from latency requires MEK/ERK, JNK e p38 multiple mitogen-activated protein kinase pathways. *Virology* **371**, 139-154.

Zaborowska, I., e Walsh, D. (2009) PI3K signaling regulates rapamycin-insensitive translation initiation complex formation in Vaccinia virus-infected cells. *J. Virol.* **83**(8), 3988-3992

Zhai, D., Yu, E., Jin, C., Welsh, K., Shiau, C., Chen, L., Salvesen, G.S., Liddington, R., e Reed, J.C. (2009) Vaccinia virus protein F1L is a caspase-9 inhibitor. *J. Biol. Chem.*, no prelo.

Zhang, B., Spandau, B.F., e Roman, A. (2002) E5 protein of human papillomavirus type 16 protects human foreskin keratinocytes from UV B-irradiation-induced apoptosis. *J Virol* **76**(1), 220-31.

Zhang, P., Llangland, J.O., Jacobs, B.L., e Samuel, C.E. (2009) Protein kinase PKR-dependent activation of mitogen-activated protein kinases occurs through mitochondrial adapter IPS-1 and is antagonized by Vaccinia virus E3L. *J. Virol.* **83**(11), 5718-5725.