

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

AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DA FOSFOLIPASE CITOPLASMÁTICA A2
(cPLA2) SOBRE O CICLO DE MULTIPLICAÇÃO DO *Vaccinia virus*

Luís Filipe Zandonadi Guimarães

Belo Horizonte

2017

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

AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DA FOSFOLIPASE CITOPLASMÁTICA A2
(cPLA2) SOBRE O CICLO DE MULTIPLICAÇÃO DO *Vaccinia virus*

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

Aluno: Luís Filipe Zandonadi Guimarães

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Antônio Bonjardim

Belo Horizonte

2017

SUMÁRIO

SUMÁRIO	III
LISTA DE FIGURAS	VI
LISTA DE TABELAS	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS	IX
RESUMO	XI
ABSTRACT	XII
I. INTRODUÇÃO	1
1. Os Poxvírus	1
1.1. Aspectos Históricos	1
1.2. A Família <i>Poxviridae</i> – Características Gerais e Taxonomia	3
1.3. Ciclo de Multiplicação e Morfogênese do <i>Vaccinia virus</i>	7
1.4. Biogênese de Membranas dos Poxvírus	11
2. As Fosfolipases	13
2.1. Características Gerais	13
2.2. As Fosfolipases da Família A2	14
2.3. Fosfolipases e Vírus	17
3. Proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs)	19
3.1. Características Gerais	19
3.2. A via das Proteínas Cinases Reguladas por Sinais Extracelulares (ERK)	21
II. JUSTIFICATIVA	23
III. OBJETIVOS	25
1- Objetivo geral	25
2- Objetivos específicos	25

IV. MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 - Células	26
4.1.1 - Células BSC-40	26
4.1.2 - Células HeLa	26
4.2 - Vírus	26
4.3 – Inibidores farmacológicos e tratamento das células com inibidores	26
4.4 – Teste de citotoxicidade por MTT.....	27
4.5 - Transfecção de células com siRNAs	28
4.6 - Infecção <i>in vitro</i>	29
4.7 – Titulação viral	29
4.8 - Extração de proteínas totais	30
4.9 - Western Blot	30
4.10 - Microscopia de fluorescência	31
4.11 – Análise estatística.....	32
V. RESULTADOS.....	33
1. Caracterização da cinética de ativação da cPLA2 pelo VACV em células HeLa	33
2. Os inibidores farmacológicos RSC-3388, U0126 e LY294002 reduzem os níveis de P-cPLA2 em células HeLa.....	35
3. O inibidor farmacológico RSC-3388 afeta negativamente a multiplicação do VACV-WR	37
4- Curvas de dose-resposta do inibidor RSC-3388 sobre a multiplicação do VACV-WR	39
5 – Teste de citotoxicidade do inibidor RSC-3388.....	41
6 – Curvas de multiplicação do VACV em células HeLa tratadas com o inibidor RSC-3388.	43
7 – Silenciamento da fosfolipase A2 citoplasmática pela técnica de RNA de interferência	45
8 – Curvas de multiplicação do VACV-WR em células HeLa transfectadas com siRNA contra cPLA2	46

9 – Microscopia de fluorescência.....	48
VI. DISCUSSÃO	51
VII. CONCLUSÕES	56
VIII. PERSPECTIVAS	57
IX. BIBLIOGRAFIA	58

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Micrografia eletrônica ilustrando a estrutura de um Poxvírus	3
Figura 2 - Esquema demonstrando a organização do genoma dos Poxvírus	4
Figura 3 – Esquema demonstrando os principais elementos estruturais das duas partículas virais resultantes do processo de morfogênese do <i>Vaccinia virus</i>	9
Figura 4 - Esquema demonstrando o ciclo de multiplicação e a morfogênese do VACV	10
Figura 5 – Modelo de biogênese de membranas do VACV proposto por Bernard Moss	12
Figura 6 – Estrutura de um fosfolipídio e sítios de ação das diferentes fosfolipases	14
Figura 7 – Representação esquemática da atuação das cPLA2	15
Figura 8 – Esquema simplificado da estrutura linear da cPLA2	16
Figura 9 - Representação esquemática das cascatas de sinalização das MAP Cinasas	20
Figura 10 - Representação esquemática da via de ERK	22
Figura 11 – Análise da fosforilação da proteína celular cPLA2A em células infectadas com o VACV e tratadas ou não com os inibidores farmacológicos U0126 e JNK-i VIII.	34
Figura 12 – Efeito dose-resposta dos inibidores farmacológicos RSC-3388, U0126 e LY294002 sobre os níveis de cPLA2 fosforilada (P-cPLA2) pós-infecção com o VACV.	36
Figura 13 – Efeito do inibidor de fosfolipase A2 citosólica, RSC-3388, sobre a multiplicação do VACV.	38
Figura 14 – Curva dose-resposta entre o inibidor RSC-3388 e a multiplicação do VACV-WR..	40
Figura 15 – Análise da citotoxicidade do inibidor RSC-3388.....	42
Figura 16 – Curvas de multiplicação do VACV-WR em presença do inibidor RSC-3388.....	44
Figura 17 - Efeito do silenciamento do siRNA contra a cPLA2 ativada (P-cPLA2).	46
Figura 18 – Curvas de multiplicação do VACV-WR em células HeLa transfectadas com siRNA específico contra cPLA2.	47

Figura 19 – Microscopia de fluorescência de células HeLa transfectadas com os siRNAs contra cPLA2 ou AllStars (AS) e infectadas com o VACV-F13L-GFP.	50
---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Classificação dos poxvírus.....	5
Tabela 2 - Informações gerais sobre o siRNA c-PLA2.....	25

LISTA DE ABREVIATURAS

AA = Ácido aracdônico

ANOVA = Análise de variância

BSA = Albumina sérica bovina, do inglês *bovine serum albumine*

CEV = Vírus envelopado associado à célula, do inglês *cell-associated enveloped virus*

cPLA2 = Fosfolipase A2 citosólica, do inglês *cytosolic phospholipase A2*

CPXV = *Cowpox virus*

CO₂ = Dióxido de carbono

DAPI = 4'-6-diamino-2-phenylindole

DDT = Ditiotretitol

DNA = Ácido desoxirribonucleico

EDTA = Ácido etilenodiamino tetra-acético, do inglês *ethylenediamine tetraacetic acid*

EEV = Vírus envelopado extracelular, do inglês *extracellular enveloped virus*

ERK = Proteína cinase regulada por sinais extracelulares, do inglês *extracellular signal-regulated kinase protein*

EV = Vírus envelopados, do inglês *enveloped viruses*

GFP = Proteína verde fluorescente, do inglês *green fluorescent protein*

H.p.i. = Horas pós-infecção

ICTV = Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus, do inglês *International Comitee on Taxonomy of Viruses*

IMV = Vírus maduro intracelular, do inglês *intracellular mature virus*

ITR = Repetições terminais invertidas, do inglês *inverted terminal repeats*

IEV = Vírus envelopados intracelulares, do inglês *intracellular enveloped virus*

IV = Vírus imaturo, do inglês *immature virus*

JNK = Proteína cinase c-Jun N-terminal, do inglês *c-Jun N-terminal kinase*

LB = Laemmli buffer

MAPK = Proteínas cinases ativadas por mitógenos, do inglês *mitogen activated protein kinase*

MAPKAPK = Proteína cinase ativada por MAPK

MAPK- Proteínas cinases ativadas por mitógenos

MAPKK- MAPK cinase, do inglês *MAPK kinase*

MAPKKK- MAPKK cinase, do inglês *MAPKK kinase*

MEM = Meio mínimo essencial

MOI = Multiplicidade de infecção, do inglês *multiplicity of infection*

mRNA = RNA mensageiro

MTT = 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

NaF = Fluoreto de sódio, do inglês *Sodium Fluoride*

OMS = Organização Mundial da Saúde

PBS = Salina tamponada por fosfato, do inglês *phosphate-buffered saline*

PFU = Unidades formadoras de placas, do inglês *plaque-forming units*

PLA = Fosfolipase A, do inglês *Phospholipase A*

PLB = Fosfolipase B, do inglês *Phospholipase B*

PLC = Fosfolipase C, do inglês *Phospholipase C*

PLD = Fosfolipase D, do inglês *Phospholipase D*

PMSF = Fenilmetilsulfonilfluoreto, do inglês *phenyl methyl sulphonyl fluoride*

SAPK = Proteínas cinases ativadas por estresse, do inglês *stress activated protein kinase*

SFB = Soro fetal bovino

siRNA = RNAs pequenos de interferência, do inglês *small interfering RNA*

UV = Ultra violeta

VACV = *Vaccinia virus*

VACV-F13L-GFP = *Vaccinia virus* codificando a proteína F13 fundida à proteína GFP

VACV-WR = *Vaccinia virus* Western-Reserve

VARV = *Variola virus*

VMAPs = Proteínas de montagem de membrana viral, do inglês *viral membrane assemble proteins*

RESUMO

O *Vaccinia virus* (VACV), protótipo da família *Poxviridae*, é um vírus envelopado que realiza seu ciclo multiplicativo inteiramente no citoplasma da célula do hospedeiro. Ao longo de seu ciclo de multiplicação o VACV produz dois tipos diferentes de vírions que são classificados de acordo com o número de envelopes lipídicos que apresentam e com sua localização celular: os vírus maduros intracelulares (IMVs), que possuem um único envelope lipoproteico, e os vírus extracelulares (EVs), que possuem um envelope lipídico adicional. A existência de duas formas envelopadas do VACV exige do hospedeiro uma intensa biogênese e rearranjo de lipídios para suprir a demanda do vírus por lípidos de membrana. A fosfolipase A2 citosólica (cPLA2) é uma enzima lipolítica que está envolvida no “turnover” fosfolipídico, remodelação de membranas e produção de segundos mensageiros que atuam nas vias sinalizadoras celulares e na resposta imune do hospedeiro, e, por estes motivos, pode estar relacionada com a morfogênese dos vírions formados ao longo do ciclo de multiplicação do VACV. Com o objetivo de confirmar esta hipótese, avaliou-se, inicialmente, se o vírus era capaz de alterar na célula hospedeira o padrão de ativação (fosforilação) da cPLA2, e foi verificado que o mesmo induz um aumento na ativação desta proteína (conversão da cPLA2 em P-cPLA2) por um mecanismo dependente da ativação de vias sinalizadoras celulares (principalmente pela via de MEK/ERK). Posteriormente, a atividade da cPLA2 em células HeLa foi inibida por mecanismos farmacológicos (uso do inibidor RSC-3388) ou genéticos (transfecção das células com RNA de interferência específico contra o gene codificador desta enzima) e o ciclo de multiplicação do VACV nestas condições foi avaliado. Observou-se que o tratamento das células com o inibidor RSC-3388 resultou em uma redução dose-dependente significativa nos títulos virais obtidos, mas o silenciamento gênico com RNA de interferência não apresentou o mesmo efeito. Por último, avaliou-se, por microscopia de fluorescência, se haveria alteração na sublocalização celular da P-cPLA2 na condição de infecção pelo VACV, mas nenhuma modificação neste padrão foi observada. Os resultados obtidos sugerem que a cPLA2 é necessária para que o ciclo de multiplicação do VACV se complete de maneira ideal, mas não foi possível correlacionar a atividade desta enzima com os processos de aquisição de membranas do vírus a partir do hospedeiro como havia sido proposto.

Palavras-chave: *Vaccinia virus*, fosfolipases, cPLA2, lípidos de membrana, morfogênese viral.

ABSTRACT

Vaccinia virus (VACV), the prototype virus of the *Poxviridae* family, is an enveloped virus that carries out its multiplicative cycle entirely in the cytoplasm of the host cell. Throughout its multiplication cycle, VACV produces two different types of virions that are classified according to the number of envelopes they present and their cellular location: intracellular mature viruses (IMVs), which have a single envelope, and the extracellular viruses (EVs), which have an additional lipid envelope. The existence of two enveloped VACV forms requires the host to undergo intense biogenesis and lipids rearrangement to meet the virus' demand for membrane lipids. Cytosolic phospholipase A2 (cPLA2) is a lipolytic enzyme that is involved in phospholipid turnover, membrane remodeling and second messenger production that act on cell signaling pathways and host immune response, and, for these reasons, it may be related with virions morphogenesis during the VACV multiplication cycle. In order to confirm this hypothesis, we initially evaluated whether the virus was able to modify the activation pattern (phosphorylation) of cPLA2 in the host cell. We verified that the virus induces an increase in the activation of this protein by a mechanism dependent on the activation of cell signaling pathways (mainly through the MEK/ERK pathway). Subsequently, cPLA2 activity was inhibited, in HeLa cells, by pharmacological mechanisms (using RSC-3388 inhibitor) or genetically (transfection of cells with interference RNA against the gene encoding this enzyme) and the VACV multiplication cycle was evaluated in these conditions. It was observed that the treatment of the cells with the RSC-3388 inhibitor resulted in a significant dose-dependent reduction in the viral titers obtained, but gene silencing with interfering RNA did not have the same effect. Finally, we evaluated by fluorescence microscopy whether there was any alteration in the cellular sublocalization pattern of P-cPLA2 in the condition of infection by VACV, but no modification in this pattern was observed. These results suggest that cPLA2 is required for the VACV multiplication cycle to be optimally completed, but it was not possible to correlate the activity of this enzyme with the virus' membrane acquisition process, as it was initially proposed.

Key words: *Vaccinia virus*, phospholipases, cPLA2, membrane lipids, viral morphogenesis.

I. INTRODUÇÃO

1. Os Poxvírus

1.1. Aspectos Históricos

Os vírus da família *Poxviridae*, também conhecidos como poxvírus, são um grupo de vírus com características comuns que exerceram, e ainda exercem, grande influência na história da humanidade e da ciência. O *Variola virus* (VARV), um dos vírus pertencentes a este grupo, foi o agente etiológico da varíola, uma doença grave, altamente contagiosa e letal, e ilustra a importância desses vírus.

O VARV circulou nas populações humanas por milhares de anos e foi a causa de diversas epidemias em diferentes regiões do planeta. Embora não se conheça o local de onde o vírus tenha se originado, registros da doença por ele causada foram feitos pelas grandes civilizações do passado, sendo encontradas evidências da circulação do VARV na China, Egito e Grécia antigas (Babkin & Babkina, 2015).

Acredita-se que ao longo dos séculos XI e XIII o *Variola virus* tenha sido introduzido na Europa, auxiliado pelas Cruzadas - guerras santas entre os cristãos da Europa ocidental e os povos muçulmanos do Oriente Médio pelo domínio da cidade sagrada de Jerusalém. Por volta dos anos 1500, a doença já era endêmica na maioria dos países europeus, acometendo todas as classes sociais, da plebe à nobreza. Ainda neste período, a doença foi introduzida na América do Sul pelos navegantes portugueses e espanhóis, contribuindo para a dizimação das populações nativas desse continente. Na América do Norte, a primeira epidemia registrada ocorreu nos Estados Unidos, no estado de Massachusetts, entre 1617 e 1619, e, em 1789, a varíola foi introduzida na Oceania, tornando-se uma doença de características epidêmicas globais (Thèves et al., 2016).

A varíola permaneceu endêmica em diversos países até o início do século XX, quando, em 1967, a Organização Mundial de Saúde (OMS) iniciou um programa para sua erradicação. O programa, que consistiu em uma campanha de vacinação em massa associado à um intenso sistema de vigilância, teve duração de 13 anos e levou à erradicação da doença em 1979 (Thèves et al., 2016; WHO, 2016).

A erradicação do VARV foi possível, entre outros motivos, graças aos esforços para se controlar a doença realizados pelo médico e naturalista inglês Edward Jenner, no século XVIII. Após observar que ordenhadores que entravam em contato com vacas acometidas pela varíola bovina (ocasionada pelo *Cowpox virus* - CPXV - outro vírus pertencente à família *Poxviridae*, gênero *Orthopoxvirus*) permaneciam protegidos da varíola humana, Edward Jenner propôs que a infecção por um poxvírus mais brando poderia conferir proteção cruzada contra o VARV (Tan, 2004; Buller & Bray, 2004).

Em 1796, para testar sua hipótese, Jenner inoculou material biológico isolado de uma ordenhadora acometida pela varíola bovina em um garoto de 8 anos de idade, posteriormente desafiando-o com o VARV, mas a varíola humana não se desenvolveu na criança (TAN, 2004). Esse processo ficou conhecido como vacinação (do latim *vacca*), e, com esta realização singular, foram poupadas as vidas de cerca de 60 a 100 milhões de indivíduos que poderiam vir a morrer pela doença nos séculos seguintes (McFadden, 2010).

Durante o século XIX, o uso da vacina de Jenner contra a varíola se espalhou pelo mundo. Curiosamente, em 1939, Allan Downie, da Universidade de Liverpool na Inglaterra, ao analisar o vírus contido nas amostras vacinais, percebeu que este diferia geneticamente tanto do VARV quanto do CPXV original, denominando a nova espécie descoberta de *Vaccinia virus* (VACV) (Tucker, 2001).

Após sua utilização como vetor vacinal para a erradicação do vírus da varíola, o VACV tornou-se modelo para os primeiros estudos biológicos e bioquímicos dos vírus. Também foi o primeiro vírus animal a ser purificado, visualizado por microscopia eletrônica, cultivado em cultura de tecidos e utilizado como modelo em ensaios de titulação, tornando-se o vírus protótipo da família *Poxviridae* (Fenner, 2000; Moss, 2013).

1.2. A Família *Poxviridae* – Características Gerais e Taxonomia

Os vírus da família *Poxviridae* possuem diversas características comuns. Suas partículas virais são grandes, envelopadas e de morfologia complexa, podendo atingir até 300nm de comprimento. Possuem genoma não segmentado, constituído por DNA fita dupla linear não infeccioso, rico em bases A-T, que varia em tamanho de 130 a 300kpb e codifica para aproximadamente 200 genes. Outra característica comum aos vírus desta família é o fato de todos completarem seu ciclo de multiplicação inteiramente no citoplasma das células hospedeiras (Moss, 2013).

Morfologicamente, seus vírions possuem formato de barril, são envoltos por uma membrana lipoprotéica externa e possuem um nucleocapsídeo, ou cerne, em formato de haltere, que abriga o genoma viral (Figura 1). Entre as concavidades do nucleocapsídeo e a membrana encontram-se corpúsculos laterais de natureza proteica e de função imunomodulatória (Schmidt et. al., 2013). Durante o processo de morfogênese, três tipos de partículas virais são formadas: os vírus maduros intracelulares (IMVs), os vírus associados à células (CEVs) e os vírus envelopados extracelulares (EEVs) (Moss, 2013). As particularidades destes diferentes vírions serão descritas em maiores detalhes na seção de ciclo de multiplicação e morfogênese do vírus.

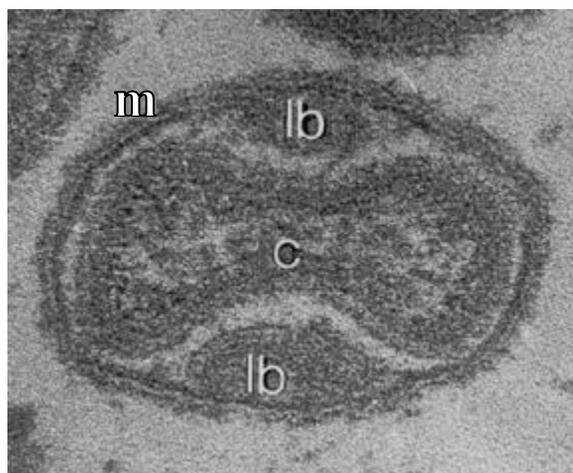


Figura 1 - Micrografia eletrônica ilustrando a estrutura de um Poxvírus. No centro, identificado pela letra "c", encontra-se o cerne, ou nucleocapsídeo, com seu típico formato em haltere. As regiões eletrodensas na imagem, identificadas como "lb", compõem os corpúsculos laterais (do inglês *lateral bodies*) e a região indicada pela letra "m" corresponde à membrana externa (Modificado de http://www.virology.net/big_virology/BVDNApox.html. Acesso em 04/10/2015).

Geneticamente, o VACV apresenta as mesmas características dos demais poxvírus. Seu material genético é composto por DNA fita dupla, que apresenta as extremidades ligadas entre si covalentemente por alças laterais. O genoma pode ser dividido didaticamente em regiões de acordo com a função dos genes transcritos: as extremidades contêm genes pouco conservados entre os vírus da família e que estão relacionados principalmente com o espectro de hospedeiros acometidos, expressão de fatores de virulência e de mecanismos imunomodulatórios, e a região central do genoma é bastante conservada e codifica para os genes essenciais à replicação, como aqueles relacionados à replicação do DNA e à produção de proteínas estruturais e enzimas (Figura 2) (Moss, 2013).

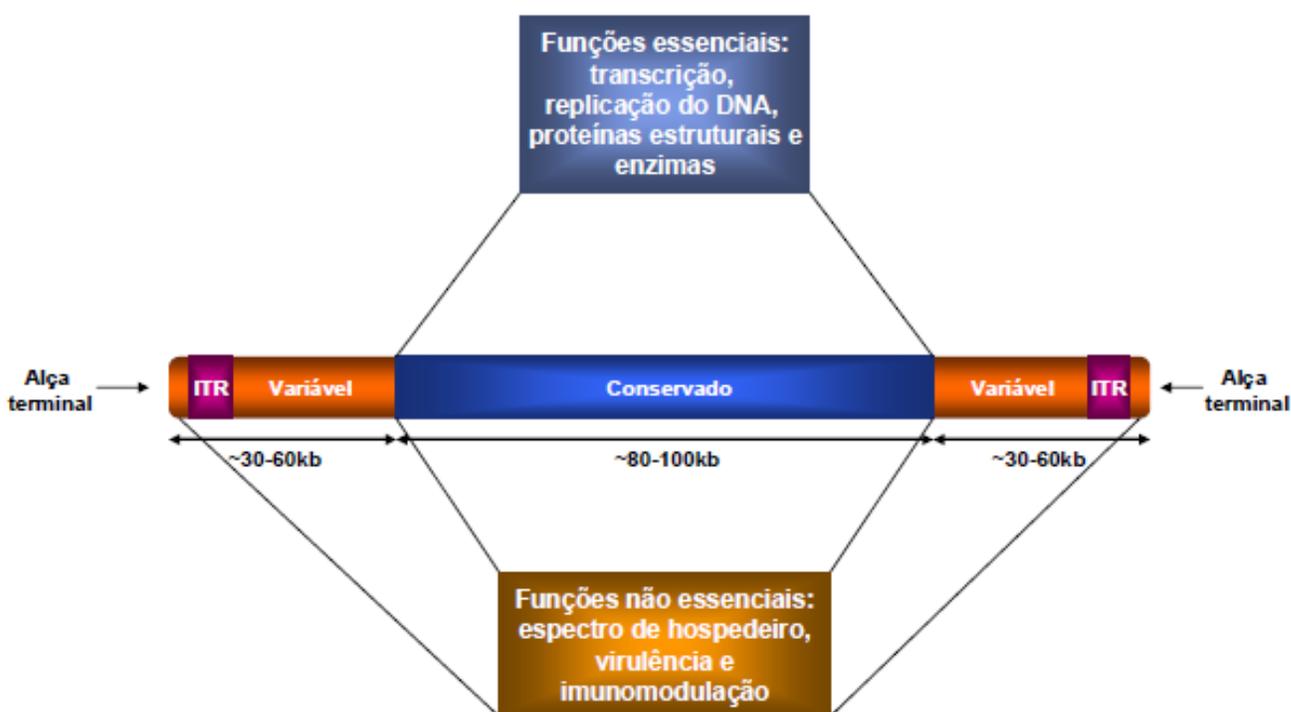


Figura 2 - Esquema demonstrando a organização do genoma dos Poxvírus. A região central do genoma é bem conservada e possui genes que codificam para funções essenciais à multiplicação viral, enquanto as extremidades são bastante variáveis e possuem genes que codificam para funções não essenciais. Nas porções mais distais do genoma encontram-se regiões contendo repetições terminais invertidas (ITRs) e as alças terminais (Modificado de Smith; McFadden, 2002).

Segundo o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV), os poxvírus são agrupados em duas subfamílias, a *Chordopoxvirinae* e a *Entomopoxvirinae* (ICTV, 2015), sendo a primeira constituída por vírus que infectam vertebrados e a segunda por vírus que infectam insetos. O sequenciamento de DNA e análises por bioinformática confirmam a relação entre as duas subfamílias, diferenciando-as de outros vírus de DNA dupla fita como *Asfarviridae*, *Ascoviridae*, *Iridoviridae*, *Phycodnaviridae*, *Mimiviridae* e *Marseillevirus* (Moss, 2013).

Dentro da subfamília *Chordopoxvirinae*, o gênero *Orthopoxvirus* é o mais extensivamente estudado e abriga 10 espécies de vírus conhecidas até o momento. Compõe este gênero os já mencionados *Variola virus*, *Vaccinia virus* e *Cowpox virus*, mas também o *Camelpox virus*, o *Ectromelia virus*, o *Monkeypox virus*, o *Raccoonpox virus*, o *Skunkpox virus*, o *Taterapox virus* e o *Volepox virus* (Tabela 01). Todos estes vírus são antigenicamente relacionados (Haller et al., 2014, ICTV, 2015, Jacobs, 2009).

Tabela 1 – Classificação dos poxvírus

Subfamília	Gênero	Número de espécies	Protótipo
<i>Chordopoxvirinae</i>	<i>Avipoxvirus</i>	10	<i>Fowlpox virus</i>
	<i>Capripoxvirus</i>	3	<i>Sheeppox virus</i>
	<i>Centapoxvirus</i>	1	<i>Yokapox virus</i>
	<i>Cervidpoxvirus</i>	1	<i>Mule deerpox virus</i>
	<i>Crocodylidpoxvirus</i>	1	<i>Nile crocodilepox virus</i>
	<i>Leporipoxvirus</i>	4	<i>Myxoma virus</i>
	<i>Molluscipoxvirus</i>	1	<i>Molluscum contagiosum virus</i>
	<i>Orthopoxvirus</i>	10	<i>Vaccinia virus</i>

	<i>Parapoxvirus</i>	4	<i>Orf virus</i>
	<i>Suipoxvirus</i>	1	<i>Swinepox virus</i>
	<i>Yatapoxvirus</i>	2	<i>Yaba monkey tumor virus</i>
	Indeterminado	2	Squirrelpox virus
<i>Entomopoxvirinae</i>	<i>Alphaentomopoxvirus</i>	7	<i>Melolontha melolontha entomopoxvirus</i>
	<i>Betaentomopoxvirus</i>	16	<i>Amsacta moorei entomopoxvirus</i>
	<i>Gammaentomopoxvirus</i>	6	<i>Chironomus luridus entomopoxvirus</i>
	Indeterminado	2	-

Fonte: Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV), 2017

1.3. Ciclo de Multiplicação e Morfogênese do *Vaccinia virus*

O ciclo de multiplicação do VACV inicia-se com o reconhecimento e posterior ligação de proteínas da superfície do vírion a proteínas de membrana da célula hospedeira. Os receptores celulares envolvidos neste processo permanecem desconhecidos, e as proteínas virais responsáveis por esta interação variam com a natureza da partícula infecciosa (IMVs ou EVs). Após a interação entre essas proteínas, segue a penetração do vírus no citoplasma, evento que pode ocorrer por fusão direta na membrana plasmática ou macropinocitose, quando a partícula infecciosa for um IMV, ou por dissolução do envelope mais externo seguido de fusão direta na membrana plasmática ou macropinocitose, quando a partícula em questão for um CEV ou um EEV (Roberts & Smith, 2008).

Ao penetrar no citoplasma das células hospedeiras, o nucleocapsídeo viral é transportado por microtúbulos até as regiões onde será realizada a transcrição gênica. O nucleocapsídeo do VACV contém todo o aparato enzimático necessário para dar início ao processo de transcrição gênica viral, que pode ser dividido em três etapas: transcrição de genes precoces, transcrição de genes intermediários e a transcrição de genes tardios (Moss, 2013).

A transcrição de genes precoces leva à produção de proteínas envolvidas na degradação do cerne viral, na replicação do DNA, na biossíntese de nucleotídeos, evasão da resposta imune do hospedeiro e, por último, na transcrição dos genes intermediários. Os genes intermediários só começam a ser expressos após o desnudamento do cerne viral, processo que resulta na liberação do material genômico no citoplasma. Esses genes codificam os fatores de transcrição dos genes tardios. Os genes tardios, por sua vez, são responsáveis pela codificação das proteínas estruturais envolvidas na morfogênese e proteínas envolvidas na transcrição dos genes precoces, que serão encapsuladas durante a morfogênese (Moss, 2013).

Após a transcrição dos genes tardios inicia-se o processo de morfogênese do vírus, um processo complexo e que resulta na formação de três partículas virais distintas: os IMVs, os CEVs e os EEVs (Figura 3). Estas partículas virais possuem diferenças estruturais importantes e que estão intimamente relacionadas com a imunogenicidade do vírus, capacidade de disseminação e infecção do hospedeiro (Smith et al., 2002).

A morfogênese do VACV ocorre em locais no citoplasma denominados fábricas virais (Figura 4). Nesses locais pode-se observar por microscopia eletrônica estruturas no formato de meia lua denominadas crescentes, que são compostas por lipídios e proteínas virais. Conforme o processo de morfogênese avança, as crescentes se fecham, dando origem a estruturas circulares que recebem o nome de vírus imaturos, ou IVs. Os vírus imaturos sofrem clivagem proteolítica de suas proteínas estruturais e a condensação de proteínas e enzimas codificadas pelos genes tardios em seu cerne viral, dando origem aos IMVs (Roberts & Smith, 2008).

Os IMVs são envoltos por uma única membrana lipoproteica e constituem cerca de 90% da progênie viral. Estes vírions permanecem no meio intracelular até o momento em que ocorre a lise da célula, quando, então, são liberados para o meio extracelular. Os IMVs são extremamente imunogênicos devido ao fato de possuírem grande parte de suas proteínas de reconhecimento e ligação expostas, sendo facilmente neutralizados por anticorpos ou pelo sistema do complemento (Smith et al., 2002).

A formação das demais partículas virais, os CEVs e os EEVs, ocorre posteriormente e é dependente da formação dos IMVs (Figura 4). Sua formação envolve o transporte de IMVs das fábricas virais para a rede do complexo trans-Golgi ou para endossomos via microtúbulos, onde adquirem dois envelopes lipoproteicos adicionais. Os vírions que adquirem estes envelopes são denominados vírions intracelulares envelopados, ou IEVs (do inglês, *Intracellular Enveloped Virion*), e constituem uma fase intermediária da formação dos EEVs e CEVs. Os envelopes extras adquiridos conferem características antigênicas diferenciadas a estas partículas, pois grande parte das proteínas que antes estavam na superfície do IMV passam a estar encobertas, e novas proteínas, exclusivas do envelope mais externo, passam a recobrir a partícula viral (Roberts & Smith, 2008).

Os IEVs são transportados do sítio onde adquiriram os envelopes lipídicos adicionais até a superfície celular pela interação entre a proteína viral A36, presente no envelope mais externo, e microtúbulos, mais especificamente com a proteína motora cinesina. Próximo à superfície celular, cinases celulares da família Src fosforilam a proteína A36, resultando no desprendimento do IEV dos microtúbulos e possibilitando a fusão do seu envelope mais externo à membrana plasmática. A fusão do envelope viral à membrana celular libera o vírion no meio extracelular, dando origem aos vírions extracelulares (EEVs e CEVs), e posiciona a proteína A36 na membrana celular, logo abaixo do vírion (Smith et al., 2002).

Ao atingirem o meio extracelular, os IEVs possuem dois destinos diferentes: uma porção permanece aderida à membrana celular, passando a ser denominada de vírion extracelular associado à célula, ou CEV (do inglês *Cell-associated Enveloped Virion*) e a outra porção, composta por aquelas partículas que são completamente liberadas para o meio externo, recebe a denominação de vírions envelopados extracelulares, ou EEVs (do inglês *Extracellular Enveloped Virion*). No que se refere ao mecanismo de disseminação do VACV, CEVs são responsáveis pela disseminação célula a célula por meio da formação de caudas de actina e os EEVs são responsáveis pela disseminação sistêmica (Roberts & Smith, 2008).

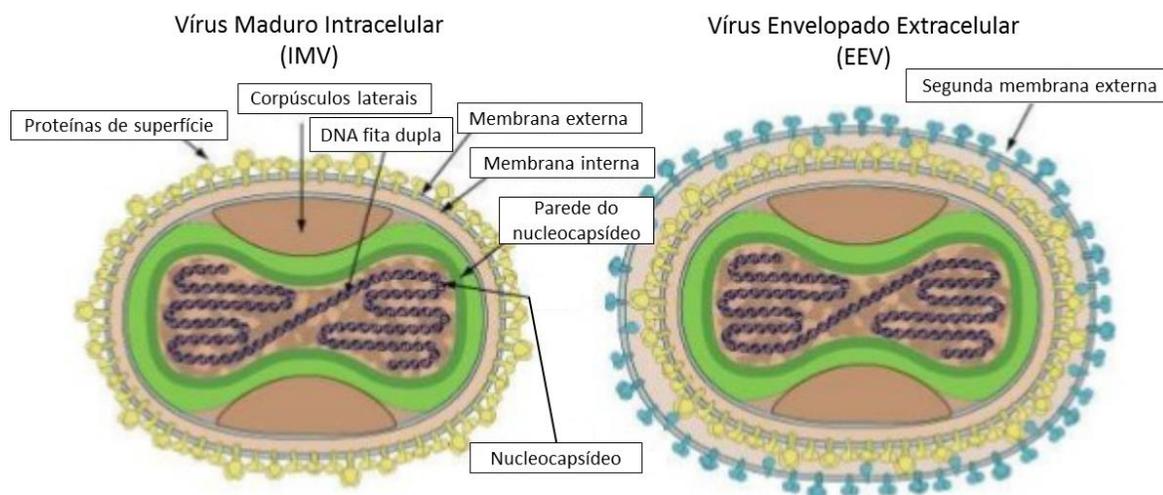


Figura 3 – Esquema demonstrando os principais elementos estruturais das duas partículas virais resultantes do processo de morfogênese do *Vaccinia virus*. À esquerda está representada a estrutura do IMV e à direita a estrutura do EEV. É importante notar que os EEVs são morfologicamente muito similares aos IMVs; o que os difere é o envelope lipoproteico extra presente nos EEVs e que recobre as proteínas de superfície comuns a ambos os vírions. CEVs e EEVs são estruturalmente indistinguíveis (Fonte: <http://pt.slideshare.net/HafezAISumairi/poxviridae-reproduction-ppt>. Acesso em 16/10/2014).

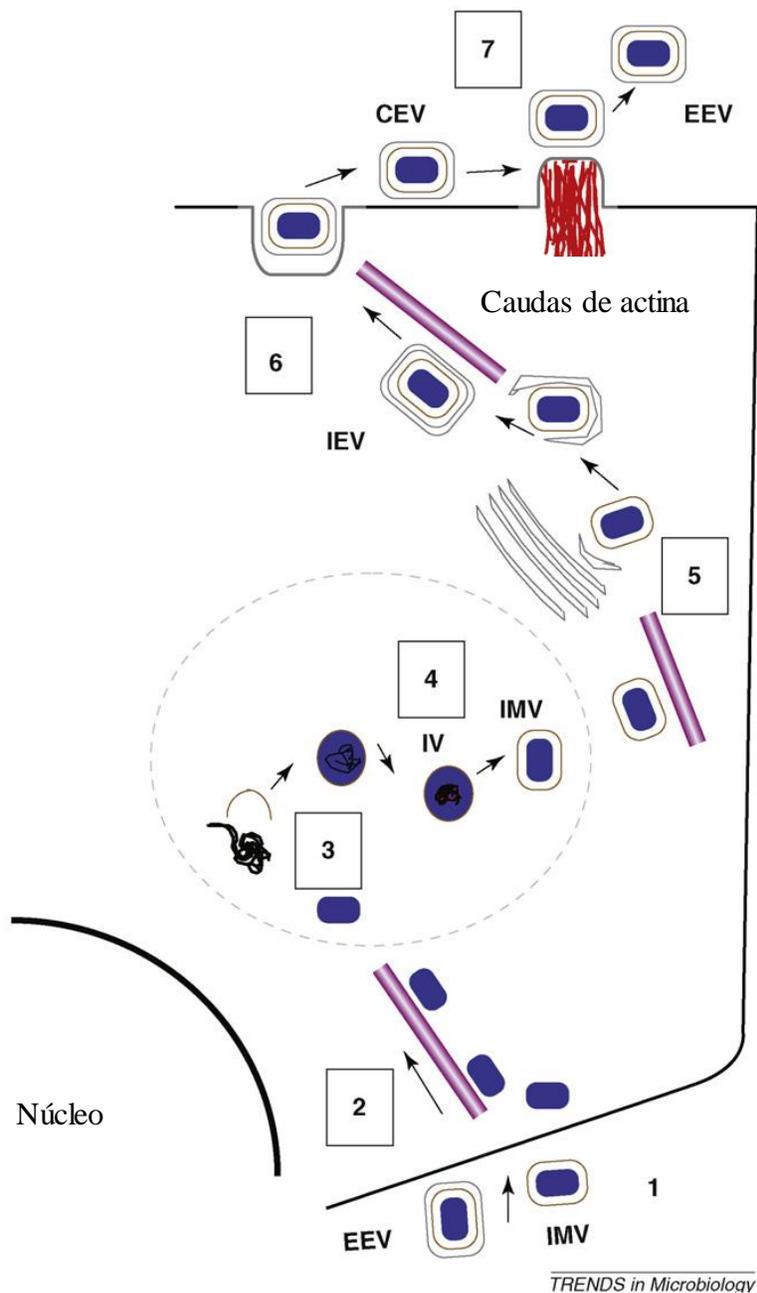


Figura 4 - Esquema demonstrando o ciclo de multiplicação e a morfogênese do VACV – Como apresentado no esquema, em (1) ocorre a entrada da partícula viral no citoplasma da célula hospedeira. A partícula infecciosa pode ser um EEV/CEV ou um IMV. Em (2) ocorre o transporte do nucleocapsídeo para as fábricas virais via microtúbulos, onde acontecerão as etapas de transcrição gênica e a morfogênese das novas partículas virais. (3) representa o momento entre a transcrição dos genes precoces e a formação das crescentes virais. Em (4) observa-se a evolução das crescentes nos vírions imaturos (IV) e destes em vírions maduros intracelulares (IMV). (5) representa a etapa em que os IMVs são transportados via microtúbulos até o complexo trans-Golgi, onde os envelopes lipoproteicos adicionais serão adquiridos, dando origem aos vírions envelopados intracelulares (IEVs). Em (6) pode-se observar o transporte dos IEVs até a superfície celular, também via microtúbulos, onde finalmente darão origem aos EEVs ou CEVs, que estão representados por (7). Os CEVs são propelidos para o meio extracelular via caudas de actina. (Modificado de Roberts & Smith, 2008).

1.4. Biogênese de Membranas dos Poxvírus

O primeiro estágio da morfogênese dos poxvírus identificado por microscopia eletrônica foi a formação de crescentes nas fábricas virais. Estas estruturas são compostas principalmente pelas proteínas virais A14 e A17, encontradas ancoradas na porção lipídica da membrana, e pela proteína D13L, responsável pela formação de um suporte, ou arcabouço proteico, sobre o qual são depositados os lipídios de membrana. Desde a época da descoberta das crescentes por Dales, na década de 60, a origem de seus lipídeos tem sido motivo de debate entre os poxvirologistas (Dales & Mosbach, 1968; Chlanda et al., 2009; Moss, 2016).

Dales e colaboradores propuseram que os lipídios depositados sobre o arcabouço proteico tinham origem *de novo*, devido ao fato de não ser possível observar continuidade entre estes lipídeos e aqueles presentes em outras organelas celulares. Mas nem todos os virologistas concordavam com esta proposição, uma vez que é um consenso na biologia celular que todas as membranas são formadas a partir de estruturas membranosas já existentes, que se fecham sobre elas mesmas em processos específicos de fusão e fissão lipídicos (Locker et al., 2013). Além disto, a continuidade entre membranas de estruturas distintas poderia ser apenas transiente, difícil de ser analisada pelas técnicas de microscopia eletrônica disponíveis ou até mesmo destruídas ao longo do processamento das amostras (seja pelo uso de fixadores químicos, pela desidratação das amostras ou mesmo pela coloração com metais pesados). Para estes virologistas, os lipídeos presentes nas crescentes e nos IVs deveriam se originar no retículo endoplasmático ou no complexo de Golgi (Dales & Mosbach, 1968; Chlanda et al., 2009; Moss, 2016).

Atualmente, com o uso de técnicas mais modernas de microscopia eletrônica e de geração de imagens (como a crio-microscopia e a tomografia eletrônicas), aliado à descoberta de várias proteínas não estruturais implicadas na formação das crescentes virais e dos IVs – as VMAPs, a teoria mais aceita para a origem dos lipídeos depositados nas crescentes é a de que eles derivam de outros compartimentos celulares, principalmente do retículo endoplasmático (Chlanda et al., 2009; Maruri-Avidal et al., 2013; Moss 2016).

As VMAPs (do inglês, *Viral Membrane Assemble Proteins*) identificadas até o momento são a A6, A11, A30.5, H7 e L2. Estas proteínas são conservadas em todos os *Chrodopoxvirus* e, com exceção da L2, são todas expressas exclusivamente após a replicação do genoma. A análise

de mutantes letais condicionais das VMAPs demonstrou a necessidade das mesmas para a montagem dos vírus imaturos e permitiu a proposição de um novo modelo de biogênese de membranas para estes vírus (Maruri-Avidal et al., 2013; Moss 2016).

Bernard Moss, com base nos estudos realizados por Maruri-Avidal, propôs, em 2016, que durante a infecção por um VACV selvagem, as VMAPs atuariam juntamente com proteínas celulares para ocasionar interrupções ou “quebras” transientes nas membranas do retículo endoplasmático. Após causar essas “quebras” na membrana, estas proteínas se ligariam às extremidades livres destes fragmentos lipídicos, estabilizando-os. A deposição destes fragmentos sobre o arcabouço proteico criado pelas proteínas D13L ocorreria posteriormente, pela interação entre estas proteínas e a porção N-terminal da proteína A17, presente nos fragmentos lipídicos. A partir deste ponto ocorreria a elongação desses fragmentos de membrana para a formação, inicialmente das crescentes e, posteriormente, dos IVs (Figura 5) (Moss, 2016).

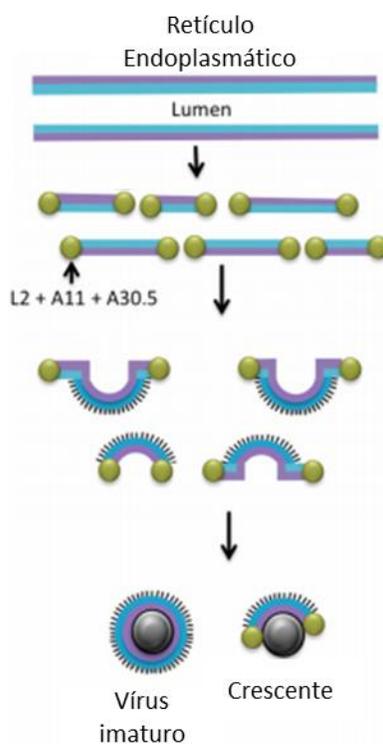


Figura 5 – Modelo de biogênese de membranas do VACV proposto por Bernard Moss – de acordo com Moss, as VMAPs, representadas no esquema como esferas verdes, seriam responsáveis, juntamente com outras proteínas celulares, por fragmentar a membrana do retículo endoplasmático. Após a ruptura do retículo, os pequenos fragmentos gerados seriam estabilizados também pelas VMAPs, que se associariam às extremidades livres destes fragmentos. A formação das crescentes ocorreria após a interação dos novos fragmentos lipídicos com a proteína de suporte D13L (Modificado de Moss, 2016).

2. As Fosfolipases

2.1. Características Gerais

As fosfolipases são um grupo de enzimas amplamente disseminado na natureza, sendo encontradas em diversos organismos, como bactérias, leveduras, plantas, animais e até mesmo em vírus. Estas enzimas hidrolíticas são responsáveis por catalisar a clivagem dos fosfolipídios presentes nas membranas celulares, convertendo-os em mediadores lipídicos ou segundos mensageiros, como o ácido aracdônico (AA), o diacilglicerol e as colinas, que exercem importantes papéis no metabolismo e na sobrevivência celular. A clivagem dos fosfolipídios, além de liberar esses mediadores lipídicos, também causam alterações nas características físico-químicas das membranas, como fluidez, curvatura e na composição das mesmas. Dentre os processos biológicos afetados pela ação das fosfolipases estão o tráfego de membranas, a transdução de sinais, a proliferação celular e a apoptose (Menzel et al., 2014; Cocco et al., 2015; AOCS, 2016).

Os fosfolipídios são a principal classe de lipídeos que constitui as membranas celulares. Estas moléculas possuem uma estrutura complexa, resultado da combinação de diversos grupos polares à longas cadeias de ácidos graxos, mas podem ser genericamente representados como sendo constituídos de uma molécula de glicerol-3-fosfato central esterificada nos carbonos 1 (*sn-1*) e 2 (*sn-2*) em ácidos graxos não-polares e a um grupo polar em sua região fosforil. Tipicamente, a região *sn-1* é ocupada por ácidos graxos saturados, ao passo que a região *sn-2* é ocupada por ácidos graxos insaturados (AOCS, 2016).

As fosfolipases são agrupadas em 4 famílias de acordo com a ligação química dos fosfolipídios que elas são capazes de hidrolisar. As enzimas denominadas fosfolipase A são capazes de clivar as ligações éster nas posições *sn-1* (fosfolipase A₁ – PLA1) ou *sn-2* (fosfolipase A₂ – PLA2). As enzimas capazes de clivar ambas as posições (*sn-1* e *sn-2*) recebem a denominação fosfolipase B (PLB). As que são capazes de clivar a ligação de glicerofosfato são chamadas fosfolipase C (PLC) e aquelas capazes de remover o grupamento polar dos fosfolipídios recebem o nome de fosfolipase D (PLD) (Figura 6) (AOCS, 2016).

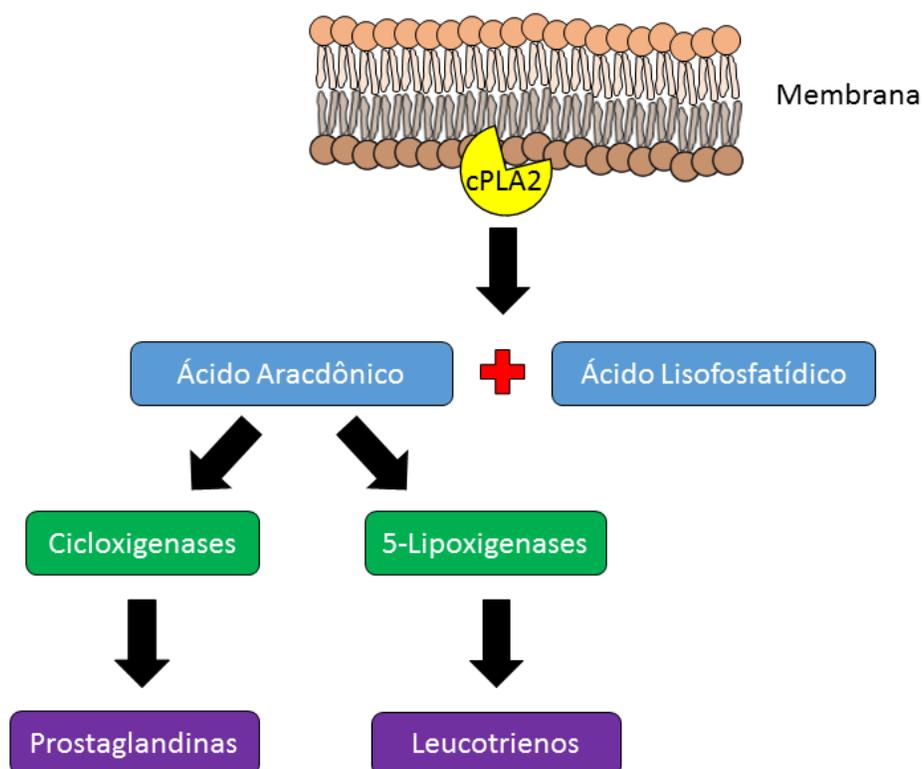


Figura 7 – Representação esquemática da atuação das cPLA2 – As cPLA2 clivam os fosfolipídios de membrana na posição *sc-2* liberando ácido aracdônico e ácido lisofosfatídico no citoplasma celular. Ambas as moléculas liberadas podem atuar como segundos mensageiros lipídicos. O ácido aracdônico pode, ainda, alimentar as vias das cicloxigenases e das lipoxigenases, gerando prostaglandinas e leucotrienos que atuam de modo parácrino, gerando dor e inflamação, respectivamente. Modificado de AOCS.

Fonte: <http://lipidlibrary.aocs.org/Biochemistry/content.cfm?ItemNumber=39190>. Acesso em 09/03/2017.

A cPLA2 é encontrada principalmente no citoplasma celular, possui cerca de 85 kDa de massa molecular e sua regulação dá-se, principalmente, pela variação nos níveis citoplasmáticos de Ca^{+2} e pela fosforilação dos resíduos S505 e S727 realizadas pelas MAPKs MEK/ERK, p38 e MNK1. Estudos recentes indicam também a participação de JNK neste processo. A fosforilação da cPLA2 está diretamente relacionada com sua ativação, mas é importante mencionar que mesmo na ausência deste evento a enzima apresenta atividade catalítica, mas a níveis muito baixos, o que sugere a existência de outros mecanismos de regulação (Figura 8) (Lin et al., 1993; Kramer et al., 1996; Hefner et al., 2000; Leslie, 2015).

A ativação das cPLA2 pelo cálcio (Ca^{2+}) dependem da concentração deste íon no citoplasma. O aumento desta concentração resulta na translocação das cPLA2 do citoplasma para as membranas intracelulares, evento que ocorre após a ligação do íon à região C2 da proteína, localizada próximo ao N-terminal da mesma, permitindo que as cPLA2 penetrem nas bicamadas lipídicas de membrana. O domínio catalítico da enzima é, então, posicionado e estabilizado na membrana por um mecanismo independente do Ca^{2+} (evento dependente, em parte, do resíduo de W484). As cPLA2 translocam-se preferencialmente para o complexo de Golgi, e em concentrações mais altas para o retículo endoplasmático e membrana nuclear (Figura 8) (Leslie, 2015).

Em adição a fosforilação, a atividade das cPLA2 também é regulada pela presença de resíduos básicos no domínio catalítico da proteína que constituem sítios de ativação por polifosfoinosítídeos. Os resíduos básicos são necessários para a habilidade das cPLA2 em hidrolisar os fosfolipídios e liberar AA nas células, mas não são essenciais para a translocação da enzima para as membranas celulares (Tucker, 2009; Leslie, 2015).

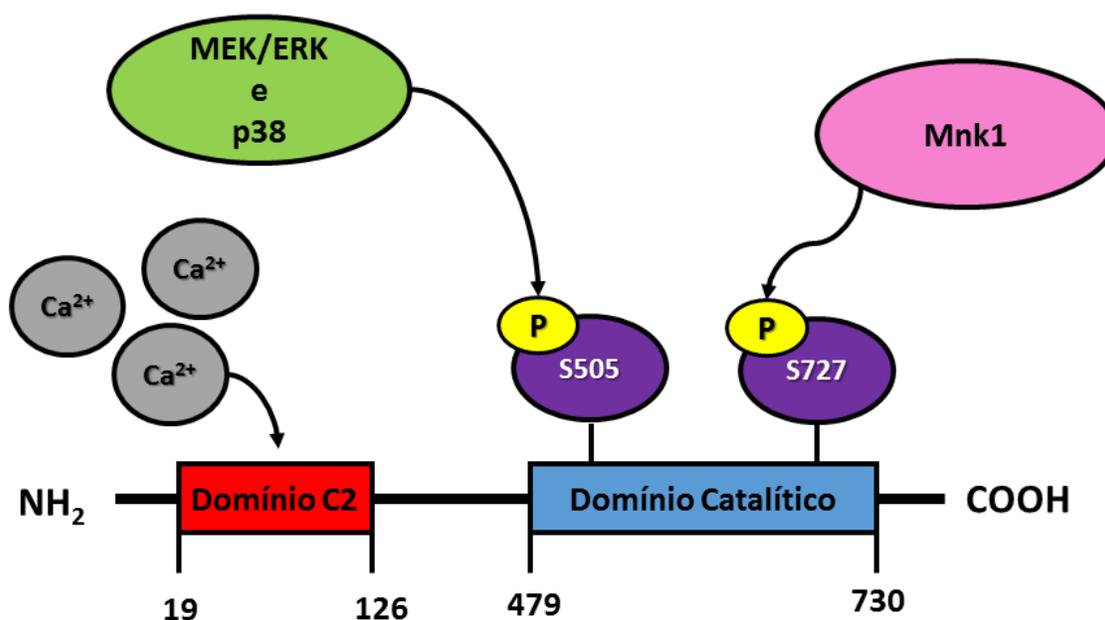


Figura 8 – Esquema simplificado da estrutura linear da cPLA2. A cPLA2 é constituída por aproximadamente 749 aminoácidos e possui 2 domínios principais. O domínio C2, próximo a região N-terminal, é sensível a variações na concentração de Ca^{2+} , sendo ativado pelo aumento na concentração citoplasmática destes íons. Este domínio é responsável pela translocação da cPLA2 do citoplasma em direção às membranas celulares. O outro domínio possui função catalítica, e é regulado principalmente via fosforilação pelas MAPKs nos resíduos de serina 505 e 727. A fosforilação desses resíduos relaciona-se com a ativação efetiva deste domínio, permitindo que a clivagem dos fosfolipídios de membrana e a liberação de AA e ácido lisofosfatídico. Modificado de: <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/PLA2G4AID41733ch1q31.html>

As enzimas que compõem a família das cPLA2 possuem papel na regulação do tráfego intracelular de membranas, participando na formação de transportadores a partir da membrana doadora. A cPLA2 está relacionada com a formação de membranas tubulares que conectam o retículo endoplasmático, o compartimento intermediário do Golgi e o complexo de Golgi. Além disso, estas fosfolipases participam na manutenção da estrutura do complexo de Golgi e do transporte que ocorre entre as cisternas desta organela (Leslie, 2015).

2.3. Fosfolipases e Vírus

Diversos estudos demonstram a relação existente entre os vírus envelopados e as fosfolipases. Em alguns casos, estas proteínas podem atuar diretamente sobre os vírus, desestruturando seus envelopes e, conseqüentemente, impedindo que o ciclo de multiplicação dos mesmos prossiga normalmente. O estudo realizado por Muller e colaboradores exemplifica bem essa interação. Neste estudo, a fosfolipase A2 secretada isolada do veneno de serpentes foi testada contra vírus envelopados e não envelopados, e ação virucida foi observada contra *Dengue virus*, *Rocio virus*, *Oropouche virus* e *Mayaro virus*. O *Coxsackie B5 virus*, exemplar de vírus não envelopado utilizado no estudo, não sofreu nenhuma alteração em seu ciclo multiplicativo após incubação com a enzima (Muller et al., 2014).

Relações de dependência entre vírus e as fosfolipases de seus hospedeiros também já foram descritas. O estudo realizado por Menzel e colaboradores demonstrou que o *Dengue virus* e o vírus da hepatite C, ambos da família *Flaviviridae*, necessitam que a cPLA2 de seus hospedeiros esteja ativada para que sua morfogênese ocorra normalmente. Na ausência de cPLA2 ativada, foi verificada uma redução no número de partículas virais formadas que se associavam a vesículas lipídicas necessárias para a formação das partículas envelopadas, o que resultava em uma menor quantidade de partículas liberadas após o término do ciclo de multiplicação. Também foi verificado um aumento na proporção de partículas defectivas geradas ao fim do processo multiplicativo (Menzel et al., 2012).

Alguns vírus envelopados mais complexos são capazes de codificar uma “fosfolipase” própria (ou proteínas com domínios catalíticos de fosfolipases). Este é o caso do VACV, que possui em sua proteína F13L o domínio HKD, de 17 aminoácidos. Este domínio, composto pelos aminoácidos histidina, lisina e ácido aspártico, apresenta homologia com o domínio catalítico das

fosfolipases D, que possuem funções bem definidas na biogênese e fusão de membranas. Curiosamente, análises iniciais da atividade de fosfolipase deste domínio demonstrou similaridades com as atividades exercidas pelas PLA1s, PLA2s e PLCs, mas não com PLDs (Baek et al., 1997).

Estudos posteriores realizados por Husain e Moss demonstraram que a F13L exerce algumas funções atribuídas a fosfolipase D1. Por meio de experimentos utilizando inibidores específicos desta enzima, vírus deletados para F13L e vírus recombinantes super-expressando PLD1, estes pesquisadores concluíram que a proteína F13L atua, assim como a PDL1, estimulando a formação de vesículas lipídicas a partir do complexo de Golgi, facilitando o transporte de proteínas que estariam presentes neste complexo. Os estudos também avaliaram a importância da PLD1 e da F13L para a biologia do vírus, analisando as alterações ocorridas em seu ciclo de multiplicação na ausência de ambas as proteínas. Verificou-se que tanto a F13L quanto a PLD1 são importantes para a correta localização subcelular de proteínas virais como a B5, e para a formação das partículas duplamente envelopadas, EEVs e CEVs (Husain & Moss, 2001; Husain & Moss, 2002).

Ainda se tratando do VACV, estudos realizados por Oliver e colaboradores em 1992, e por Kim e colaboradores em 1995, demonstram a interação deste vírus com a fosfolipase C. Oliver e colaboradores observaram uma regulação negativa da PLC pelo VACV, ao medir os produtos resultantes da atividade desta enzima em células infectadas (principalmente o inositol fosfato e as concentrações intracelulares de Ca^{2+}), mas não foi capaz de identificar o mecanismo desta regulação. Kim, por sua vez, observou que a proteína VGF era capaz de ativar a PLC e aumentar os níveis de inositol fosfato e Ca^{2+} no citoplasma. Estes resultados contrastantes podem indicar a capacidade do vírus de regular a ativação da PLC tanto positiva quanto negativamente, dependendo do ambiente intracelular e da etapa em que se encontra o ciclo de multiplicação do vírus (Oliver et al., 1992; Kim et al., 1995).

Um exemplo bastante diferente dos apresentados anteriormente acerca da interação entre vírus e fosfolipases pode ser encontrado entre os vírus da família *Parvoviridae*. Estes vírus não são envelopados, mas ainda assim possuem um motivo catalítico muito similar ao das PLA2 (mais especificamente das PLA2 secretadas) em sua proteína de capsídeo VP1. O bocavírus humano, descoberto em 2005, é um dos exemplares dessa família que contém este motivo catalítico. Estudos

demonstraram que uma simples modificação de aminoácido neste motivo catalítico é capaz de eliminar a capacidade infectiva desses vírus. Acredita-se que a atividade desta enzima esteja relacionada com a transferência do genoma do vírus de endossomos e/ou lisossomos tardios para o núcleo da célula hospedeira, processo essencial para o início do processo de replicação (Zadori et al., 2001; Girod et al., 2002; Qu et al., 2008).

3. Proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPKs)

3.1. Características Gerais

A família das MAPKs (proteínas cinases ativadas por mitógenos) está envolvida em diferentes mecanismos de regulação celular, sendo ativadas por diversos estímulos, tais como fatores de crescimento, hormônios, citocinas e estresse ambiental. Esses sinais são transmitidos através de receptores presentes na superfície celular e coordenam diversas atividades celulares como expressão gênica, ciclo celular, metabolismo, motilidade, sobrevivência, apoptose e diferenciação (Yang et al., 2013).

As vias sinalizadoras das MAPKs estão organizadas em níveis compostos por três cinases conservadas evolutivamente e que atuam em sequência: uma MAPK, uma MAP2K (MAPK cinase) e uma MAP3K (MAPK cinase cinase) (Figura 9). As MAP3Ks são serina-treonina cinases ativadas através de fosforilação e/ou interação com GTPases em resposta a estímulos extracelulares. Quando ativadas, as MAP3K fosforilam e ativam uma MAP2K. As MAP2K, por sua vez, depois de ativadas pelas MAP3K, são responsáveis pela ativação das MAPKs. Após sua ativação, as MAPK fosforilam seus substratos em resíduos de serina ou treonina quando estes estão seguidos por resíduos de prolina, e possuem como substratos vários fatores de transcrição, MAPKAPKs (proteínas cinases ativadas por MAPK) ou outras proteínas, como as do citoesqueleto (Krishna & Narang, 2008; Morrison, 2012).

As MAPKs compõem várias vias de sinalizações distintas, dentre as quais as mais estudadas são a das proteínas cinases reguladas por sinais extracelulares (ERK1/2) e a das proteínas cinases ativadas por estresse (SAPKs): cinases c-Jun N-terminal (JNK) e cinases p38 (Yang et al. 2013). ERK1 e ERK2 são MAPKs bem caracterizadas que respondem a estímulos de crescimento, ao passo que JNKs e p38 são ativadas em resposta a uma variedade de estresses ambientais e

celulares, tais como mudanças na osmolaridade e metabolismo, danos ao DNA, choque térmico, citocinas inflamatórias, radiação UV e estresse oxidativo (Wada & Penninger, 2004; Morrison, 2012).

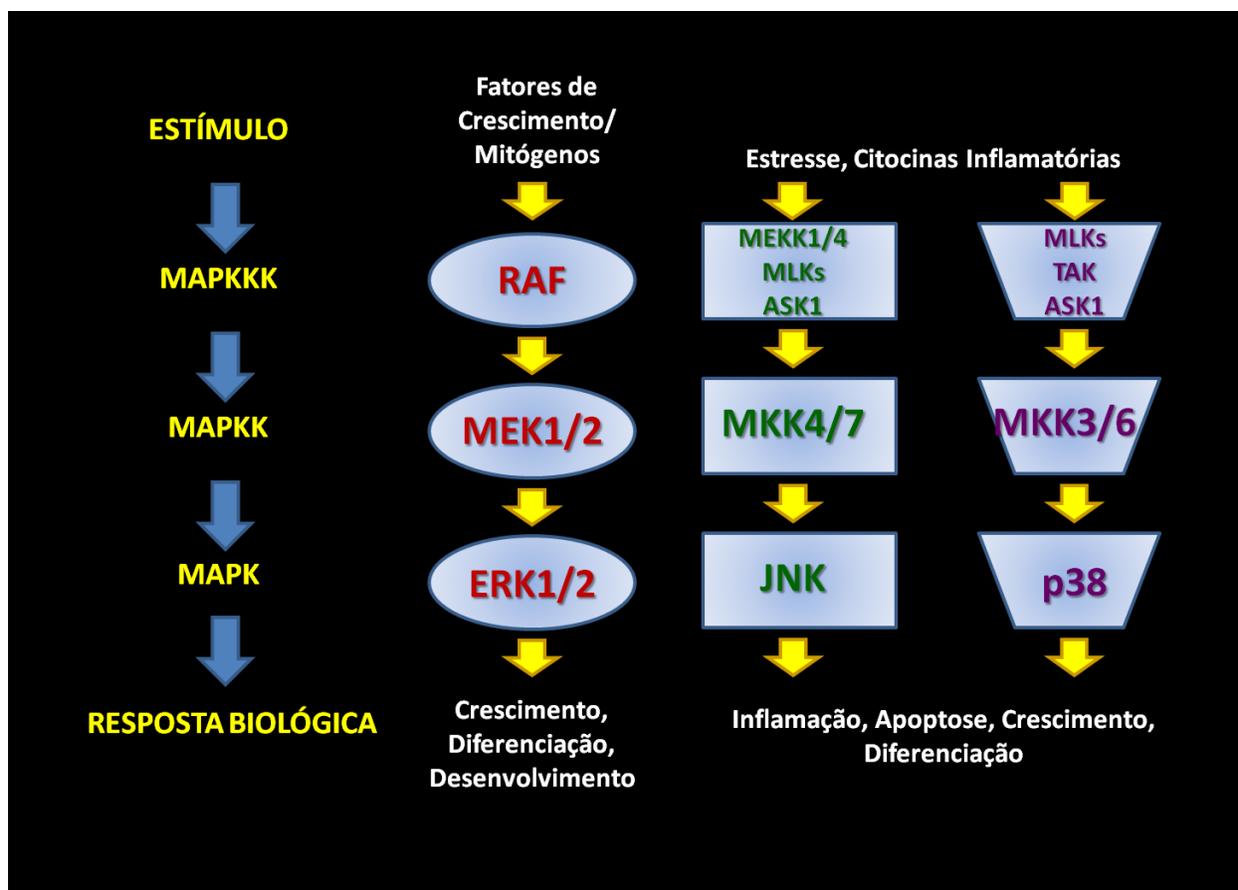


Figura 9 - Representação esquemática das cascatas de sinalização das MAP Cinases. As MAPKs estão organizadas em módulos de três proteínas cinases e consistem em uma MAPKKK (MAPK kinase kinase), ativando uma MAPKK (MAPK kinase), que por sua vez ativa uma MAPK (MAP kinase), o que resulta em uma resposta biológica específica. As vias que levam à ativação de ERK1/2, SAPK/JNK e da MAPK p38 são as mais bem estudadas. Fonte: adaptado de www.cellsignal.com.

3.2. A via das Proteínas Cinases Reguladas por Sinais Extracelulares (ERK)

ERK foi a primeira das MAPK a ter a via sinalizadora elucidada. Sua cascata sinalizadora 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 celulares. Sob certas condições, esta via pode também atuar na regulação de sobrevivência, apoptose, migração, determinação da morfologia e transformação (Shaul & Seger, 2007).

Geralmente, o sinal responsável pela ativação de ERK é transmitido via GTPases monoméricas (como por exemplo, Ras), que recrutam a MAP3K Raf para a membrana plasmática, onde esta será ativada. Outras MAP3K que podem ativar ERK são c-Mos, TPL-2 e MEKK-1/2/3. Uma vez ativadas, todas estas MAP3K transmitem o sinal através da fosforilação de MEK (quinase da MAPK ERK). ERK parece ser o único substrato fisiológico de MEK, atuando como um importante determinante da especificidade do sinal transduzido (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 grande 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) (Shaul & Seger, 2007; Krishna & Narang, 2008). Dentre as MAPKAPK fosforiladas por ERK destacam-se RSK (quinases da proteína ribossômica S6), MSK (quinases ativadas por mitógenos e estresse) e MNK (quinases que interagem com MAPK), que por sua vez são responsáveis por fosforilar um conjunto distinto de substratos (Figura 10) (Shaul & Seger, 2007).

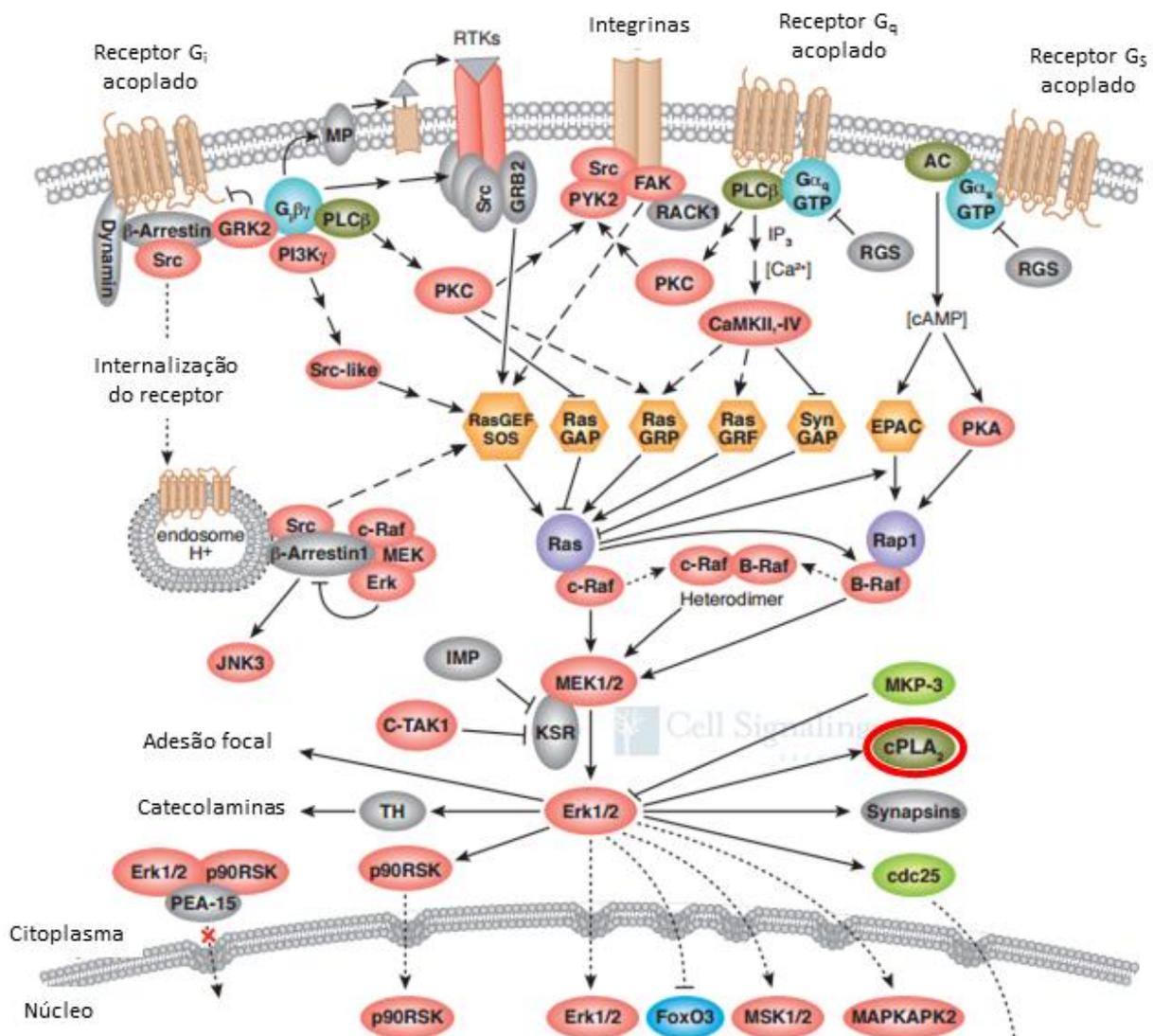


Figura 10 - Representação esquemática da via de ERK. Diferentes estímulos externos são percebidos por vários receptores celulares associados à membrana. Estes estímulos devem desencadear uma resposta celular específica, o que geralmente se dá via ativação ou repressão de genes localizados no núcleo. Para mediar esta comunicação é necessária a ativação sequencial de diversas proteínas, o que normalmente ocorre via fosforilação e em cascatas. Para a via de ERK, têm-se que uma grande gama de sinais extracelulares pode ser percebida pela célula via diversos receptores de membrana, o que culmina na ativação das MAP3Ks (principalmente Ras). Essas MAP3Ks, por sua vez, ativam MAP2Ks (MEK1/2), o que culmina na ativação da MAPK ERK. ERK, quando ativada, atua tanto no núcleo celular, como no citoplasma. A proteína cPLA₂ está destacada na figura por ser classicamente regulada por esta via. Fonte: adaptado de www.cellsignal.com.

II. JUSTIFICATIVA

Os vírus são parasitas intracelulares obrigatórios, o que significa que são estritamente dependentes de suas células hospedeiras para realizar seu ciclo de multiplicação e gerar uma progênie infecciosa. Como não possuem metabolismo próprio, os vírus dependem da maquinaria celular para a codificação de todas as moléculas que compõem a partícula viral, e isto inclui os lipídeos que constituem seus envelopes. Desta forma, os vírus devem adquirir seus envelopes lipídicos das células que os albergam, processo que ocorre invariavelmente por duas maneiras: por brotamento ou pelo englobamento da partícula viral por cisternas celulares.

Por meio do brotamento, os vírus adquirem um envelope ao atravessar a membrana plasmática da célula hospedeira em um processo muito similar ao observado para a formação de vesículas de transporte. Alternativamente, os vírus podem adquirir seus envelopes quando uma cisterna celular os envolve, em um processo semelhante à formação de um fagolisossomo, e que leva à aquisição de não apenas um, mas de dois envelopes lipídicos simultaneamente.

Independentemente do processo de aquisição do envelope pelos vírus, há um consenso na biologia celular de que as membranas não são formadas *de novo*, mas teriam origem a partir de outras estruturas membranosas já existentes. Neste contexto, as fosfolipases são extremamente importantes, uma vez que atuam nos fosfolipídios (principal classe de lipídeos que constitui as membranas), modificando-os em regiões específicas e, assim, alterando características físico-químicas das membranas, como fluidez, curvatura e composição lipídica.

Estudos diversos demonstram a importância das fosfolipases para os vírus. Em alguns casos elas são tão importantes que alguns vírus carregam consigo a informação para codificar uma fosfolipase própria, como o VACV e alguns vírus da família *Parvoviridae*. A proteína F13L do VACV, por exemplo, possui em sua estrutura um domínio HKD (His-Lys-Asp), um motivo conservado entre as superfamílias de fosfolipases e fosfolipídio sintetases, sendo este domínio de extrema importância no processo de aquisição dos envelopes lipídicos adicionais para a formação dos CEVs e EEVs.

CEVs e EEVs, embora importantes para a disseminação do vírus sistemicamente e célula-célula, representam menos de 10% do número total de partículas infecciosas produzidas ao longo do ciclo de multiplicação do VACV. Os IMVs, por sua vez, compõem mais de 90% da progênie

viral, mas o processo pelo qual estas partículas adquirem seu envelope lipoproteico ao longo de sua morfogênese, bem como as proteínas celulares que possam vir a participar deste processo, são pouco conhecidos.

Trabalhos recentes realizados pelo grupo do Prof. Dr. Bernard Moss descobriram importantes proteínas virais não estruturais que participam do processo de morfogênese do VACV, mais especificamente do processo de aquisição das membranas para a formação das crescentes virais. Estes trabalhos permitiram a criação de uma hipótese na qual estas proteínas virais, denominadas VMAPs, atuam em conjunto com proteínas celulares para realizar quebras transientes nas membranas, principalmente nas do retículo endoplasmático, seguidas da estabilização dos fragmentos formados para posterior deposição dos mesmos sobre o suporte criado pelas proteínas D13L. As proteínas celulares que estariam envolvidas neste processo, entretanto, não foram mencionadas na elaboração da hipótese, reforçando a ideia de que muito pouco se sabe sobre a participação de fatores celulares na morfogênese dos *Orthopoxvirus*.

Este trabalho vem, portanto, auxiliar na compreensão dos mecanismos intrínsecos do hospedeiro que são regulados pelo VACV com o objetivo de formar o envelope lipídico dos IMVs, ao avaliar o possível papel que a cPLA2 celular possui neste processo.

III. OBJETIVOS

1- Objetivo geral

Investigar a relevância funcional da fosfolipase A2 citosólica para a biologia do *Vaccinia virus*.

2- Objetivos específicos

2.1- Caracterizar a cinética de ativação da fosfolipase A2 citoplasmática em células HeLa durante a infecção pelo VACV;

2.2- Aplicar a tecnologia de siRNA para silenciar a expressão gênica da cPLA2 em células HeLa;

2.3 - Avaliar o papel da cPLA2 para a multiplicação do VACV, por meio da inibição farmacológica, com RSC-3388, e genética, com siRNA;

2.4- Avaliar, por microscopia de fluorescência, a sublocalização celular da cPLA2 em células HeLa infectadas ou não pelo VACV-F13L-GFP e transfectadas ou não com siRNA específico.

IV. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 - Células

4.1.1 - Células BSC-40

BSC-40 é uma linhagem de células epiteliais aderentes derivadas do rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*) susceptível à infecção pelo *Vaccinia virus*. Estas células 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 (Gibco) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab), L-glutamina a 200 mM, bicarbonato de sódio a 2,25 g/L e antibióticos (gentamicina a 40µg/mL, penicilina a 200 U/mL e anfotericina B a 1,5 µg/mL). Para a manutenção do cultivo, as células foram mantidas a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂.

4.1.2 - Células HeLa

As células HeLa são uma linhagem de células epiteliais aderentes originárias de adenocarcinoma cervical de uma paciente humana. Estas células foram cultivadas em meio mínimo essencial (MEM) autoclavável (Gibco) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab), L-glutamina a 200 mM, bicarbonato de sódio a 2,25 g/L e antibióticos (gentamicina a 40 µg/mL, penicilina a 200 U/mL e anfotericina B a 1,5 µg/mL). Assim como a linhagem BSC-40, estas células foram mantidas a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO₂.

4.2 - Vírus

Para a realização deste estudo foram utilizados os vírus *Vaccinia virus* Western Reserve (VACV-WR) e o VACV-F13L-GFP, ambos cedidos pelo Dr. Bernard Moss (National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Bethesda, Maryland, Estados Unidos). O VACV-F13L-GFP codifica a proteína verde fluorescente (GFP) fundida à proteína F13L do envelope lipoproteico mais externo de EEVs e CEVs (Hussain & Moss, 2001).

4.3 – Inibidores farmacológicos e tratamento das células com inibidores

Para este estudo foram utilizados os inibidores farmacológicos RSC-3388, U0126 e LY294002. O inibidor RSC-3388 (Santa Cruz Biotechnology), desenvolvido por Yamamoto e colaboradores, é descrito como um inibidor potente, seletivo e não peptídico da fosfolipase A2

citossólica (cPLA2) (Yamamoto et al., 2008). O inibidor U0126 (Sigma-Aldrich) é um potente e específico inibidor das cinases celulares MEK1 e MEK2, e o inibidor LY294002 (Sigma-Aldrich) é um inibidor de PI3K, da via dos fosfoinosítídeos cinases (PI3K/AKT/mTOR). Todos os inibidores foram utilizados de acordo com as recomendações do fabricante, em concentrações não tóxicas às células.

Nos experimentos em que se fez uso dos inibidores, estes foram adicionados ao meio em que as células estavam mantidas pelo período de 30 minutos antes da infecção das mesmas (pré-tratamento). As concentrações de uso variaram de acordo com o objetivo do experimento e serão indicadas na seção de resultados. Após o pré-tratamento, o meio de cultura contendo os inibidores foi descartado, as células foram lavadas com PBS previamente aquecido à 37°C e, então, infectadas com o VACV-WR na MOI desejada. Passado o período de adsorção do vírus, os poços contendo as monocamadas celulares foram novamente lavados com PBS aquecido à 37°C para a remoção dos vírus não adsorvidos e foram completados com DMEM 1% SFB fresco contendo o inibidor desejado.

4.4 – Teste de citotoxicidade por MTT

O ensaio colorimétrico com MTT, posposto por Mosmann (1983), foi utilizado para testar a citotoxicidade do inibidor de cPLA2, o RSC-3388, em células HeLa. Resumidamente, o teste consiste na adição de uma solução de MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-yl]-2, 5-difeniltetrazolbrometo) sobre uma monocamada celular com o objetivo de se avaliar a proliferação e a viabilidade destas células. O MTT é reduzido em células metabolicamente ativas a cristais violetas de formazano, que são insolúveis. Após a adição de uma solução detergente ou DMSO, os cristais são dissolvidos, e tornam púrpura o meio em que as células foram cultivadas. A densidade óptica deste meio é, então, avaliada por um espectrofotômetro no comprimento de onda de 570 nm, e permite correlacionar os valores obtidos com a quantidade de células viáveis. Para a execução do teste, placas de 96 poços foram preparadas com 2×10^4 células, em meio DMEM contendo 10% de SFB. Aproximadamente 16 horas após a semeadura das células, trocou-se o meio de cultura das mesmas, adicionando-se 100 µL de meio DMEM 1% SFB fresco em cada poço. Diluições seriadas do inibidor foram preparadas também em meio DMEM contendo 1% de SFB em uma placa espelho. O DMSO (diluente das amostras) foi utilizado como controle. Após o preparo da placa espelho, 100 µL de cada diluição a ser testada foram adicionados aos 100 µL do meio fresco. As placas

foram incubadas por 24 horas em estufa com atmosfera contendo 5% de CO₂ a 37°C. O meio foi, então, removido e foram adicionados 50 µL da solução de MTT em PBS (2 mg/mL) aos poços. As placas foram incubadas por 90 minutos na estufa a 37°C. Passado este período de tempo, foram adicionados aos poços 150 µL de DMSO, e as placas foram mantidas em um agitador de placas por 15 min. Posteriormente, foi realizada a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 570 nm. Os valores obtidos da absorbância das amostras foram comparados com os valores obtidos para o controle celular.

4.5 - Transfecção de células com siRNAs

Um dia antes da transfecção, células HeLa foram semeadas em placas de 24 poços, na densidade de 5×10^4 células por poço em meio DMEM contendo 10% de SFB. No dia seguinte, o meio das células foi trocado por 500 µL de meio de cultura (MEM/SFB a 1%) fresco e, para a transfecção das células, foram utilizados o siRNA específico para o mRNA codificante da fosfolipase A2 citosólica (PLA2G4 - Life Technologies) (Tabela 2) na concentração final de 5 nM ou, como controle negativo, uma mistura de siRNAs AllStars (Qiagen), a qual consiste de vários siRNAs sem alvo celular. Para o procedimento da transfecção, foi preparada uma solução contendo 37,5 ng do siRNA desejado, 100 µL de meio OPTI-MEM (Gibco) e 3 µL do reagente de transfecção HiPerFect (Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante. Desta solução, 100 µL foram adicionados por gotejamento sobre as monocamadas celulares, que, posteriormente, foram incubadas em estufa a 37°C com atmosfera contendo 5% de CO₂ por, no mínimo, 24 horas.

Tabela 2 – Informações gerais sobre o siRNA c-PLA2

	Senso	Anti-senso
Sequência (5' → 3')	CCUACGAUUUAGUAUGGCUtt	AGCCAUACUAAAUCGUAGGtc
Tamanho	21 pb	21 pb
Porcentagem G/C	38%	43%
Peso molecular	6608,2 g/mol	6662,2 g/mol
Gene alvo	PLA2G4A – fosfolipase A2, grupo IV (citossólica, dependente de cálcio)	

4.6 - Infecção *in vitro*

Células HeLa foram cultivadas em placas de 24 poços na densidade de $5,0 \times 10^4$ células por poço, e, após o procedimento de transfecção com os siRNAs ou de tratamento com os inibidores farmacológicos, tripsina foi adicionada em um dos poços, desfazendo-se a monocamada celular para permitir a contagem do número de células presentes por poço. Sabendo-se a quantidade de células por poço, o cálculo da MOI desejada foi realizado e os demais poços foram infectados com VACV-WR ou VACV-F13L-GFP. Após a infecção, as células foram mantidas por 1h em estufa a 37°C e atmosfera de 5% de CO₂, sob agitação intermitente para permitir a adsorção viral. Posteriormente, nos experimentos de análise da produção viral, as células foram lavadas uma vez com PBS aquecido a 37°C para remoção das partículas não adsorvidas. Após a adsorção, meio DMEM contendo 1% de SFB foi adicionado e as células foram incubadas de 12h a 96h, dependendo do objetivo do experimento.

4.7 – Titulação viral

A titulação dos experimentos descritos foi realizada em células BSC-40. Essas células foram cultivadas em placas de doze poços por 16h, até atingirem cerca de 90-100% de confluência. Duzentos microlitros de uma série de diluições na razão de dez da suspensão contendo o vírus a

ser titulado foram inoculados às culturas de células. Um dos poços foi falsamente infectado e mantido como controle celular. A adsorção viral foi realizada pelo período de 1h e, posteriormente, foi adicionado meio contendo 1% de SFB. Após 48 horas de infecção, as células foram fixadas com formaldeído a 3,7% por 30 minutos e coradas com cristal violeta a 1% (p/v) em etanol 20% (v/v) por 15 minutos. Os poços contendo entre 10 e 100 placas foram utilizados para a determinação do título viral, expresso em pfu/mL (unidades formadoras de placa por mL).

4.8 - Extração de proteínas totais

Para a extração das proteínas celulares totais, aproximadamente 500.000 células HeLa foram semeadas em placas de 6 poços e carenciadas com meio MEM suplementado com 1% de SFB após 24 horas. Posteriormente, as células foram transfectadas com os siRNAs ou pré-tratadas com inibidores utilizados neste estudo e, então, infectadas com o VACV-WR com MOI de 5 por tempos pré-definidos. Passado o tempo de infecção, as células foram lavadas duas vezes com PBS e foram adicionados 100 µL/poço de solução de lise [TritonX-100 1%; Tris-HCl 100mM 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 1 mM; aprotinina 5 µg/mL; leupeptina 2,5 µg/mL]. As células foram mantidas no gelo por 20min e então raspadas e coletadas em tubos de 1,5 mL. O lisado foi clarificado por meio de centrifugação a 13.000 rpm por 20min a 4°C em microcentrífuga (Eppendorf 5417R – rotor FA-45-24-11) para remoção dos restos celulares. O sobrenadante foi coletado e a concentração de proteínas totais determinada por espectrofotometria, utilizando o kit Bio-Rad Assay (Bio-Rad Laboratories). As proteínas extraídas foram mantidas a -20°C até o uso.

4.9 - Western Blot

Tampão LB 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 25 µg/amostra das proteínas, que foram, então, desnaturadas por 5min 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 TBS. Após 1h a temperatura ambiente, as membranas foram lavadas três vezes em TBS/Tween-20 a 0,1% e incubadas com o anticorpo primário desejado por 24h a 4°C, em albumina sérica bovina (BSA) a 5% (p/v) em TBS/Tween-20, nas seguintes diluições: 1:1.000 do anticorpo monoclonal anti-phospho-cPLA2 (Cell Signaling Technologies), 1:1.000 do anticorpo monoclonal anti-phospho-p44/p42 (Cell Signaling Technologies), ou 1:5.000 do anticorpo anti- β -actina (Sigma). As membranas foram novamente lavadas em TBS/Tween-20 por três vezes e incubadas por 1h a temperatura ambiente com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase diluído em leite em pó desnatado a 5% (p/v) em PBS/Tween-20, nas seguintes diluições: 1:5.000 de anti-IgG de coelho (Cell Signaling Technologies) para detectar a fosfolipase celular fosforilada e a ERK-1/2, ou 1:10.000 de anti-IgG de camundongo (Cell Signaling Technologies) para detectar β -actina. As membranas foram novamente lavadas em TBS/Tween-20, incubadas em solução reveladora Luminata Forte (Millipore) 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.

4.10 - Microscopia de fluorescência

Cinquenta mil células HeLa foram cultivadas sobre lamínulas de 13mm de diâmetro (Perfecta) inseridas em placas de 24 poços até atingirem 90% de confluência. As células foram transfectadas com os siRNAs de interesse por 24 horas e, então, infectadas com VACV-F13L-GFP. Após adsorção por 1h sob agitação intermitente, o inóculo viral foi removido, as células lavadas com PBS aquecido a 37°C e meio MEM contendo 1% de SFB foi adicionado. Passadas 4 ou 12 horas pós-infecção, as células foram lavadas duas vezes com PBS, fixadas com paraformaldeído a 4% em PBS por 10 minutos e armazenadas em geladeira com PBS até o momento das marcações com os anticorpos. Para a marcação com os anticorpos, as células foram, primeiramente, permeabilizadas com Triton X-100 a 0,2% em PBS/BSA 3%, por 10 minutos e, posteriormente, bloqueadas com SFB a 2%, em PBS/BSA 3% durante 30 minutos. As células foram, então, incubadas por 1h com o anticorpo anti-phospho-cPLA2 (Cell Signaling) na diluição 1:80 em PBS/BSA 3%, ou anti-phospho-p44/p42 (Cell Signaling) na diluição 1:100 em PBS/BSA 3%, para a marcação da fosfolipase citosólica ou da MAPK ERK1/2, respectivamente. Posteriormente foi realizada a incubação das células por 30 minutos com anti-IgG de coelho

conjugada com o fluoróforo AlexaFluor 567 (Molecular Probes, 1:400, em PBS/BSA 3%). Em seguida, as células foram lavadas três vezes com PBS/BSA 3% e incubadas com DAPI (100 mg/ μ L, Sigma, diluição 1:25.000 em PBS), por 10 minutos a temperatura ambiente para a marcação do DNA presente nos núcleos celulares e nas fábricas virais. Todo o processo de marcação foi realizado em uma câmara úmida protegida de luz. Após mais três lavagens com PBS, as lamínulas foram montadas sobre lâminas de vidro utilizando-se uma gota (aproximadamente 40 μ L) de ProLong® Gold Antifade reagente (Life Technologies). As células foram analisadas ao microscópio de fluorescência NIKON ECLIPSE Ti, no Centro de Aquisição e Processamento de Imagens do ICB/UFMG (CAPI ICB/UFMG).

4.11 – Análise estatística

Todos os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (SEM). As diferenças entre as médias foram comparadas utilizando-se análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Tukey. Na comparação entre apenas dois grupos, foi utilizado o teste t de Student não pareado. Os resultados foram considerados significativos quando valor de $p < 0.05$. Barras horizontais sobre os gráficos representam a média de erro padrão. Para a construção dos gráficos foi utilizado o software GraphPad PRISM 4.

V. RESULTADOS

1. Caracterização da cinética de ativação da cPLA2 pelo VACV em células HeLa

Com o objetivo de verificar se o VACV era capaz de regular a ativação da cPLA2, aproveitou-se um conjunto de extratos proteicos que haviam sido preparados pelo Dr. Leonardo Camilo para um experimento de análise de ativação de ERK e JNK pelo VACV. Neste experimento, células HeLa haviam sido infectadas com VACV na MOI de 5 e tratadas ou não com os inibidores de ERK (U0126, concentração de 15 μ M) e JNK (JNK-i VIII, concentração de 40 μ M). Os tempos utilizados no experimento foram de 1, 3, 6, 12, 24 e 48 hpi, respectivamente. Controles negativos contendo monocamadas celulares não infectadas (mocks) foram mantidos para os tempos de 1, 12 e 48h.

Observou-se neste experimento um aumento na quantidade de c-PLA2 fosforilada nas células HeLa que haviam sido infectadas com o VACV, quando comparadas com as células não infectadas. Os níveis de proteína fosforilada mais elevados puderam ser verificados desde tempos precoces (primeira hora de infecção), e mantiveram-se altos até tempos tardios (48 após a infecção), quando comparadas com as quantidades desta proteína ativada nas células controle (Figura 11).

Embora o objetivo do experimento fosse observar uma possível alteração nos níveis de P-cPLA ocasionada pela infecção com o VACV, a análise das canaletas contendo extratos proteicos das células tratadas com os inibidores de MEK/ERK e JNK indicou uma possível relação da primeira via com a ativação desta enzima. Pode-se observar que nas canaletas contendo extratos proteicos de células tratadas com o inibidor de MEK/ERK, U0126, os níveis de P-cPLA2 são comparativamente menores do que o das células não tratadas. Não foram observadas alterações nos níveis de P-cPLA2 nas células tratadas com o inibidor de JNK, JNK-i VIII.

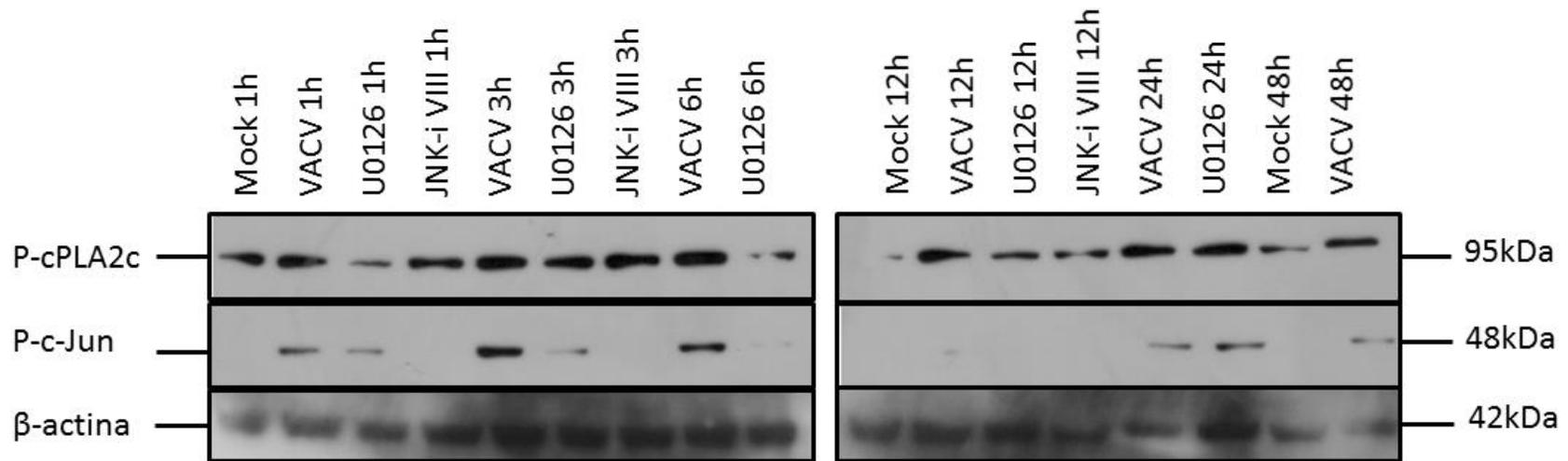


Figura 11 – Análise da fosforilação da proteína celular cPLA2A em células infectadas com o VACV e tratadas ou não com os inibidores farmacológicos U0126 e JNK-i VIII. Células HeLa foram infectadas ou não com o VACV em MOI 5 ao longo de 1, 3, 6, 12, 24 ou 48h. Passados os respectivos tempos de infecção, as células tiveram suas proteínas totais extraídas e quantificadas. Quarenta microgramas do extrato proteico total foram submetidos ao fracionamento eletroforético em gel poliacrilamida 10% e foram, posteriormente, transferidos para membrana de PVDF. A membrana foi incubada com o anticorpo anti-P-cPLA2 (1:1.000) para detecção dos níveis da P-cPLA2 e, posteriormente, com o anticorpo anti-β-actina (1:5.000) para a normalização do experimento. Observou-se um aumento nas quantidades de P-cPLA2 nas células infectadas com o VACV e uma redução das quantidades destas proteínas nas células tratadas com o inibidor U0126. O aumento nos níveis de fosforilação da proteína alvo foram observados desde tempos precoces e mantidos até tempos mais tardios de infecção.

2. Os inibidores farmacológicos RSC-3388, U0126 e LY294002 reduzem os níveis de P-cPLA2 em células HeLa

O inibidor farmacológico RSC-3388 é descrito como um inibidor potente e específico da fosfolipase A2 citoplasmática, e foi utilizado nas concentrações de 10 μM , 7,5 μM e 5 μM para testar sua eficiência em reduzir a ativação dessa proteína celular. O U0126 é um potente inibidor de ERK1/2, impedindo que essas cinases sejam fosforiladas pelas MAPKKs MEK1/2, e foi utilizado nas concentrações de 7,5 μM , 15 μM e 20 μM . O LY294002, por sua vez, é um inibidor farmacológico da via de PI3K/AKT, uma via intimamente ligada ao metabolismo de lipídeos, e foi utilizado nas concentrações de 10 μM , 15 μM e 20 μM .

Para a execução do experimento células HeLa foram pré-tratadas com os inibidores nas concentrações previamente citadas e foram, posteriormente, infectadas com o VACV na MOI de 5 por 12 horas. Após este período de tempo, prosseguiu-se com a técnica de western blot para verificar o efeito dos inibidores sobre a ativação da cPLA2.

O resultado obtido (Figura 12) demonstra que todos os inibidores foram capazes de reduzir a ativação da cPLA2. Comparando-se com o controle negativo (células tratadas apenas com o solvente dos inibidores, DMSO), o inibidor específico da cPLA2 (RSC-3388), reduziu a níveis indetectáveis por western blot a fosforilação desta proteína. Resultado semelhante foi observado para o inibidor de PI3K: mesmo a menor concentração do inibidor utilizada reduziu a níveis indetectáveis a presença de P-cPLA2. O U0126, inibidor de ERK1/2, também reduziu a ativação da fosfolipase, mas apenas nas concentrações de 15 μM e 20 μM .

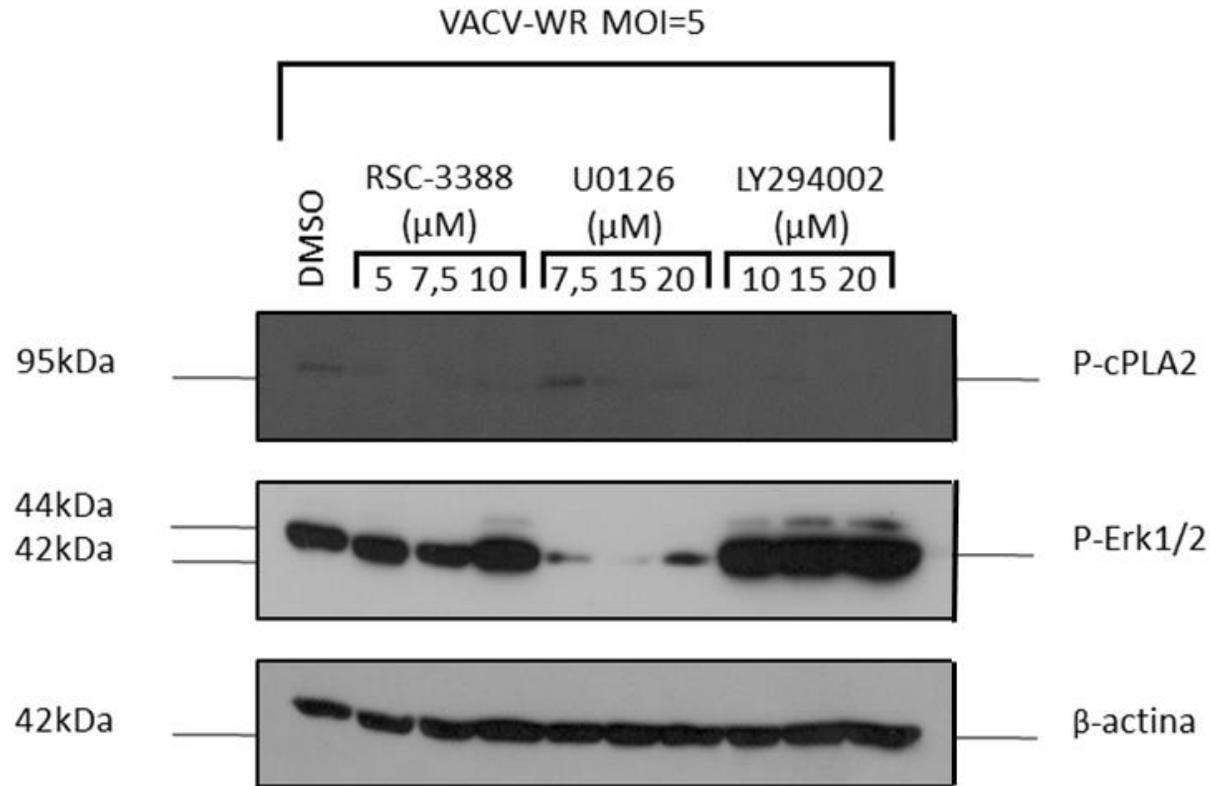


Figura 12 – Efeito dose-resposta dos inibidores farmacológicos RSC-3388, U0126 e LY294002 sobre os níveis de cPLA2 fosforilada (P-cPLA2) pós-infecção com o VACV. Células HeLa foram tratadas com diferentes concentrações dos inibidores de cPLA2, ERK1/2 e PI3K/AKT e infectadas com o VACV-WR em MOI de 5 por 12 horas. Após o período de infecção foi realizada a extração das proteínas totais e 25 μg das mesmas foram utilizadas para realização do western blot. Observa-se que os inibidores RSC-3388 e LY294002 conseguiram reduzir as quantidades da fosfolipase A2 fosforilada a níveis indetectáveis. O inibidor U0126 também reduziu as quantidades desta proteína ativada nas células tratadas, embora, apenas a partir da concentração de 15 μM

3. O inibidor farmacológico RSC-3388 afeta negativamente a multiplicação do VACV-WR

Após verificar que o RSC-3388 era capaz de reduzir significativamente a quantidade de P-cPLA2 nas células infectadas e tratadas, o próximo passo foi verificar se esta redução teria algum efeito na multiplicação do VACV. Com esta finalidade, um experimento piloto foi realizado: células HeLa foram tratadas com 10 μ M do inibidor ou com o DMSO 0,2% (controle negativo) e infectadas com o VACV-WR em MOI de 5 por 48 horas. Passado este período de tempo, as células infectadas foram lisadas por ciclos de congelamento/descongelamento para a liberação dos IMVs. O sobrenadante foi, então, centrifugado para a clarificação dos restos celulares e utilizado para titulação da carga viral total em células BSC-40, seguindo o protocolo descrito na seção de material e métodos. Após a titulação, foi construído um gráfico de colunas para expressar os títulos virais observados (Figura 13).

É possível observar no gráfico uma redução significativa do título viral quando o tratamento com o inibidor RSC-3388 a 10 μ M foi realizado. Neste experimento, o gráfico encontra-se em escala logarítmica de base 10, e foi possível observar em seu eixo Y uma redução do título viral próxima a 1,5 log, o que representa uma redução de mais de 90% no número de partículas virais viáveis produzidas (redução de aproximadamente $5,0 \times 10^8$ PFU/mL para aproximadamente $1,0 \times 10^7$ PFU/mL).

Efeito do Inibidor de Phospholipase A2 sobre a multiplicação do VACV-WR

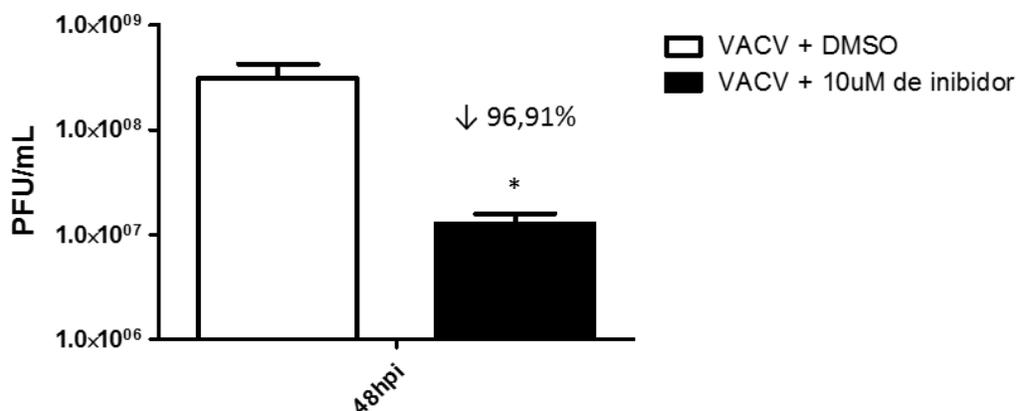


Figura 13 – Efeito do inibidor de fosfolipase A2 citosólica, RSC-3388, sobre a multiplicação do VACV. Células HeLa foram tratadas com 10 μ M do inibidor RSC-3388 ou tratadas apenas com DMSO 0,2% (controle negativo) e infectadas com VACV-WR na multiplicidade de infecção de 5 por 48 horas. Após o período de infecção as células passaram por três ciclos de congelamento/descongelamento para a liberação dos IMVs, o sobrenadante foi clarificado e posteriormente utilizado para a infecção de células BSC-40. Após 48 horas de infecção das células BSC-40, estas foram fixadas e coradas com cristal violeta para a determinação do título viral obtido. É possível perceber que, quando o inibidor farmacológico RSC-3388 é utilizado na concentração de 10 μ M, ocorre a redução do número de unidades formadoras de placas de cerca de 96,91%. A barra sobre as colunas representa o erro padrão das triplicatas biológicas e o asterisco representa diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$).

4- Curvas de dose-resposta do inibidor RSC-3388 sobre a multiplicação do VACV-WR

Após verificar que o inibidor RSC-3388 era capaz de reduzir a multiplicação do VACV-WR na concentração de 10 μM , prosseguiu-se com o teste de dose-resposta do inibidor. Com o objetivo de verificar se a multiplicação do vírus seria alterada por diferentes concentrações do inibidor, células HeLa foram tratadas com as concentrações de 10 μM , 7,5 μM e 5 μM e infectadas com o vírus em MOI de 5 por 48h. Passado o período de infecção, o título dos vírus multiplicados em HeLa foi definido utilizando-se o sobrenadante destas células para a infecção de células BSC-40, conforme realizado no experimento anterior.

Observou-se com este experimento que variações na concentração do inibidor alteram de maneira inversamente proporcional o título viral obtido, ou seja, maiores concentrações do inibidor resultavam em títulos virais menores. A concentração de 10 μM resultou em uma redução aproximada de 80% na produção de partículas virais viáveis, a concentração de 7,5 μM resultou na redução de aproximadamente 54% e a concentração de 5 μM apresentou uma redução de 42% do título viral quando comparado ao controle (células tratadas apenas com DMSO) (Figura 14).

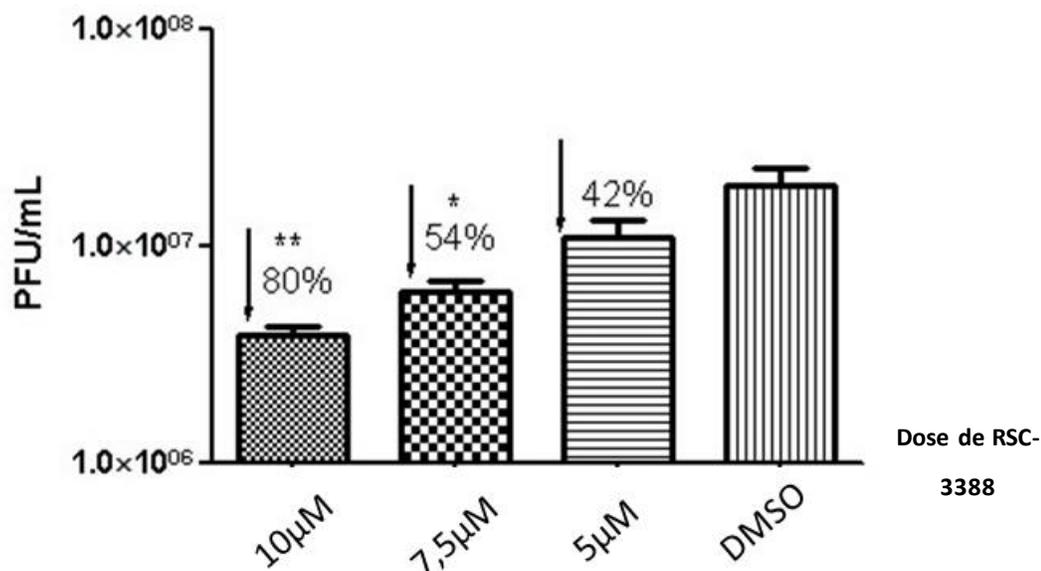


Figura 14 – Curva dose-resposta entre o inibidor RSC-3388 e a multiplicação do VACV-WR. Cem mil células HeLa foram cultivadas em placas de 24 poços em meio DMEM 10% SFB por 16 horas. Passadas as 16 horas de cultivo, o meio de cultura foi descartado, as células pré-tratadas com o inibidor nas concentrações de 10 µM, 7,5 µM, 5 µM ou DMSO por 30 minutos, infectadas com o VACV-WR em MOI de 5 e, após o período de adsorção de 1 hora, o meio de cultura foi novamente descartado e os poços contendo células infectadas foram completados com meio DMEM 1% SFB contendo DMSO 0,2% ou o inibidor nas concentrações já descritas. Permitiu-se que o ciclo de multiplicação do vírus prosseguisse nestas células por 48 horas, e então foi realizada a titulação em BSC-40 para a verificação dos títulos virais obtidos. Observa-se que existe uma relação de proporcionalidade inversa entre a concentração do inibidor utilizada e os títulos virais observados, quanto maior a concentração do inibidor utilizada, menor o título viral obtido. Barras horizontais sobre as colunas representam o erro padrão entre as triplicatas biológicas, um asterisco sobre as colunas representa diferença estatística relevante entre as amostras, em que o valor de $p < 0,05$ e dois asteriscos representam diferença estatística relevante em que o valor de $p < 0,01$.

5 – Teste de citotoxicidade do inibidor RSC-3388

O resultado obtido com os experimentos anteriores demonstrou uma grande redução no número de unidades formadoras de placas por mililitro de suspensão viral na concentração do inibidor de 10 μM . Como este resultado poderia ser devido não somente a redução da capacidade multiplicativa do vírus, mas também por um possível efeito tóxico do inibidor sobre as células HeLa, testes de citotoxicidade foram realizados para se determinar a concentração da droga menos tóxica para estas células. Para isto, células HeLa foram cultivadas em placas de 96 poços por 16 horas, e, após este período de tempo, o meio de cultura foi substituído por DMEM 1% de SFB contendo o inibidor RSC-3388 em diferentes concentrações. O novo meio contendo os inibidores foi deixado sobre as monocamadas celulares por 24 horas e, então, descartado para a adição da solução de MTT em PBS, solução que se manteve sobre as células por um período de 4 horas antes da leitura em espectrofotômetro.

Para o teste de citotoxicidade, o inibidor foi adicionado às células nas concentrações de 20 μM , 10 μM , 7,5 μM , 5 μM , 2,5 μM , 1,25 μM , 0,6 μM e 0,3 μM . Após a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 570 nm, os dados de densidade óptica foram plotados em dois gráficos de colunas, um com os valores absolutos de D.O. (Figura 15A) e um segundo em porcentagem de células viáveis com valores relativos ao controle celular (Figura 15B). Foi adotado como valor aceitável de citotoxicidade as concentrações que permitissem a sobrevivência de ao menos 90% das células em comparação com o controle celular.

Analisando-se os gráficos plotados, observou-se uma grande variação entre as triplicatas biológicas, o que implica em erros padrões elevados (barras laterais sobre as colunas). Entretanto, é bastante claro que a concentração de 20 μM apresentou valores muito baixos de densidade óptica em relação ao controle e às demais concentrações do inibidor utilizadas, valores abaixo do definido como aceitável. Essa concentração foi, portanto, descartada para o uso nas curvas de multiplicação do vírus na presença do inibidor que se seguiriam. Embora os cálculos estatísticos não tenham definido a concentração de 10 μM como significativamente mais tóxica do que as demais concentrações, esta concentração do inibidor também não foi utilizada na construção das curvas de multiplicação do vírus, porque, quando comparamos os valores em percentuais relativos ao controle celular, a média das triplicatas biológicas também ficou abaixo dos 90% definidos como ideais. Definiu-se, portanto, a concentração de 7,5 μM como ideal para o trabalho com células,

uma vez esta concentração foi a mais alta dentre as utilizadas no experimento que demonstrou toxicidade aceitável. É importante ressaltar que, embora não tenha apresentado valores altos de citotoxicidade, esta concentração do inibidor foi capaz de reduzir a ativação da cPLA2 (Figura 12) e também reduziu a multiplicação do vírus em aproximadamente 50% (Figura 14).

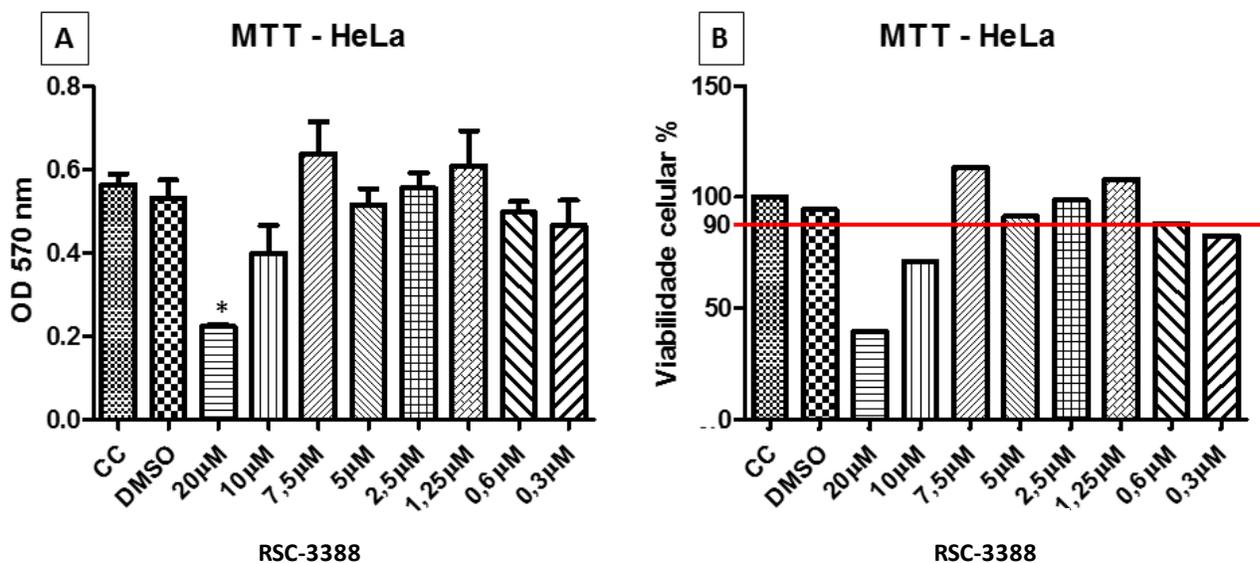


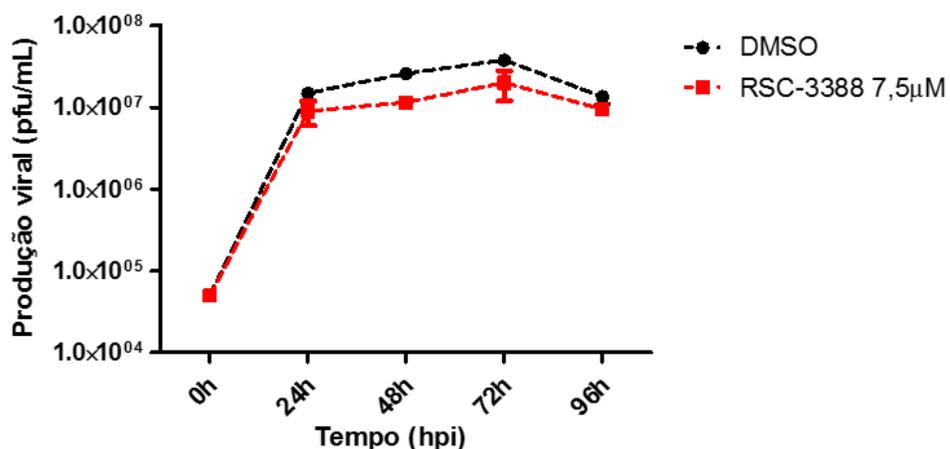
Figura 15 – Análise da citotoxicidade do inibidor RSC-3388. Células HeLa foram cultivadas em placas de 96 poços e, após 16h, o meio de cultura foi descartado e um novo meio contendo diferentes concentrações do inibidor RSC-3388 foi adicionado às monocamadas celulares. A placa foi incubada à 37°C sob atmosfera contendo 5% de CO₂ por 24 horas e, passado este período de tempo, o meio de cultura foi novamente descartado. Uma solução de MTT foi adicionada a cada um dos poços contendo as células e estas foram incubadas por 1h 30 minutos. Passado este período de tempo, DMSO foi adicionado a cada poço para permitir a solubilização dos cristais de MTT formados. Após a dissolução dos cristais, foi realizada a leitura da D.O. em espectrofotômetro no comprimento de onda de 570nm. O gráfico “A” demonstra os valores absolutos da leitura da D.O. para cada uma das concentrações do inibidor testadas, bem como os valores do controle de células e do DMSO (controle negativo). O gráfico “B” demonstra os valores relativos de viabilidade celular em porcentagem, usando-se como referência a média obtida na leitura de D.O do controle celular como 100% de células viáveis. Concentrações do inibidor que reduziram a viabilidade celular abaixo de 90% foram considerados demasiadamente tóxicos para as células. Linhas horizontais sobre as colunas representam o erro padrão das triplicatas biológicas e o asterisco representa diferenças significativamente relevantes entre as leituras obtidas de densidade óptica.

6 – Curvas de multiplicação do VACV em células HeLa tratadas com o inibidor RSC-3388

Após definir a concentração de 7,5 μM do inibidor de cPLA2 como ideal para se prosseguir com os experimentos envolvendo células, curvas de multiplicação do vírus foram construídas para se avaliar o comportamento do mesmo ao longo do tratamento com o inibidor. Assim sendo, foram construídas curvas de multiplicação de ciclo único, para verificar o efeito do inibidor exclusivamente no processo de multiplicação do vírus, e curvas de múltiplos ciclos para verificar o possível efeito do inibidor no processo de disseminação do mesmo.

Para as curvas de ciclo único, células HeLa tratadas com o inibidor ou com DMSO foram infectadas com o VACV-WR na MOI de 5, e tiveram seu ciclo de multiplicação interrompidos nos tempos de 24 hpi, 48 hpi, 72 hpi e 96 hpi (Figura 16 A). Para as curvas de multiplicação de múltiplos ciclos, as células HeLa foram tratadas com o inibidor ou DMSO e infectadas com o VACV-WR na MOI de 0,05, e o ciclo de multiplicação do vírus foi interrompido nos mesmos tempos descritos para a curva de ciclo único (Figura 16 B).

A Curva de multiplicação do VACV em células HeLa, MOI = 5, tratadas com 7,5 μM de RSC-3388



B Curva de multiplicação do VACV em células HeLa, MOI = 0,05, tratadas com 7,5 μ M de RSC-3388

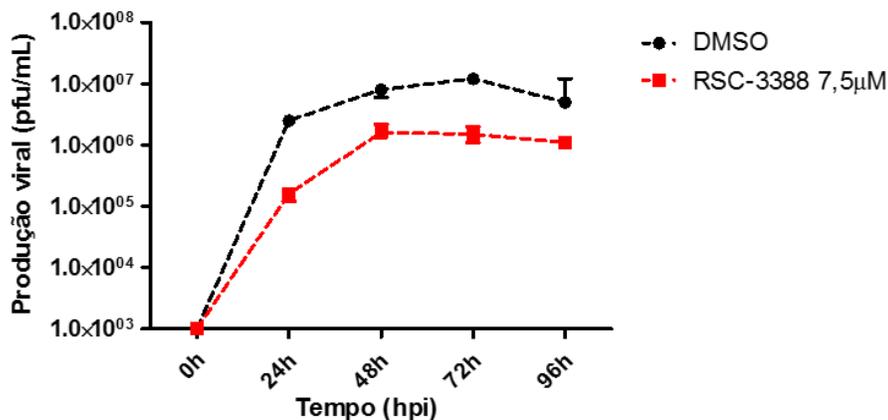


Figura 16 – Curvas de multiplicação do VACV-WR em presença do inibidor RSC-3388. Células HeLa foram semeadas em cada poço de uma placa de 24 poços e, passadas 16h, foram pré-tratadas, com o inibidor RSC-3388 na concentração de 7,5 μ M ou com DMSO. As células foram então infectadas com o VACV-WR na MOI de 5 para análise da curva de multiplicação de ciclo único (gráfico A) ou MOI de 0,05 para a análise da curva de multiplicação de múltiplos ciclos (gráfico B). Após 1h de adsorção viral as monocamadas celulares foram lavadas com PBS para a remoção das partículas virais não adsorvidas e os poços foram completados com meio DMEM 1% SFB contendo o inibidor ou DMSO. Verificou-se neste experimento uma redução insignificativa na multiplicação do VACV-WR na curva de ciclo único (gráfico A) e uma redução de aproximadamente 1 log na curva de múltiplos ciclos (gráfico B) ao fim das 96h de infecção. Barras horizontais representam o erro padrão entre as triplicatas biológicas em ambos os experimentos.

Após a plotagem dos gráficos, verificou-se a ausência de redução nos títulos virais na curva de multiplicação de ciclo único, uma vez que tanto o tratamento como o controle resultaram em um título viral final de aproximadamente $1,0 \times 10^7$ PFU/mL. Este resultado foi inesperado, já que nos experimentos anteriores reduções de ao menos 54% haviam sido verificadas em condições semelhantes. Para a curva de multiplicação de múltiplos ciclos, entretanto, uma redução de aproximadamente meia unidade logarítmica foi observada entre o controle negativo (título aproximado de $5,0 \times 10^6$ PFU/mL) e o tratamento com o inibidor (título aproximado de $1,0 \times 10^6$ PFU/mL). Este experimento, embora realizado em triplicata biológica, não pôde ser repetido devido à escassez do inibidor.

7 – Silenciamento da fosfolipase A2 citoplasmática pela técnica de RNA de interferência

Após verificar que o inibidor farmacológico RSC-3388 era capaz de reduzir a ativação da cPLA2 e a multiplicação do VACV-WR em células HeLa, o próximo passo foi tentar reproduzir estes resultados utilizando-se uma abordagem genética: o silenciamento gênico pela técnica de RNAs de interferência. Para isto, foi adquirida uma sequência de siRNA comercial com alvo específico para o gene codificante da cPLA2 (PLA2G4A).

Seguindo-se o protocolo de transfecção descrito na seção de material e métodos, uma solução contendo meio Opti-MEM (livre de RNase), reagente comercial de transfecção e o siRNA desejado (siRNA contra o gene da cPLA2 ou o siRNA controle negativo) na concentração final de 5 nM foi preparada e adicionada as células HeLa previamente cultivadas em placas de 24 poços. As células foram, então, incubadas em estufa por até 72 horas. Passado este período de tempo, prosseguiu-se com a extração das proteínas totais para western blot, com o objetivo de se averiguar a eficiência da transfecção e do siRNA adquirido.

Dois tempos diferentes foram escolhidos para a avaliação da eficiência da transfecção e do silenciamento pelo siRNA contra cPLA2: 24 e 72 horas. O tempo de 24 horas após a transfecção foi escolhido para averiguar a eficiência da mesma, e o tempo de 72 horas foi escolhido para verificar se o silenciamento se manteria eficiente durante todo o período de um experimento de curva de multiplicação do VACV, uma vez que a técnica de silenciamento por RNAs de interferência resulta em um *knockdown* temporário do gene alvo.

Analisando-se o western blot gerado, pode-se afirmar que o procedimento de transfecção ocorreu da maneira desejada, uma vez que os níveis de P-cPLA2 nas células transfectadas com o siRNA contra cPLA2 foram menores do que os níveis observados para o controle de transfecção (siRNA AS). Também foi verificado que a o silenciamento manteve-se eficiente por até 72 horas (Figura 17).

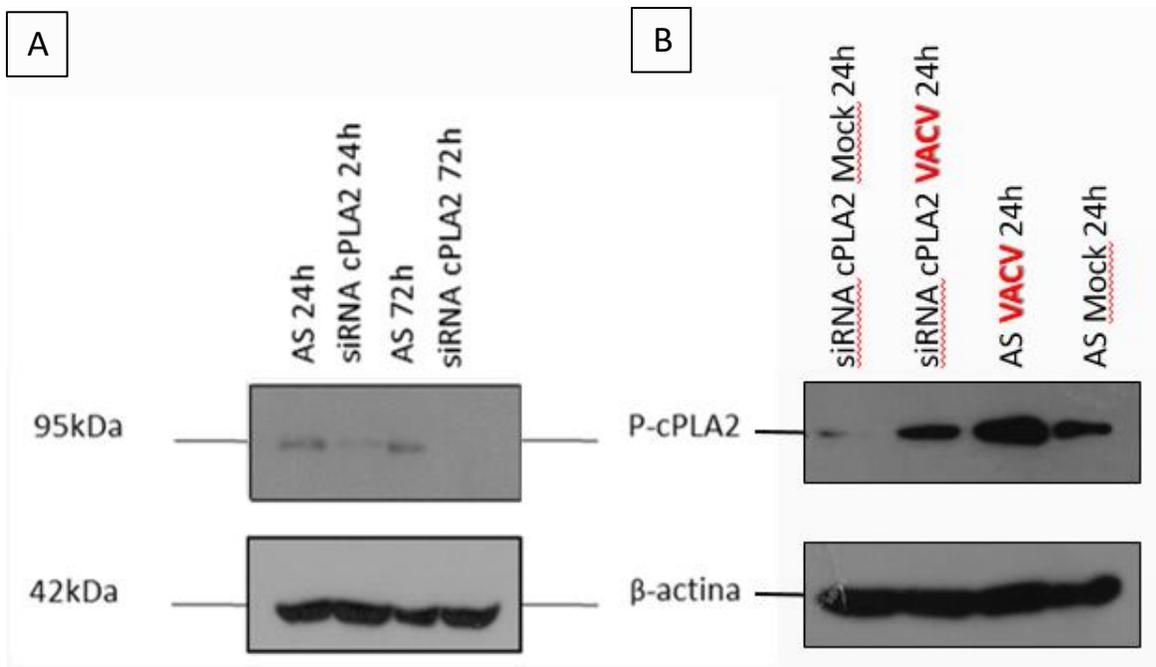
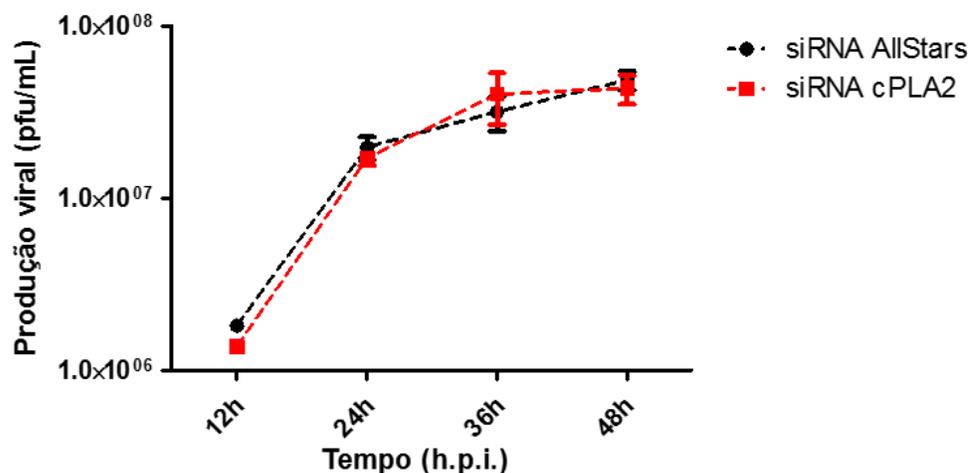


Figura 17 - Efeito do silenciamento do siRNA contra a cPLA2 ativada (P-cPLA2). Células HeLa foram transfectadas com siRNA contra cPLA ou com siRNA AS (controle negativo) na concentração final de 5 nM pelo período de 24 ou 72 horas, respectivamente (Figura A) ou transfectadas com os respectivos siRNAs na concentração final de 5 nM e infectadas ou não com o VACV pelo tempo de 24 horas (Figura B). Passados os respectivos períodos de tempo, as células tiveram suas proteínas totais extraídas, quantificadas e transferidas para membrana de nitrocelulose para realização do western blot. Observa-se que os níveis de cPLA2 ativada nas células não infectadas com o VACV são menores do que nas células infectadas com o vírus. Observa-se também que nas células transfectadas com o siRNA específico houve redução da quantidade de cPLA2 ativada, se comparados aos níveis presentes nas células transfectadas com o siRNA controle (AS) para ambos os tempos testados.

8 – Curvas de multiplicação do VACV-WR em células HeLa transfectadas com siRNA contra cPLA2

Verificada a eficiência do silenciamento gênico da cPLA2 pelo siRNA específico, decidiu-se avaliar se o mesmo resultaria em alguma alteração no ciclo de multiplicação do VACV-WR. Para tanto, células HeLa foram transfectadas com os siRNAs e infectadas com o VACV-WR em multiplicidades de infecção alta (MOI de 5), para a construção de uma curva de ciclo único (Figura 18 A), e baixa (MOI de 0,05), para a construção de uma curva de múltiplos ciclos (Figura 18 B), seguindo-se o protocolo descrito anteriormente. Para a curva de multiplicação de ciclo único, os tempos analisados foram de 12 hpi, 24 hpi, 36 hpi e 48 hpi. Para a curva de múltiplos ciclos, os tempos analisados foram de 12 hpi, 24 hpi, 48 hpi e 72 hpi.

A Curva de multiplicação do VACV em células HeLa, MOI = 5, transfectadas com siRNAs



B Curva de multiplicação do VACV em células HeLa, MOI = 0,05, transfectadas com siRNAs

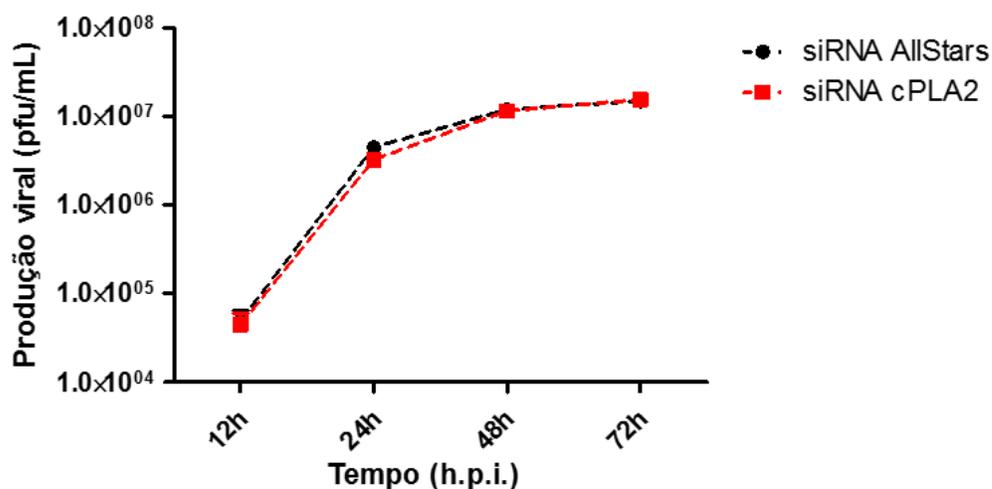


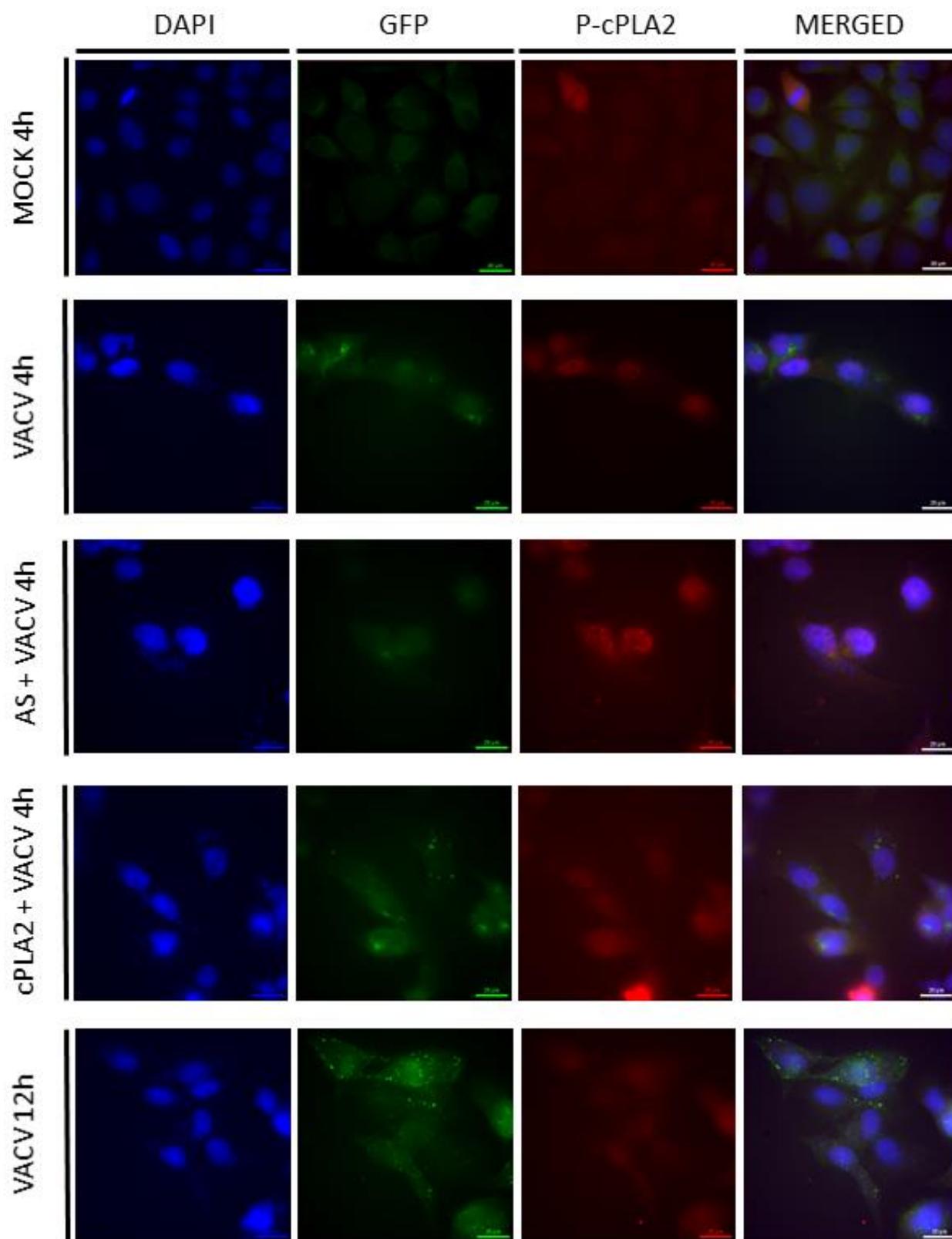
Figura 18 – Curvas de multiplicação do VACV-WR em células HeLa transfectadas com siRNA específico contra cPLA2. Células HeLa em placas de 24 poços e, após 16 horas, foram transfectadas com siRNAs (cPLA2 ou AllStars - controle) na concentração final de 5nM. Vinte e quatro horas após a transfecção, as células foram infectadas com VACV-WR nas multiplicidades de infecção de 5 (gráfico A) ou 0,05 (gráfico B). O ciclo de multiplicação do vírus foi interrompido nos tempos descritos em cada gráfico para titulação em células BSC-40. Barras laterais sobre os pontos do gráfico, quando presentes, representam o erro padrão entre as triplicatas biológicas. Os gráficos refletem resultados obtidos em três experimentos realizados independentemente.

Diferentemente do que foi observado para os tratamentos com o inibidor farmacológico RSC-3388, a transfecção com o siRNA específico para cPLA2 não resultou na redução dos títulos atingidos pelo VACV. Os gráficos demonstram que não há diferença na multiplicação viral entre as amostras transfectadas utilizando-se o siRNA específico de cPLA2 e o siRNA controle AllStars, sendo observados títulos próximos a $7,0 \times 10^7$ PFU/mL no primeiro gráfico para ambas as amostras, e títulos próximos a $1,0 \times 10^7$ PFU/mL no segundo gráfico, também para ambas as amostras.

9 – Microscopia de fluorescência

Com o objetivo de determinar a sub-localização celular da c-PLA2 ativada, bem como a abundância desta proteína nas células, foi realizado um experimento de microscopia de fluorescência. Para a realização do experimento, células HeLa foram cultivadas sobre lamínulas de 13mm em placas de 24 poços e, passadas 16 horas, as células foram transfectadas com os siRNAs utilizados neste estudo (siRNA contra cPLA2 e AllStars controle negativo). Após 24 horas de transfecção, as células foram infectadas com o VACV-F13L-GFP na MOI de 5. Passadas 4 ou 12 horas de infecção, as células foram fixadas em paraformaldeído 4% para posterior marcação do genoma celular e viral por DAPI ou da fosfolipase A2 citosólica fosforilada com anticorpos fluorescentes. Após a marcação do DNA celular e viral e da P-cPLA2, lâminas foram confeccionadas e analisadas no microscópio de fluorescência NIKON ECLIPSE Ti (CAPI ICB/UFMG).

A análise das lâminas permitiu a visualização do genoma celular (núcleos celulares) e das fábricas virais nas células infectadas com bastante clareza, todos marcados em azul. A marcação da P-cPLA2 com o fluoróforo Alexa-567, permitiu a identificação destas proteínas na cor vermelha. A análise da sub-localização celular da P-cPLA2 demonstrou que elas se encontram bastante difusas na célula, sendo identificadas não pontualmente, mas como nuvens vermelhas ao longo de todo o citoplasma e núcleos celulares. Foram observadas células em processo de divisão com uma marcação bastante intensa para esta proteína em todos os tempos e tratamentos realizados (Figura 19). O vírus, por possuir a proteína verde fluorescente fusionada a proteína F13L de envelope, pôde ser identificado como pontos verdes distribuídos pela célula.



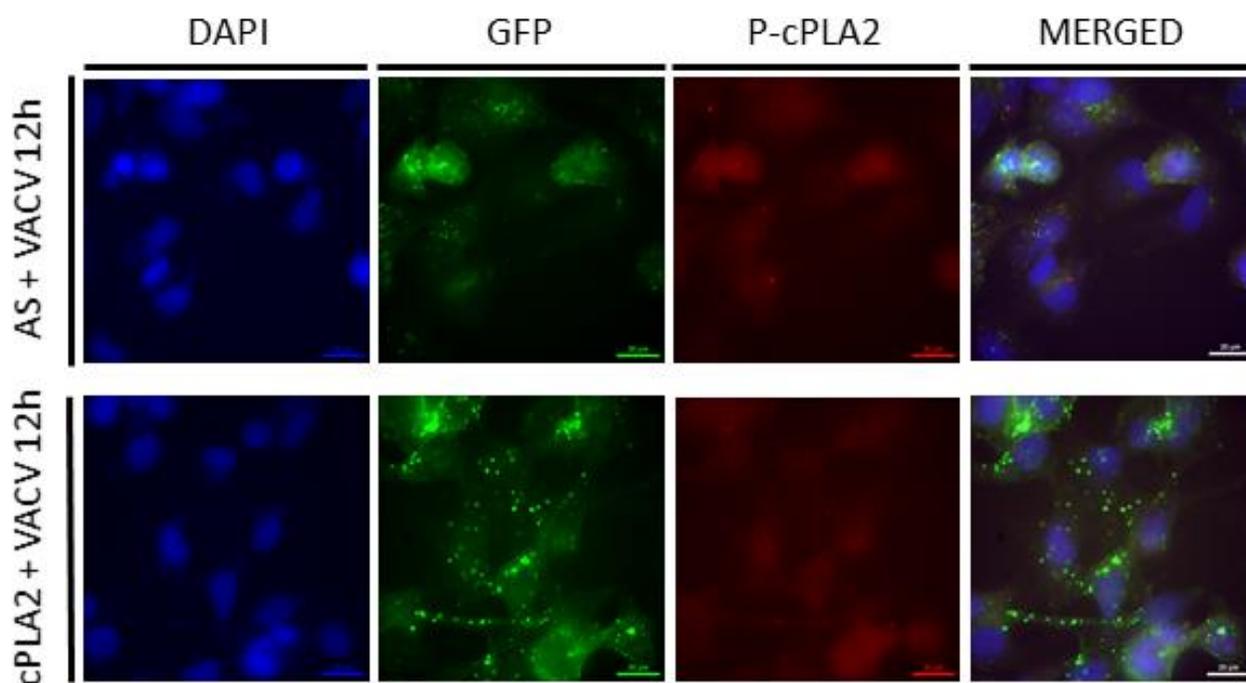


Figura 19 – Microscopia de fluorescência de células HeLa transfetadas com os siRNAs contra cPLA2 ou AllStars (AS) e infectadas com o VACV-F13L-GFP. Células HeLa foram semeadas em lâminulas de 13mm em placas de 24 wells e transfetadas com os siRNAs c-PLA2 ou AS (controle negativo). Posteriormente as células foram infectadas com VACV-F13L-GFP na MOI de 5 por 4 ou 12 horas. Passado o tempo de infecção as células infectadas foram fixadas com paraformaldeído e os componentes celulares de interesse foram marcados por fluorescência (DAPI para marcação do DNA e rodamina-faloidina para marcação do citoesqueleto de actina). Lâminas foram confeccionadas e analisadas por microscopia de fluorescência no CAPI ICB/UFMG. Em azul estão marcados os núcleos celulares e fábricas virais, em verde o vírus VACV-F13L-GFP e, em vermelho a P-cPLA2. A barra encontrada na lateral direita inferior representa a escala no valor de 20 µm.

Não foi possível observar pela microscopia diferenças nos níveis intracelulares de P-cPLA2 entre as células infectadas com o VACV-F13L-GFP e aquelas não infectadas (mocks). Também não foi possível observar as diferenças nestes níveis entre as células transfetadas com o siRNA específico ou controle negativo, como havia sido realizado anteriormente por meio de western blots.

VI. DISCUSSÃO

Os vírus são agentes infecciosos extremamente dependentes de seus hospedeiros. Como não possuem metabolismo próprio, eles usurpam vias sinalizadoras e a maquinaria metabólica celulares ao longo de seu ciclo multiplicativo com os objetivos de sintetizar todos os fatores essenciais para a replicação de seu genoma, produzir suas proteínas estruturais e evadir o sistema imune do hospedeiro.

Embora exista uma grande diversidade de vírus animais no planeta, todos podem ser classificados em duas categorias: os vírus não-envelopados e os vírus envelopados. Os vírus não envelopados são constituídos por uma casca nua denominada capsídeo, que é formada por pequenas subunidades proteicas conhecidas como capsômeros. Os vírus envelopados, por sua vez, possuem esta casca, ou capsídeo, envolto por uma bicamada lipídica proveniente do hospedeiro e denominada envelope viral (Knipe & Howley, 2013; Frabutt & Zheng, 2016). Atualmente, admite-se que as membranas que constituem os envelopes virais são obtidas de duas maneiras: pelo processo de brotamento ou quando os vírus são englobados por cisternas intracelulares (Locker et al., 2013).

Os vírus envelopados são mais estáveis do que os vírus não envelopados em condições fisiológicas. Como *trade-off*, entretanto, eles apresentam maior susceptibilidade à altas temperaturas, pHs baixos, dessecação e ao tratamento por detergentes. Estas características limitam a capacidade destes vírus de se manterem viáveis em ambientes naturais por prolongados períodos de tempo, mas os tornam mais adaptados ao ambiente sistêmico de seus hospedeiros (Dimitrov, 2004; Frabutt & Zheng, 2016). Os envelopes possuem ancorados em suas membranas lipídicas diversas glicoproteínas virais que se projetam para a superfície. Estas proteínas são essenciais para os processos de reconhecimento e penetração dos vírus nas células hospedeiras. Assim sendo, a integridade das membranas que constituem os envelopes virais é essencial para a infecciosidade dos vírus envelopados (Frabutt & Zheng, 2016).

As fosfolipases constituem um grande grupo de enzimas hidrolíticas que atuam sobre os fosfolipídios, a classe lipídica mais representativa dentre as constituintes das membranas celulares. Ao exercerem sua atividade catalítica, elas modificam a estrutura dos fosfolipídios, liberando moléculas que possuem diversas funções na célula do hospedeiro e alterando as características

físico-químicas das membranas, como sua fluidez, sentido de curvatura e composição. Embora não participem da biossíntese de lipídios, estas enzimas estão relacionadas com o *turn-over* dos mesmos nas membranas celulares, com a formação e o tráfego de vesículas lipídicas e com a manutenção de estruturas membranosas celulares, como o complexo de Golgi e o retículo endoplasmático (Guy & Thompson, 1992; AOCS, 2016).

Levando-se em consideração a importância dos envelopes lipídicos para os vírus envelopados e o papel das fosfolipases na modelagem de membranas, diversos estudos foram realizados no sentido de investigar a relação entre ambos. Alguns destes estudos foram citados na seção ‘Fosfolipases e Vírus’ deste trabalho e ilustram diferentes tipos de interações entre os vírus e estas proteínas.

Neste trabalho, verificou-se uma possível participação da fosfolipase A2 citosólica celular no ciclo de multiplicação do *Vaccinia virus*, um vírus envelopado e que possui um ciclo de multiplicação exclusivamente citoplasmático e bastante singular, com a formação de partículas que contém um, dois ou até mesmo três envelopes lipídicos (embora este último tipo de partícula viral seja não infeccioso e exista apenas temporariamente no citoplasma celular). Trabalhos anteriores já haviam sido realizados por outros pesquisadores no sentido de avaliar a relação entre este vírus e outras fosfolipases (Oliver et al., 1992; Kim et al., 1995; Baek et al., 1997; Husain & Moss 2001 e 2002). Entretanto, não foi encontrado na literatura nenhum trabalho avaliando possíveis interações entre este vírus e a cPLA2.

Assim sendo, inicialmente verificou-se se o VACV era capaz de ativar a fosfolipase A2 citoplasmática em um ensaio de cinética de ativação. Este ensaio demonstrou que, de fato, o vírus induz a ativação da cPLA2, o que foi verificado como um aumento nos níveis intracelulares desta proteína fosforilada por meio de western blots. Como a literatura descreve a participação das vias de MEK/ERK (principalmente) e JNK (possivelmente) na regulação da atividade de cPLA2, aproveitou-se para a realização deste experimento um extrato proteico que havia sido preparado anteriormente com o objetivo verificar a ação dos inibidores das vias de MEK/ERK e JNK na multiplicação do VACV. Foi possível observar com o resultado obtido que apenas a via de MEK/ERK interferiu na ativação da cPLA2, uma vez que apenas o uso do inibidor farmacológico U0126 reduziu os níveis de P-cPLA2. A indução da ativação da cPLA2 pelo vírus é um forte

indício de que esta proteína deve desempenhar algum papel benéfico para o vírus ao longo de seu ciclo de multiplicação.

Em posse do inibidor específico da ativação de cPLA2, o RSC-3388, decidiu-se testar a eficácia do mesmo em inibir a ativação da proteína em um ensaio de dose-resposta. Testaram-se também diferentes concentrações do anteriormente utilizado U0126 e do LY294002, um inibidor da via de PI3K/AKT. O teste com o LY foi realizado porque a via de PI3K está intimamente relacionada com o metabolismo de lipídeos de membrana (Naguib, 2016). O resultado deste experimento confirmou a participação da via de MEK/ERK na regulação da cPLA2 e o efeito do inibidor específico, ambos atuando de maneira dose dependente. Neste experimento foi possível verificar que a via de PI3K também é capaz de regular a fosforilação de cPLA2.

É importante ressaltar que as diversas vias celulares interagem entre si, e a via de PI3K pode vir a regular a via de MEK/ERK dependendo dos estímulos sofridos pelas células. Não é possível afirmar, portanto, que a via de PI3K/AKT regula diretamente a ativação de cPLA, uma vez que a redução da fosforilação desta proteína pelo LY pode estar relacionada com a inibição indireta da via de MEK/ERK por este inibidor.

O uso do inibidor específico de cPLA2 (RSC-3388), quando utilizado em células infectadas pelo VACV, foi capaz de reduzir o título final do vírus de maneira dose-dependente. Este evento de inibição da cPLA2 resultando na redução do título de um vírus envelopado já havia sido registrado anteriormente por Menzel e colaboradores, em seu estudo que avaliou o efeito deste mesmo inibidor contra os vírus da hepatite C e da dengue (Menzel, et al., 2012). Testes utilizando o RSC-3388 em curvas de multiplicação de ciclo único demonstraram que o efeito do mesmo sobre o ciclo de multiplicação do vírus não se deve a alterações no processo de disseminação, mas em alguma etapa anterior a esta no ciclo. O conjunto de resultados obtidos utilizando-se o inibidor farmacológico da cPLA2 sugerem, mais uma vez, que esta enzima deve possuir algum papel benéfico para o vírus ao longo de seu ciclo multiplicativo.

A segunda etapa deste trabalho foi verificar como o vírus se comportaria em um modelo de inibição genética da cPLA2. Para isto foi utilizado o siRNA que possui como alvo específico o gene PLA2G4A, responsável pela codificação desta proteína. Curiosamente, embora o

silenciamento pelo siRNA específico tenha sido comprovado por western blot, os experimentos de curva de multiplicação com o VACV não apresentaram redução nos títulos virais finais.

Mais uma vez, este resultado já havia sido obtido por Menzel e seus colaboradores em 2012 com os vírus da Dengue e da Hepatite C. Menzel verificou em seu trabalho que o silenciamento da cPLA2 não altera significativamente a atividade desta enzima na célula, após a medir a produção de ácido aracônico em células transfectadas ou não com siRNA. Ele observou que os níveis deste produto em ambos os cenários eram muito semelhantes e sugeriu, então, que a cPLA2 teria uma meia vida longa, o que permitiria que as proteínas traduzidas anteriormente à transfecção com os siRNAs permanecessem viáveis e passíveis de ativação pelo vírus por um longo período de tempo (Menzel et al., 2012).

Entretanto, vale lembrar que o VACV possui uma fosfolipase própria que apresenta atividade de fosfolipase A2. Não podemos descartar a possibilidade de haver uma complementação funcional entre estas fosfolipases. Também é importante mencionar que, embora a cPLA2 seja a única PLA2 com predileção para a clivagem dos fosfolipídios em AA e ácido lisofosfatídico, ela não é a única capaz de realizar esta função. Outras fosfolipases celulares podem vir a suprir este papel no caso da criação de nocautes gênicos ou de *knockdowns* (AOCS, 2017).

Por último, com o objetivo de verificar se a sublocalização celular da cPLA2 sofreria alguma modificação em células infectadas com o VACV, realizou-se um experimento de microscopia de fluorescência. Caso esta enzima estivesse relacionada com a formação de membranas das crescentes virais e dos IMVs, era esperado que, após 4 horas de infecção (período a partir do qual as crescentes começam a ser observadas sob microscopia eletrônica) as mesmas fossem encontradas com maior expressividade nas fábricas virais, no retículo endoplasmático ou no mesmo no complexo de Golgi. Entretanto, foi observado uma distribuição bastante difusa da cPLA2, não sendo possível identificar na microscopia a presença da enzima de forma pontual. A mesma foi observada como uma nuvem difusa, presente ao longo de todo o citoplasma, e, em alguns casos, de maneira mais intensa nos núcleos celulares. Também não foi possível verificar pela microscopia de fluorescência a redução nos níveis de P-cPLA2 nas células tratadas com o siRNA específico.

O conjunto de resultados obtidos ao longo deste trabalho são insuficientes para concluir que a cPLA2 exerça algum papel na formação das membranas presentes nas crescentes virais e nos IMVs. Entretanto, os experimentos com o inibidor farmacológico apresentam fortes evidências de que esta enzima é necessária para o vírus ao longo de seu ciclo multiplicativo. Não descartamos a possibilidade de o inibidor ser inespecífico, atuando não apenas na cPLA2, mas também em outras proteínas celulares, ou até mesmo virais. A alta toxicidade do inibidor em concentrações acima de 10 μ M apontam para esta possibilidade.

VII. CONCLUSÕES

O conjunto dos resultados obtidos neste estudo permitem concluir que:

- A infecção com o *Vaccinia virus* regula positivamente a ativação da cPLA2, aumentando os níveis desta proteína fosforilada nas células do hospedeiro infectadas.
- A regulação dos níveis celulares de P-cPLA2 pelo VACV acontece desde tempos precoces de infecção;
- O inibidor farmacológico RSC-3388 inibe a fosforilação da cPLA2, reduzindo, assim, os níveis citoplasmáticos desta proteína fosforilada;
- Concentrações acima de 7,5 μM do RSC-3388 são tóxicas para as células HeLa. Entretanto, foi verificado que esta concentração e a concentração de 5 μM são suficientes para reduzir significativamente a fosforilação da cPLA2, como observado por western blot;
- O inibidor RSC-3388 afeta negativamente o ciclo de multiplicação do VACV, reduzindo o título atingido pelo VACV nas curvas de multiplicação do mesmo. Esta inibição apresentou um padrão dose-dependente, no qual doses maiores do inibidor resultaram em reduções mais acentuadas dos títulos virais obtidos;
- A cPLA2 é regulada pela via sinalizadora celular de MEK/ERK e, possivelmente, dos fosfoinositídeos cinases PI3K/AKT/mTOR, uma vez que inibidores destas vias celulares reduziram os níveis de cPLA2 fosforilada nas células infectadas;
- A transfecção das células HeLa com o siRNA específico para a cPLA2 foi realizada com êxito. A concentração de 5nM do siRNA foi suficiente para reduzir significativamente as quantidades de P-cPLA2 nas células;
- A transfecção com o siRNA específico para cPLA2 não resultou em nenhuma alteração no ciclo de multiplicação do VACV;
- Não foi possível confirmar pela microscopia de fluorescência o efeito silenciador do siRNA contra a cPLA2, uma vez que a proteína se mostrou difusa por todo o citoplasma e núcleos celulares, sendo impraticável a quantificação da mesma;
- A análise por microscopia de fluorescência não permitiu associar a P-cPLA com o processo de morfogênese viral, pois não foi observado acúmulo desta proteína nas fábricas virais, retículo endoplasmático ou complexo de Golgi.

VIII. PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos neste estudo demonstram a necessidade de experimentos posteriores que auxiliem na elucidação da hipótese levantada. Para tanto ainda será necessário:

- Verificar a produção de ácido aracdônico em células HeLa tratadas com o inibidor RSC-3388, com o siRNA contra cPLA2 e com ambos;
- Realizar um teste de complementação com ácido aracdônico, adicionando o mesmo após o tratamento com o inibidor RSC-3388 para verificar uma possível restauração da capacidade multiplicativa do vírus;
- Avaliar os efeitos conjuntos do inibidor RSC-3388 e do siRNA específico para cPLA2 sobre o ciclo de multiplicação do VACV;
- Analisar, por qPCR, os níveis de expressão de c-PLA2, PLC- γ 1, PLD1 e PLD2 após o tratamento com o siRNA específico de cPLA2;
- Repetir a microscopia de fluorescência em células HeLa transfectadas com o siRNA contra cPLA2 e realizar o mesmo teste em células tratadas com o inibidor RSC-3388, utilizando também marcadores para proteínas de retículo, do complexo de Golgi e de fábricas virais;
- Avaliar, por microscopia eletrônica, o efeito do RSC-3388 no ciclo de multiplicação do VACV, principalmente ao longo da etapa de morfogênese.

IX. BIBLIOGRAFIA

AOCS – The American Oil Chemists’ Society – Lipid Library. Disponível em: <<http://lipidlibrary.aocs.org/Biochemistry/content.cfm?ItemNumber=39190>> Acesso em 19/02/2017

Babkin, I.V. and Babkina, I.N. (2015) The Origin of the Variola Virus. *Viruses*, **7**:1100-1112.

Baek, S., Kwak, J., Lee, S. H., Lee, T., Ryu, S. H., Uhlinger, S. J. and Lambeth, J. D. (1997). Lipase Activities of p37, the Major Envelope Protein of Vaccinia Virus. *J. Biol. Chem.* **51**(19): 32042-32049.

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

Bisht, H; Weisberg, A. S. and Moss, B. (2008) Vaccinia virus L1 protein is required for cell entry and membrane fusion. *Journal of Virology*, **82**(17): 8687-94.

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

Chlanda, P., Carbajal, M. A., Cyrklaff, M., Griffiths, G. and Krijnse-Locker, J. (2009). Membrane Rupture Generates Single Open Membrane Sheets during Vaccinia Virus Assembly. *Cell Host and Microbe*, **6**(1), 81–90.

Clark, J. D.; Lin, L. L.; Kriz, R. W.; Ramesha, C. S.; Sultzman, L. A.; Lin, A. Y.; Milona, N. and Knopf, J. L. (1991). A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA₂ contains a Ca²⁺-dependent translocation domain with homology to PKC and GAP. *Cell.* **65**(6):1043-1051.

Cocco L., Follo M. Y., Manzoli L. and Suh P. G. (2015). Phosphoinositide-specific phospholipase C (PI-PLC) in health and disease. *J. Lipid Res.* Epub ahead of print.

Dabral, D. & Coorsen, J. R. (2017). Phospholipase A2: Potential roles in native membrane fusion. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology.* **85**: 1-5.

Dales, S. & Mosbach, E. H. (1968). Vaccinia as a model for membrane biogenesis. *Virology.* **35**:564–583.

Dimitrov, D. S. (2004). Virus entry: Molecular mechanisms and biomedical applications. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**:109–122.

Fenner, F. (2000). Adventures with poxviruses of vertebrates. *FEMS Microbiol Rev*, **24**(2): 123-33.

Frabutt, D. A. & Zheng, Y. (2016). Arms Race between Enveloped Viruses and the Host ERAD Machinery. *Viruses.* **8**: 1-21.

Girod, A., Wobus, C.E., Zadori, Z., Ried, M., Leike, K., Tijssen, P., Kleinschmidt, J.A. and Hallek, M. (2002). The VP1 capsid protein of adeno-associated virus type 2 is carrying a phospholipase A2 domain required for virus infectivity. *J. Gen. Virol.* **83**:973–978.

Guerra, S., López-Fernández, L. A., Pascual-Montano, A., Nájera, J. L., Zaballos, A., and Esteban, M. (2006). Host response to the attenuated poxvirus vector NYVAC: upregulation of apoptotic genes and NF- κ B-responsive genes in infected HeLa cells. *Journal of Virology.* **80**(2): 985-998.

Guy A. & Thompson, Jr. The Regulation of Membrane Lipid Metabolism, Second Edition. CRC Press, Mar 10, 1992 - Medical - 240 pages.

Haller, S. L.; Peng C.; McFadden G. and Rothenburg S. (2014). Poxviruses and the evolution of host range and virulence. *Infection Genetics and Evolution*. **21**: 15-40.

Hefner, Y.; Bo'rsch-Haubold, A. G.; Murakami, M.; Wilde, J. I.; Pasquet, S.; Schieltz, D.; Ghomashchi, F.; Yates III, J. R.; Armstrong, C. G.; Paterson, A.; Cohen, P.; Fukunaga, R.; Hunter, T.; Kudo, I.; Watson, S. P. and Gelb, M. H. (2000). Serine 727 Phosphorylation and Activation of Cytosolic Phospholipase A2 by MNK1-related Protein Kinases. *J. Biol. Chem.* **275**(48): 37542–37551.

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

Huang, C., K. Jakobson, et al. (2004). MAP Kinases and cell migration. *J Cell Sci.* **117**(20): 7988-7999.

Humphries, A. C.; Dodding, M. P.; Barry, D. J.; Lucy M. Collinson, L. M.; Charlotte H. Durkin, C. H.; Way, M. (2012). Clathrin Potentiates Vaccinia-Induced Actin Polymerization to Facilitate Viral Spread. *Cell Host and Microbe*. **12**(3): 346-359.

Husain, M. & Moss, B. (2001). Vaccinia virus F13L protein with a conserved phospholipase catalytic motif induces colocalization of the B5R envelope glycoprotein in post-Golgi vesicles. *Journal of Virology*. **75**(16): 7528-7542.

Husain, M. & Moss, B. (2002). Similarities in the Induction of Post-Golgi Vesicles by the Vaccinia Virus F13L Protein and Phospholipase D. *Journal of Virology*. **76**(15): 7777-7789.

Internacional Committee On Taxonomy Of Viruses (ICTV). Master Species List 2017. Disponível em: <<http://www.ictvonline.org>> Acesso em 09/02/2017.

Jacobs, B. L., Langland, J. O., Kibler, K. V., Denzler, K. L., White, S. D., Holechek, S. A., Wong, S., Huynh, T. and Baskin, C. R. (2009). Vaccinia Virus Vaccines: Past, Present and Future. *Antiviral Res.* **84**(1): 1–13.

Kim H.S., Lee Y.H., Min D.S., Chang J.S., Ryu S.H., Ahn B.Y. and Suh PG. (1995). Tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma 1 by vaccinia virus growth factor. *Virology*. **214**(1): 21-8.

Kirkegaard, K., Taylor, M.P., and Jackson, W.T. (2004). Cellular autophagy: surrender, avoidance and subversion by microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**:301-314.

Knipe, D. M. & Howley, P. M. (2013). *Fields Virology*, 6th ed. Wolters Kluwer/LippincottWilliams &Wilkins Health:Philadelphia, PA, USA.

Kramer, R. M.; Roberts, E. F.; Um, S. L.; Borsch-Haubold, A. G.; Watson, S. P.; Fisher, M. J. and Jakubowski, J. A. (1996). p38 Mitogen-activated Protein Kinase Phosphorylates Cytosolic Phospholipase A2 (cPLA2) in Thrombin-stimulated Platelets. *J. Biol. Chem.* **271**: 27723–27729.

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

Langland, J. O., Kash, J. C., Carter, V., Thomas, M. J., Katze, M. G., and Jacobs, B. L. (2006). Suppression of proinflammatory signal transduction and gene expression by the dual nucleic acid binding domains of the Vaccinia virus E3L proteins. *Journal of Virology*. **80**(20): 10083-10095.

Leslie, C. C. (2015). Cytosolic phospholipase A2: physiological function and role in disease. *Journal of Lipid Research*. **56**: 1386-1402.

Lin, L. L.; Wartmann, M.; Lin, A. Y.; Knopf, J. L.; Seth, A. and Davis R. J. (1993). cPLA2 Is Phosphorylated and Activated by MAP Kinase. *Cell*. **72**(29): 269-278.

Locker, J. K., Chlanda, P., Sachsenheimer, T. and Brügger, B. (2013). Poxvirus membrane biogenesis: rupture not disruption. *Cell Microbiol*. **15**(2): 190–199.

Ludwig, H., Mages, J., Staib, C., Lehmann, M. H., Lang, R., and Sutter, G. (2005). Role of viral factor E3L in modified Vaccinia Virus Ankara infection of human HeLa cells: regulation of the virus life cycle and identification of differentially expressed host genes. *Journal of Virology*. **79**(4): 2584-2596.

Maruri-Avidal, L., Weisberg, A. S., Bisht, H., and Moss, B. (2013). Analysis of viral membranes formed in cells infected by a vaccinia virus L2-deletion mutant suggests their origin from the endoplasmic reticulum. *Journal of Virology*, **87**(3): 1861–71.

Maruri-Avidal L., Weisberg, A.S. and Moss B. (2013). Direct formation of vaccinia viral membranes from the endoplasmic reticulum in the absence of the newly characterized L2-interacting A30.5 protein. *Journal of Virology*, **87**(22): 12313–12326.

McFadden, G. (2005). Poxvirus Tropism. *Nature Reviews Microbiology*. **3**(3): 201-213.

McFadden, G. (2010). Killing a Killer: What Next for Smallpox? *Plos Pathogens*. **6**: 1-4.

Menzel, N., Fischl, W., Hueging, K., Bankwitz, D., Frentzen, A., Haid, S., Gentzsch, J., Kaderali, L., Bartenschlager, R. and Pietschmann, T. (2012). MAP-Kinase Regulated Cytosolic Phospholipase A2 Activity Is Essential for Production of Infectious Hepatitis C Virus Particles. *Plos Pathogens*. **8**(7): 1-7.

Morrison, D.K. (2012). MAP Kinases Pathways. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 4a011254.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. **65**: 1-2, 55-63.

Moss, B. (2013). Poxviridae: the viruses and their replication. *Fields Virology*, pp.2129-59. 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.

Moss, B. (2016). Poxvirus membrane Biogenesis. *Virology*. **0**: 619–626.

Mouchlis, V. D. & Dennis, E. A. (2015). Membrane and inhibitor interactions of intracellular phospholipases A2. *Advances in Biological Regulation*. **61**:17-24.

Muller, V. D., Soares, R. O., dos Santos, N. N. Jr., Trabuco, A. C., Cintra, A. C., Figueiredo, L. T., Caliri, A., Sampaio, S. V. & Aquino, V. H. (2014). Phospholipase A2 isolated from the venom of *Crotalus durissus terrificus* inactivates dengue virus and other enveloped viruses by disrupting the viral envelope. *Plos One*. **9**(11).

Naguib, A. (2016). Following the trail of lipids: Signals initiated by PI3K function at multiple cellular membranes. *Sci Signal*. **9**(428)

Oliver, K.G., Buller, R.M., Hughes, P.J., Putney, J.W. Jr. and Palumbo, G. J. (1992). Inhibition of agonist-induced activation of phospholipase C following poxvirus infection. *J Biol Chem*. **267**(35): 25098-25103.

Qu, X., Liu, W., Qi, Z., Duan, Z. e Zheng, L., Kuang, Z., Zhang, W. e Hou, Y. (2008). Phospholipase A2-like activity of human bocavirus VP1 unique region. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **365**: 158–163.

Reeves, P. M.; Bommarium, B.; Lebeis, S.; Shannon, M.; Christensen, J.; Swimm, A.; Chahroudi, A.; Chavan, R.; Feinberg, M. B.; Veach, D.; Bornmann, W.; Sherman, M., Kalman, D. (2005). Disabling poxvirus pathogenesis by inhibition of Abl-family tyrosine kinases. *Nature Medicine*. **11**(7):731-739.

Roberts, K. L. & Smith, G. L. (2008). Vaccinia virus morphogenesis and dissemination. *Trends in Microbiology*. **16**(10): 472-479.

Schmidt, F. I.; Bleck, C. K. E.; Reh, L.; Novy, K.; Wollscheid, B.; Helenius, A.; Henning Stahlberg, H. and Mercer, J. (2013). Vaccinia Virus Entry Is Followed by Core Activation and Proteasome-Mediated Release of the Immunomodulatory Effector VH1 from Lateral Bodies. *Cell Reports*. **4**: 464-476.

Schaloske, R. H. & Dennis, E. A. (2006). The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1761**: 1246–1259.

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

Smith, G. L.; Vanderplasschen, A. and Law, M. (2002). The formation and function of extracellular enveloped vaccinia virus. *Journal of General Virology*. **83**:2915–2931.

Smith, G. L. & McFadden, G. (2002). Smallpox: anything to declare? *Nat Rev Immunol*. **2**(7): 521-527.

Smith, G. L.; Brendan J. Murphy, B. J. and Law, M. (2003). Vaccinia virus motility. *Annu. Rev. Microbiol*. **57**: 323–42.

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

Thèves, C., Crubézy, E., and Biagini, P. (2016). History of Smallpox and Its Spread in Human Populations. *Microbiol Spectrum*, **4**(4).

Tucker, D. E., Ghosh, M., Ghomashchi, F., Loper, R., Suram, S., St. John, B., Girotti, M., Bollinger, J. G., Gelb, M. H. and Leslie, C. C. (2009). Role of phosphorylation and basic residues in the catalytic domain of cytosolic phospholipase A 2 alpha in regulating interfacial kinetics and binding and cellular function. *J. Biol. Chem*. **284**:9596 – 9611.

Tucker, J. B. Scourge: the once and future thread of smallpox. Grove Press, 2002 - History - 320 pages.

Wada, T. & Penninger, J., M. (2004). Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene*. **23**: 2838–2849.

Welsch, S., Muller, B. and Krausslich, H.G. (2007). More than one door — Budding of enveloped viruses through cellular membranes. *FEBS Lett.* **581**: 2089–2097.

Yang, SH., Sharrocks A. D. and Whitmarsh, A. J. (2013). MAP kinase signalling cascades and transcriptional regulation. *Gene*. **513**: 1–13.

Z. Zadori, Z., Szelei, J., Lacoste, M.C., Li, Y., Gariepy, S., Raymond, P., Allaire, M., Nabi, I. R., e Tijssen, P. (2001). A viral phospholipase A2 is required for parvovirus infectivity, *Dev. Cell* **1**: 291–302.