

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

Tese de Doutorado

Envolvimento de p38 MAPK no ciclo de vida do *Vaccinia virus*

Jonas Dutra Albarnaz

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

Envolvimento de p38 MAPK no ciclo de vida do *Vaccinia virus*

Tese apresentada como requisito para a obtenção do título de Doutor em Microbiologia pelo Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Jonas Dutra Albarnaz

Orientador: Prof. Cláudio Antônio Bonjardim

Belo Horizonte, fevereiro de 2014.

SUMÁRIO

SUMÁRIO.....	i
Agradecimentos	v
LISTA DE TABELAS	ix
ABREVIATURAS.....	x
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT	xiv
INTRODUÇÃO	1
1. Os Poxvírus.....	2
1.1. Circulação de Vaccinia virus no Brasil	2
1.2. Vaccinia virus Belo Horizonte.....	4
2. Aspectos gerais da biologia dos poxvírus	5
2.1. Morfologia	5
2.2. Genoma	7
2.3. Ciclo de multiplicação dos poxvírus	9
2.4. Patogênese	17
3. Interação poxvírus-hospedeiro: balanço entre fatores celulares e produtos gênicos virais	18
4. MAPKs (proteínas cinases ativadas por mitógenos)	25
4.1. p38 MAPK.....	26
JUSTIFICATIVA	32
OBJETIVOS	35
1. Objetivo Geral	35
2. Objetivos Específicos	35
MATERIAL E MÉTODOS	36
1. Células	36
1.1. Células BSC40.....	36
1.2. Células A31.....	36
1.3. Células HeLa.....	36
2. Vírus.....	37
2.1. Produção dos estoques virais	37
2.2. Purificação viral.....	38

2.3. Titulação viral	38
3. Anticorpos e inibidores	39
4. Silenciamento de p38 α MAPK através da tecnologia de RNA interferente.....	39
4.1. Clonagem do inserto dos shRNAs no vetor pSilencer	40
4.2. Transfecção de células A31 com fosfato de cálcio e seleção dos clones.....	43
5. Infecção <i>in vitro</i>	43
6. Fenótipo da placa de lise viral	44
7. Extração de proteínas totais.....	45
8. Fracionamento celular	45
9. Transferência de “Western”.....	46
10. Extração do RNA total.....	47
11. Transcrição reversa.....	47
12. PCR Quantitativo.....	48
13. Microscopia eletrônica de transmissão.....	50
14. Microscopia confocal a <i>laser</i>	50
15. Análise estatística	51
RESULTADOS.....	52
1. O inibidor de p38 α / β MAPK, SB203580, afeta diferencialmente a multiplicação de duas amostras de <i>Vaccinia virus</i>	52
2. Efeito do inibidor de p38 α / β MAPK SB203580 sobre o acúmulo de proteínas e a morfogênese do <i>Vaccinia virus</i>	57
3. O <i>Vaccinia virus</i> regula temporalmente a ativação das MAPKs ERK, JNK e p38	65
4. Ativação das MAPKs ERK, JNK e p38 durante a infecção pelo <i>Vaccinia virus</i> na presença do inibidor de p38 α / β MAPK SB203580	67
5. Ativação de MK2 durante a infecção pelo <i>Vaccinia virus</i>	71
6. O inibidor de p38 α / β SB203580 inibe a disseminação do <i>Vaccinia virus</i>	72
7. Efeito do silenciamento de p38 α MAPK sobre o ciclo de vida do <i>Vaccinia virus</i>	76
8. Efeitos da inibição de p38 MAPK sobre multiplicação do <i>Vaccinia virus</i> em células mantidas com alta concentração de soro	81
DISCUSSÃO	86

CONCLUSÕES	99
PERSPECTIVAS.....	100
OUTRAS CONTRIBUIÇÕES.....	102
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103

À minha mãe e ao meu pai, dedico esta tese.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Cláudio Bonjardim, por acreditar em mim e me dar a liberdade para crescer profissionalmente;

À Profa. Erna Kroon, pelas valiosas críticas ao longo do desenvolvimento deste trabalho;

Ao Prof. Paulo Ferreira, pela disposição em ouvir sempre;

À Profa. Giliane Trindade, pelo estímulo para o desenvolvimento deste trabalho;

Ao Prof. Jônatas Abrahão, pelas contribuições a este trabalho e pelas oportunidades de colaboração;

Ao Prof. Grant McFadden, por me receber em seu laboratório na Universidade da Flórida;

Ao João, pelos muitos ensinamentos e por compartilhar conosco suas hipóteses vanguardistas sobre vacinas e sobre a patogênese da dengue;

Aos funcionários e bolsistas de apoio técnico antigos e atuais, por tornar o trabalho diário no laboratório mais fácil: Ângela, Ilda, Andreza, Gisele Cirilo, Lucrécia, Gisele Olinto, Marcela, Flávia Viana, Ana Paula Moreira, Andréia, Luís, Kétyllen, Paula;

Às pessoas que fizeram parte da minha trajetória, ao longo desses seis anos no Laboratório de Vírus: Eliseu, Leandra, Ana Paula Pessoa, Flávia Gama, Bruno Brasil, Leonardo, Luciana, Carla, André Fernandes, Hélina, Pedro, Felipe, Filippo, André Fabrício, Rafael Palhares, Gabriel, Lara, Ana Paula Moreira, Graciela, lara, Jônatas, e muitos outros, que talvez eu tenha esquecido de citar aqui;

À Iara, pelas conversas *non sense* nestes últimos dias, enquanto a corda roçava no pescoço, o que não foi motivo para desperdiçar boas risadas e teorias sobre a circulação de *Vaccinia* no Brasil;

Às alunas de iniciação científica que tive a oportunidade de orientar, pela ajuda imprescindível ao longo do desenvolvimento deste trabalho: Paloma, Camila e Luisa;

Às *pretties* que se foram, pelos momentos descontraídos passados juntos: Gisele Olinto, Marcela e Marieta;

Às *pretties* que ficaram, e que tornam os dias de trabalho mais leves, porque qualquer hora é hora para um café demorado e qualquer bobagem é motivo para boas risadas: Alice e Flávia Viana;

À Alice, pela companhia de bancada no último ano e pela sua inestimável ajuda ao longo do desenvolvimento deste trabalho;

Aos técnicos do Centro de Microscopia da UFMG: Denilson, Kinulpe, Roberta e Natália;

Às agências financiadoras: CNPq, CAPES e FAPEMIG;

Aos amigos distantes, espalhados por aí, pelos encontros esporádicos, mas com muita conversa boa e risadas;

À minha família, pelo apoio incondicional às escolhas que fiz.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do vírion dos poxvírus.....	6
Figura 2. Organização geral do genoma dos poxvírus (modificado de SMITH; MCFADDEN, 2002).....	8
Figura 3. Representação esquemática do ciclo de multiplicação dos poxvírus (modificado de MCFADDEN, 2005).	11
Figura 4. Algumas proteínas de <i>Vaccinia virus</i> relacionadas à evasão da resposta imune do hospedeiro (modificado de PERDIGUERO; ESTEBAN, 2009).....	19
Figura 5. Vias sinalizadoras celulares são requeridas durante a infecção pelo <i>Vaccinia virus</i>	21
Figura 6. Representação esquemática da via sinalizadora de p38 MAPK (modificado de CHOULTHARD <i>et al.</i> , 2009).....	27
Figura 7. Representação esquemática do vetor pSilencer3.1-H1 neo. (Fonte: www.ambion.com).....	42
Figura 8. O inibidor de p38 α / β MAPK SB203580 inibe diferencialmente a multiplicação do <i>Vaccinia virus</i> Western Reserve e Belo Horizonte.....	53
Figura 9. A multiplicidade de infecção, a concentração de soro no meio de cultivo e a linhagem celular influenciam o efeito do inibidor de p38 α / β MAPK SB203580 sobre a multiplicação do <i>Vaccinia virus</i>	55
Figura 10. Efeito do inibidor de p38 α / β MAPK SB203580 sobre o acúmulo de proteínas precoces e tardias do <i>Vaccinia virus</i> em células A31.....	59
Figura 11. O inibidor de p38 α / β MAPK SB203580 afeta o acúmulo de proteínas do <i>Vaccinia virus</i> em células HeLa.....	60
Figura 12. O inibidor de p38 α / β MAPK SB203580 inibe a morfogênese de vírions maduros do <i>Vaccinia virus</i> (VACV) Belo Horizonte, mas não do VACV Western Reserve.	62
Figura 13. O inibidor de p38 α / β MAPK SB203580 induz extensa vacuolização do citoplasma.	64
Figura 14. O inibidor de p38 α / β MAPK SB203580 afeta o empacotamento de vírions maduros.....	66
Figura 15. <i>Vaccinia virus</i> Western Reserve e Belo Horizonte disparam a ativação de p38 MAPK em células A31.....	68

Figura 16. p38 MAPK e seu substrato MK2 localizam-se no compartimento citoplasmático das células infectadas pelo <i>Vaccinia virus</i>	70
Figura 17. A ativação da via p38-MK2 durante a infecção pelo <i>Vaccinia virus</i> é disparada por um sinal pré-replicativo.....	73
Figura 18. <i>Vaccinia virus</i> dispara a ativação de p38 MAPK e MK2 em células HeLa.....	74
Figura 19. O inibidor de p38 α / β MAPK SB203580 inibe a disseminação do <i>Vaccinia virus</i>	75
Figura 20. Efeito do silenciamento de p38 α MAPK por shRNA sobre a multiplicação do <i>Vaccinia virus</i> Western Reserve e Belo Horizonte.....	78
Figura 21. Efeito do silenciamento de p38 α MAPK por shRNA na formação das placas de lise do <i>Vaccinia virus</i>	80
Figura 22. Ativação da via de p38 MAPK durante a infecção pelo <i>Vaccinia virus</i>	82
Figura 23. O acúmulo de proteínas tardias do <i>Vaccinia virus</i> é alterado pelo inibidor de p38 α / β MAPK SB203580.	83
Figura 24. A infecção pelo <i>Vaccinia virus</i> inibe a ciclina D1.....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequências dos shRNAs utilizados para o silenciamento da expressão de p38 α MAPK ou GFP (WANG <i>et al.</i> , 2008).....	41
Tabela 2. Iniciadores utilizados para a avaliação da expressão do mRNA de p38 α MAPK e p38 β MAPK nas células expressando shRNA de p38 α MAPK e de GFP.	49

ABREVIATURAS

AIDS – Síndrome da imunodeficiência adquirida

ATI – corpúsculo de inclusão do tipo acidófilo

BAV – *Vaccinia virus* BeAn 58058

BR-VACV – amostras brasileiras de *Vaccinia virus*

cDNA – DNA complementar

CEV – vírion envelopado associado à célula

CO₂ – dióxido de carbono

CPXV – *Cowpox virus*

Crm – modificador da resposta de citocinas

CTGV – *Vaccinia virus* Cantagalo

CVB3 – vírus coxsackie B3

DMEM – meio essencial mínimo modificado por Dulbecco

DNA – ácido desoxirribonucleico

dsRNA – RNA fita dupla

ECP – efeito citopático

EEV – vírion envelopado extracelular

EV – vírion extracelular

e.g. – *exempli gratia* (por exemplo)

EGR1 – gene de resposta precoce ao crescimento

ERK – cinase regulada por sinal extracelular

GAG - glicosaminoglicana

GP1V – *Vaccinia virus* Guarani P1

GP2V – *Vaccinia virus* Guarani P2

hpi – horas pós-infecção

ha – hemaglutinina

HIV – *Human immunodeficiency virus*

IEV – vírion envelopado intracelular

IFN – interferon

IFN α / β -BP – proteína que liga a IFN α / β

IFN γ R – receptor de IFN γ

IL – interleucina

IMV – vírion maduro intracelular
i.n. – intranasal
IRF3 – fator regulatório de interferon
ITR – repetição terminal invertida
IV – vírion imaturo
JNK – cinase do N-terminal de c-Jun
LD₅₀ – dose letal a 50%
MAPK – proteína cinase ativada por mitógeno
MCA – membrana corioalantoide
MCV – *Molluscum contagiosum virus*
MEF – fibroblasto embrionário de camundongo
MEM – meio essencial mínimo
MEK – cinase da MAPK ERK
MKK – MAPK cinase
MOI – multiplicidade de infecção
MYXV – *Myxoma virus*
mRNA – RNA mensageiro
MV – vírion maduro
NFκB – fator nuclear κB
NYCBH – New York City Board of Health
OMS – Organização Mundial da Saúde
ORF – janela aberta de leitura
PBS – solução tamponada de fosfato
PCR – reação em cadeia da polimerase
pfu – unidade formadora de placa
PI3K – fosfatidilinositol 3-cinase
PKR – proteína cinase dependente de RNA
PSTV – *Vaccinia virus* Passatempo
RFV – *Rabbit fibroma virus*
RNA – ácido ribonucleico
rpm – rotação por minuto
SAV – *Vaccinia virus* SPAn 232
SFB – soro fetal bovino

siRNA – RNA interferente curto
shRNA – RNA em alça curto
TK – timidina cinase
TLR – receptores do tipo Toll
TNF – fator de necrose tumoral
UV – ultravioleta
VACV – *Vaccinia virus*
VACV-WR – *Vaccinia virus* Western Reserve
VBH – *Vaccinia virus* Belo Horizonte
VETF – fator de transcrição precoce do *Vaccinia virus*
VGF – fator de crescimento do *Vaccinia virus*
WV – vírion empacotado

RESUMO

Os vírus dependem extensivamente das funções celulares de seus hospedeiros para completarem seu ciclo de vida. Durante a infecção, os vírus co-optam vias de sinalização responsáveis por regular aspectos centrais da fisiologia celular, a fim de modificar o meio intracelular e torná-lo propício à reprodução e disseminação virais. A importância das MAPKs (proteínas cinases ativadas por mitógenos) ERK1/2 e JNK1/2 para a multiplicação e disseminação, respectivamente, do *Vaccinia virus* (VACV) já é conhecida, mas pouco se sabe sobre o envolvimento de p38 MAPK. Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar a ativação e a relevância funcional de p38 MAPK no ciclo de vida do VACV Western Reserve (WR), uma amostra de referência, e do VACV Belo Horizonte (VBH), amostra isolada de um surto de varíola murina que acometeu camundongos de laboratório. O inibidor farmacológico de p38 α/β MAPK, SB203580, inibiu diferencialmente a multiplicação do VACV-WR e do VBH tanto em células A31 (camundongo), como em células HeLa (humano) e BSC40 (primata não humano). A inibição da multiplicação viral foi associada à redução do acúmulo de algumas proteínas virais tardias e, em células A31 infectadas pelo VBH, houve uma diminuição de ~60% no número de vírions maduros (MVs). A ativação de p38 MAPK foi detectada em tempos tardios de infecção, assim como a fosforilação de seu substrato MK2, que foi ativada por um sinal anterior à replicação do genoma viral. A disseminação do VACV-WR também sofreu acentuada redução em presença do SB203580 nas três linhagens celulares testadas. O efeito do SB203580 sobre a multiplicação e a disseminação do VACV foi independente de p38 α MAPK. Em conjunto, esses resultados indicam que p38 MAPK é co-optada pelo VACV e desempenha funções pleiotrópicas durante a infecção, participando na reprodução e disseminação da progênie viral.

Palavras-chave: *Vaccinia virus*; p38 MAPK; interação vírus-hospedeiro; multiplicação; disseminação

ABSTRACT

Viruses rely extensively on host cell functions to complete their lifecycles. During infection, viruses co-opt signaling pathways, key regulators of cell physiology, to achieve an intracellular milieu suitable for productive viral reproduction and spread. The functional relevance of host MAPKs (mitogen-activated protein kinases) ERK1/2 and JNK1/2 for multiplication and dissemination, respectively, of *Vaccinia virus* (VACV) is well known, but the involvement of p38 MAPK is underappreciated. Therefore, this study evaluated the activation and functional relevance of p38 MAPK in the lifecycle of VACV Western Reserve (WR), a laboratory strain, and VACV Belo Horizonte (VBH), a strain isolated from a mousepox outbreak in an animal facility. The pharmacological inhibitor of p38 α / β MAPK SB203580 inhibited differentially the multiplication of VACV-WR and VBH in mouse A31 cells, human HeLa cells and non-human primate BSC-40 cells. Inhibition of viral replication was associated with a reduced accumulation of some late viral proteins and, in VBH-infected A31 cells, a diminished formation of mature virions (MVs). Activation p38 MAPK was detected late during infection, as well as the phosphorylation of its substrate MK2 by a signal triggered prior to viral genome replication. Reduction in VACV-WR dissemination was observed in the presence of SB203580 in the cell lines tested. The effects of SB203580 on VACV multiplication and dissemination occurred in a p38 α MAPK-independent manner. Taken together, these results demonstrate that p38 MAPK is co-opted by VACV and plays pleiotropic functions during infection, supporting production and spread of the viral progeny.

Key words: *Vaccinia virus*; p38 MAPK; virus-host interaction; multiplication; dissemination

INTRODUÇÃO

Os poxvírus têm sido extensivamente estudados ao longo da história da virologia. Dentre os poxvírus, estão os primeiros vírus animais observados ao microscópio, multiplicados e titulados em cultivo celular, fisicamente purificados e quimicamente analisados (MOSS, 2007). Entretanto, o melhor exemplo da sua contribuição à ciência e à humanidade foi a utilização de um poxvírus de identidade incerta, causador de doença branda em bovinos e ordenhadores, como vacina contra a varíola, por Edward Jenner, em 1796. Esse evento marcou o início da era das vacinas, que revolucionou a prática médica da prevenção de doenças desde então ao salvar milhões, quiçá bilhões, de pacientes acometidos por doenças infecciosas. Dois séculos depois, nas décadas de 1960 e 1970, a Organização Mundial da Saúde (OMS), dessa vez utilizando diferentes amostras de *Vaccinia virus* como vacina, coordenou um esforço internacional de vacinação contra a varíola, culminando com a erradicação dessa doença, declarada oficialmente extinta pela OMS em 1980 (SMITH; MCFADDEN, 2002).

Apesar de novos casos naturais de varíola não terem sido relatados desde então, o número de registros de infecções zoonóticas por outros poxvírus em animais domésticos e em humanos tem aumentado consideravelmente recentemente, caracterizando-as como um importante problema de saúde pública e despertando o interesse em mais estudos acerca dessa grande e diversa família de vírus (LEWIS-JONES, 2004; TRINDADE *et al.*, 2007; SHCHELKUNOV, 2013).

Os poxvírus também são extensivamente estudados devido à sua aplicação como vetores vacinais, vetores de expressão heteróloga de proteínas ou agentes oncolíticos. Apesar de até o momento os avanços serem discretos, os poxvírus têm aberto novos horizontes para a pesquisa biomédica, que vislumbra estratégias profiláticas e terapêuticas mais eficazes e seguras para importantes doenças humanas, tais como a AIDS (síndrome da imunodeficiência adquirida) e o câncer (MCFADDEN, 2005; BREITBACH *et al.*, 2011; GARCÍA *et al.*, 2011).

1. Os Poxvírus

Os poxvírus, reunidos na família *Poxviridae*, caracterizam-se por apresentar genoma de DNA de fita dupla linear, contendo de 130 a 300 kpb e com capacidade codificadora gênica em torno de 200 genes. Os poxvírus possuem vírion com morfologia complexa, formato ovoide ou de tijolo e dimensões em torno de 300 nm, e completam o seu ciclo de replicação inteiramente no citoplasma da célula hospedeira (MOSS, 2007).

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

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

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

1.1. Circulação de *Vaccinia virus* no Brasil

No Brasil, a partir de 1999, a circulação de VACV foi constatada durante surtos de doença exantemática que acometeu o gado leiteiro e ordenhadores, especialmente na Região Sudeste. O VACV foi identificado como o agente etiológico dessas infecções que, desde então, são caracterizadas como zoonoses emergentes no país (DAMASO *et al.*, 2000; TRINDADE *et al.*, 2003; LEITE *et al.*, 2005; TRINDADE *et al.*, 2006; TRINDADE *et al.*, 2007; ABRAHÃO *et al.*, 2009; ASSIS *et al.*, 2012). A circulação de VACV também já foi confirmada

em roedores silvestres e de camundongos de laboratório, e há evidência sorológica da circulação de *Orthopoxvirus* em búfalos e em macacos (FONSECA *et al.*, 1998; FONSECA *et al.*, 2002; TRINDADE *et al.*, 2004; ABRAHÃO *et al.*, 2010; ASSIS *et al.*, 2012).

Existe grande discussão acerca da origem das amostras de VACV circulantes no Brasil (BR-VACV). Alguns autores propõem sua origem a partir da disseminação das amostras utilizadas para vacinação contra varíola no Brasil, principalmente VACV-IOC e VACV-Lister-Butantan, e o estabelecimento da circulação de VACV entre animais domésticos e silvestres, sendo eventualmente transmitido ao homem (DAMASO *et al.*, 2000; TRINDADE *et al.*, 2003; LEITE *et al.*, 2005).

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

Estudos filogenéticos e de virulência em camundongos mostraram que há duas subpopulações de BR-VACV. Os BR-VACV virulentos incluem as amostras Guarani P1 (GP1V), Belo Horizonte (VBH), SPAn 232 (SAV), BeAn 58058 (BAV) e Pelotas 1 (P1V), que apresentam alta morbidade e mortalidade em camundongos BALB/c após inoculação intranasal. Já as amostras Araçatuba (ARAV), Passatempo (PSTV), Guarani P2 (GP2V) e Pelotas 2 (P2V) são avirulentas, ou seja, não causam sinais clínicos ou morte nos camundongos infectados, e apresentam uma deleção de 18 nucleotídeos no gene A56R/HA (hemaglutinina) (TRINDADE *et al.*, 2007; FERREIRA *et al.*, 2008; CAMPOS *et al.*, 2011). Além disso, análises filogenéticas realizadas com sequências de dez genes virais relacionados a virulência, imunomodulação e espectro de hospedeiro reforçaram a ideia de existência de duas subpopulações de BR-

VACV, corroborando os dados obtidos com os estudos de virulência (DRUMOND *et al.*, 2008; FERREIRA *et al.*, 2008).

1.2. *Vaccinia virus Belo Horizonte*

O *Belo Horizonte virus* ou *Vaccinia virus Belo Horizonte* (VBH) foi isolado no Laboratório de Vírus durante um surto de varíola murina no Centro de Bioterismo da UFMG. O vírus foi isolado do fígado, do baço e de lesões da cauda de animais doentes através de inoculação dessas amostras em membrana corioalantoide (MCA) de ovos embrionados de galinha e em culturas de células Vero. A identificação do vírus foi feita através da observação do efeito citopático característico em MCA (morfologia do “pock”), microscopia eletrônica e neutralização com soro anti-VACV (DINIZ *et al.*, 2001; TRINDADE *et al.*, 2004).

Análises genéticas [restrição do DNA viral com a endonuclease *HindIII*, hibridação com o DNA do VACV Western Reserve (WR) marcado radioativamente, e obtenção das sequências dos genes virais J2R/TK (timidina cinase), C11L/VGF (fator de crescimento de *Vaccinia virus*) e A56R/HA] mostraram muita similaridade entre VBH e VACV-WR e derrubaram as suspeitas iniciais de se tratar de *Ectromelia virus*, que comumente acomete colônias de camundongos (TRINDADE *et al.*, 2004). Entretanto, análises subsequentes mostraram algumas diferenças genéticas entre essas duas amostras, como a deleção quase completa do gene A25L/ATI (corpúsculo de inclusão do tipo acidófilo) e uma deleção única de 59 nucleotídeos no gene C22L/CrmB (modificador da resposta de citocinas B) no genoma do VBH, quando comparado com VACV-WR. Entretanto, ambos os genes codificam produtos não funcionais em ambas as amostras, devido a mutações que alteram a fase de leitura das “janelas aberta de leitura” (ORFs, do inglês *open reading frames*) (TRINDADE *et al.*, 2004; MOTA, 2006).

As sequências de outros dez genes do VBH, relacionados a virulência, imunomodulação e espectro de hospedeiro também foram obtidas, a saber: B5R, B8R, B18R, C6L, C7L, C23L, E3L, K1L, K2L e K3L. Desses, apenas os genes B18R e K2L do VBH apresentaram polimorfismos quando comparados com os mesmos genes do VACV-WR. As análises filogenéticas baseadas nas

sequências desses genes mostraram que o VBH é bastante relacionado ao VACV-WR (DRUMOND *et al.*, 2008; ASSIS *et al.*, 2012).

Em relação à virulência, após a inoculação intranasal de camundongos, o VBH mostrou-se uma das amostras mais virulentas, apresentando a menor LD₅₀ (dose letal para 50%) dentre os BR-VACV, de 5×10^3 pfu (unidades formadoras de placa); a LD₅₀ do VACV-WR foi de 1×10^4 pfu (FERREIRA *et al.*, 2008). O VBH causou infecção sistêmica nos camundongos, que apresentaram um grave acometimento do trato respiratório, com evidência de infecção de células do infiltrado inflamatório no pulmão, ruptura da parede alveolar, destruição bronquiolar e necrose epitelial na mucosa pulmonar (FERREIRA *et al.*, 2008).

2. Aspectos gerais da biologia dos poxvírus

2.1. Morfologia

O vírion dos poxvírus, baseado em estudos realizados com o VACV, apresenta formato ovoide ou de tijolo, com dimensões de cerca de 360×270×250 nm. É envolto por uma membrana externa, de natureza lipoproteica, de 5-6 nm de espessura, coberta por protruções irregulares. Internamente, o vírion possui nucleocapsídeo ou cerne bicôncavo, com formato de haltere quando observado em corte transversal, que contém o genoma viral. Entre as concavidades do cerne e a membrana externa, estão localizados os corpúsculos laterais, de natureza proteica (CONDIT *et al.*, 2006; MOSS, 2007) (Figura 1).

A parede do cerne parece ser composta de duas camadas, somando cerca de 18-19 nm de espessura. A camada externa apresenta uma estrutura de paliçada, formada por espículas em formato de T ancoradas na camada interna, que aparentemente é contínua, exceto por um pequeno número de canais (CONDIT *et al.*, 2006; MOSS, 2007). A ultraestrutura interna do cerne não está completamente compreendida, mas parece consistir de duas fases, sendo a fase mais densa, localizada sob a parede do cerne, aparentemente composta por elementos de morfologia fibrilar, provavelmente de natureza nucleoproteica (CONDIT *et al.*, 2006; MOSS, 2007).

Uma peculiaridade dos membros da família *Poxviridae* reside no fato da célula infectada produzir quatro tipos de vírions morfologicamente distintos: (i)

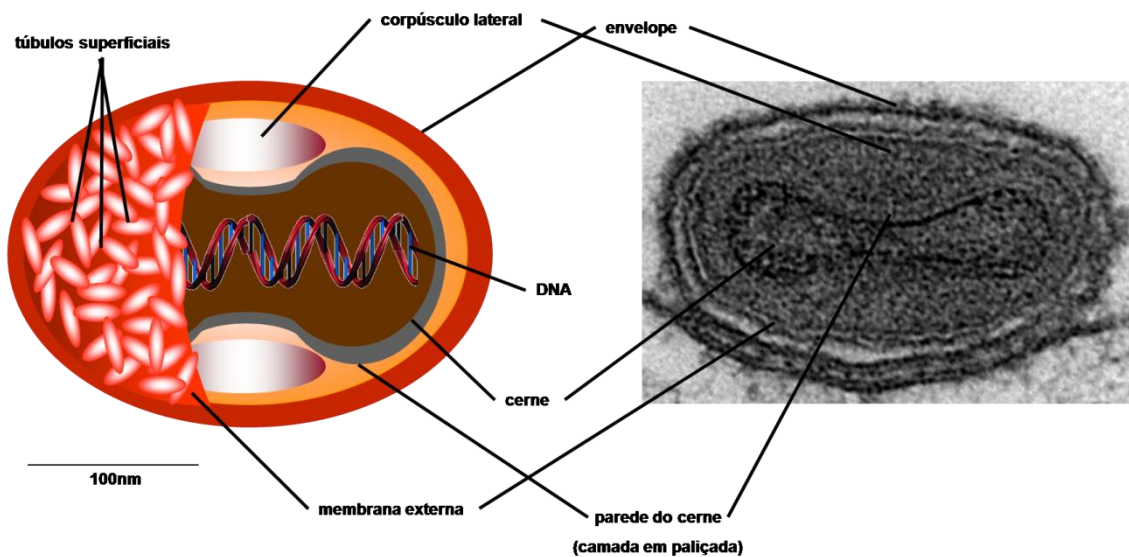


Figura 1. Representação esquemática do vírion dos poxvírus.

Nesse modelo do vírion dos poxvírus à esquerda são evidenciados os seus principais elementos estruturais: cerne, corpúsculos laterais, membrana externa e envelope (modificado de MOSS, 2007). À direita, micrografia eletrônica de um vírion de *Vaccinia virus* também é mostrada (imagem do autor).

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

As três formas infecciosas dos poxvírus desempenham funções distintas na disseminação viral. Ao passo que os CEVs medeiam a disseminação célula-a-célula, os EEVs são importantes para a disseminação sistêmica no organismo do hospedeiro e os IMVs, dada a sua maior estabilidade, realizam a disseminação entre hospedeiros (SMITH *et al.*, 2002; MCFADDEN, 2005).

Uma nova nomenclatura para as partículas dos poxvírus foi proposta por Moss (2006), na qual os IMVs passam a ser denominados víriões maduros (MVs), as formas EEV e CEV passam a ser chamadas conjuntamente de víriões extracelulares (EVs) e a forma IEV, de vírião empacotado (WV, do inglês *wrapped virion*).

2.2. Genoma

Os poxvírus possuem genoma de DNA de fita dupla linear que se encontra entre os maiores genomas de vírus animais, variando de 130 kpb para os *Parapoxvirus* a 300 kpb para os *Avipoxvirus*. O genoma dos poxvírus não é infeccioso *per se*; há necessidade da RNA polimerase viral e de outros fatores presentes no vírião para a expressão dos genes virais no citoplasma da célula infectada. Um aspecto importante do genoma dos poxvírus é que as extremidades das duas fitas de DNA são covalentemente ligadas através de alças não pareadas do tipo “grampo de cabelo” (*hairpin*) (MOSS, 2007) (Figura 2).

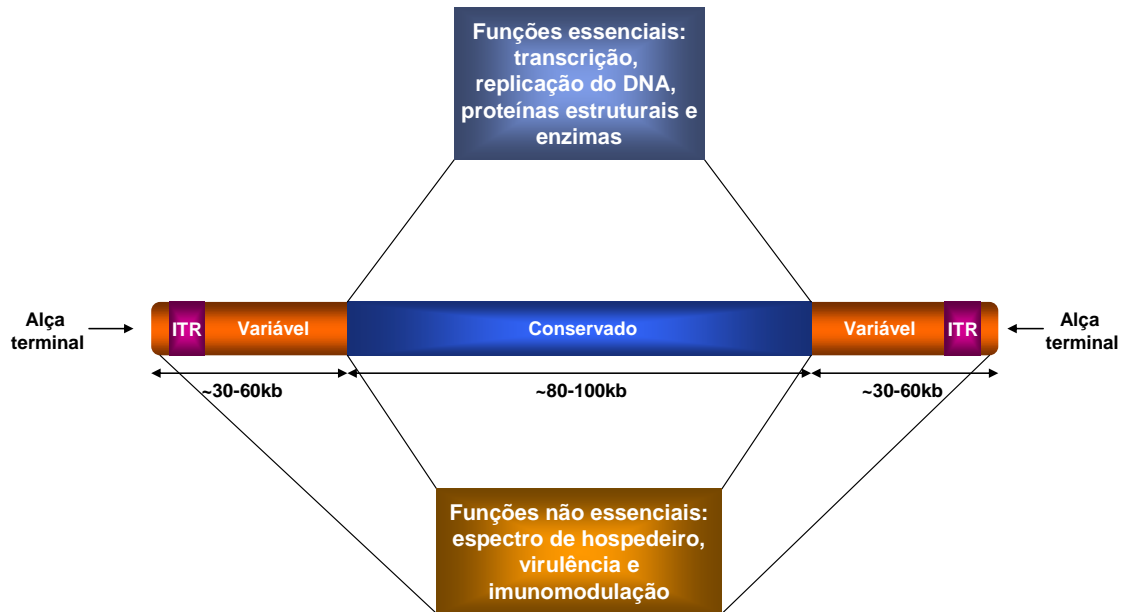


Figura 2. Organização geral do genoma dos poxvírus (modificado de SMITH; MCFADDEN, 2002).

Os poxvírus apresentam genoma de DNA de fita dupla linear com as extremidades covalentemente ligadas através das alças terminais. Os genes localizados na porção central do genoma são bastante conservados entre os poxvírus e codificam para proteínas relacionadas a funções essenciais à replicação viral em cultura de células, ao passo que nas extremidades encontram-se as ITRs (repetições terminais invertidas) e genes variáveis que codificam proteínas relacionadas a funções não essenciais.

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

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

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

2.3. Ciclo de multiplicação dos poxvírus

O ciclo de multiplicação dos poxvírus ocorre inteiramente no citoplasma da célula hospedeira, algo pouco comum entre os vírus animais com genoma de DNA. O tempo necessário para completar todo o ciclo de multiplicação varia conforme a amostra de vírus e a célula estudada, sendo que durante a infecção de células epiteliais de linhagem contínua (Vero), o ciclo de vida do VACV dura de 12 a 24

h (MOSS, 2001). A seguir, serão abordadas as diferentes etapas do ciclo de multiplicação do VACV, o poxvírus melhor estudado, sendo que estas informações certamente podem ser extrapoladas para os demais poxvírus, dada a pouca variabilidade dos genes relacionados às funções essenciais de replicação (MOSS, 2007) (Figura 3).

2.3.1. Adsorção e penetração

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

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

Apesar de ainda haver controvérsias acerca do mecanismo exato de penetração dos poxvírus na célula hospedeira, está estabelecido que ocorre a fusão entre a membrana externa do IMV e membranas celulares, com a liberação do cerne contendo o genoma viral no citoplasma da célula hospedeira (revisado por MOSS, 2006). A penetração pode ocorrer por diferentes vias, que incluem fusão direta da membrana externa do IMV com a membrana plasmática ou macropinocitose (CARTER *et al.*, 2005; HUANG *et al.*, 2008; MERCER; HELENIUS, 2008). Já durante a internalização do EEV, primeiro ocorreria a dissolução do envelope do EEV, através de um mecanismo não fusogênico, seguido de liberação do IMV que penetra na célula por fusão direta ou macropinocitose (LAW *et al.*, 2006; SCHMIDT *et al.*, 2011). Diante dessas

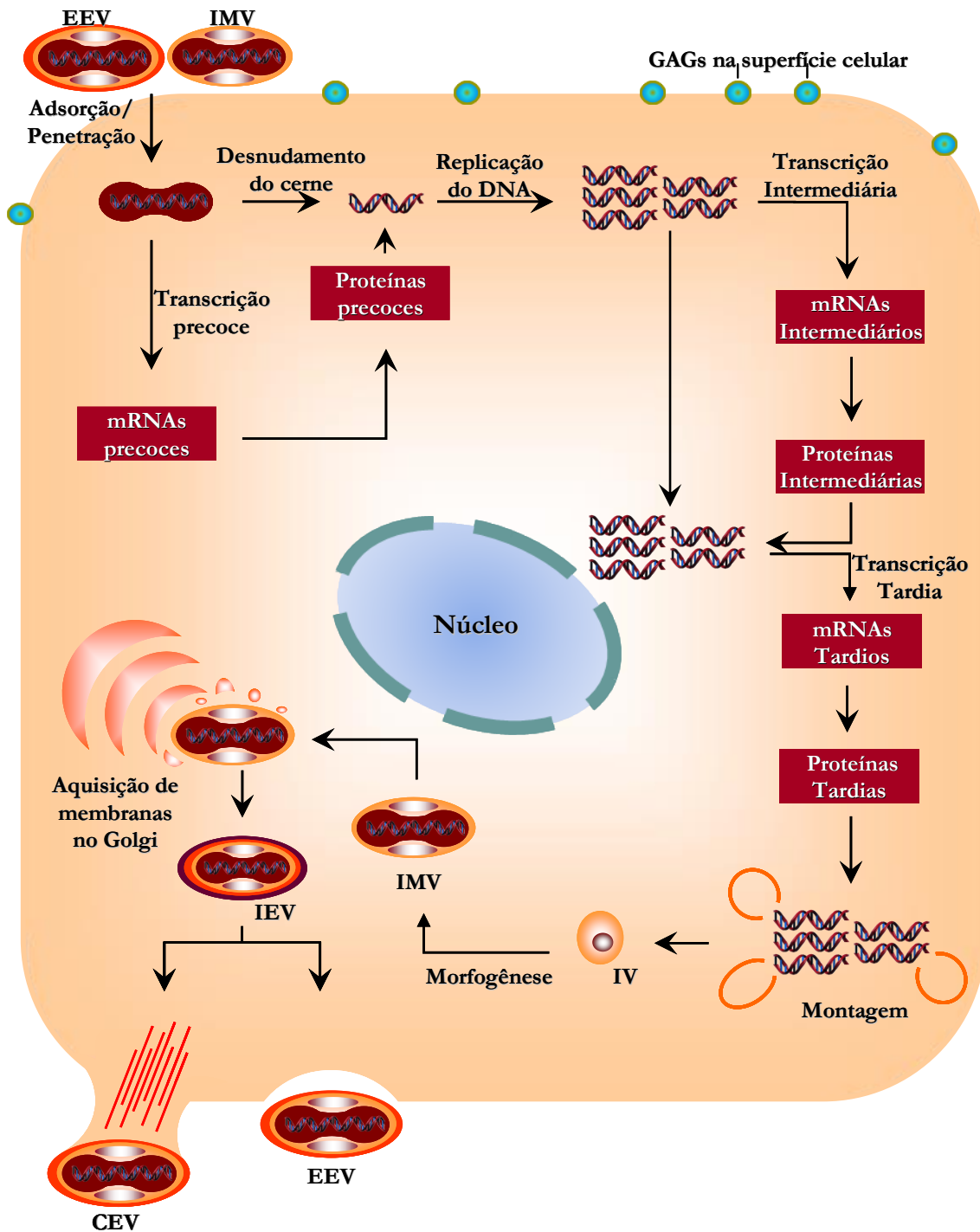


Figura 3. Representação esquemática do ciclo de multiplicação dos poxvírus (modificado de MCFADDEN, 2005).

As duas principais formas infecciosas dos poxvírus, os IMVs (vírions maduros intracelulares) e os EEVs/CEVs (vírions envelopados extracelulares/vírions envelopados associados à célula), após adsorção e penetração na célula hospedeira, liberam o cerne no citoplasma. No interior do cerne, ocorre a transcrição de genes precoces e após a síntese das proteínas precoces ocorre a liberação do genoma viral no citoplasma, processo denominado desnudamento do cerne. Após o início da replicação do DNA, ocorre a transcrição dos genes

intermediários e tardios. Finalmente, ocorre a montagem dos IMVs, que se acumulam no citoplasma e são liberados através da lise celular. Parte dos IMVs adquire duas camadas de membrana adicionais, derivadas das cisternas trans-Golgi e, posteriormente, é liberada através da indução das caudas de actina (CEV) ou não (EEV). Ver texto para mais detalhes.

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

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

2.3.2. Expressão gênica

As partículas infecciosas dos poxvírus albergam um sistema de transcrição completo, composto de RNA polimerase dependente de DNA, o fator de transcrição precoce viral (VETF), e outras enzimas e fatores envolvidos na síntese e na modificação dos mRNAs virais. Assim, a expressão gênica viral se inicia 20 min após a penetração, quando o cerne é liberado no citoplasma e transportado via microtúbulos até o sítio de transcrição (BROYLES, 2003; MOSS, 2007). Os mRNAs precoces recém-sintetizados são então liberados do cerne para o citoplasma e são traduzidos pela maquinaria de síntese proteica celular (SCHRAMM & LOCKER, 2005).

Os poxvírus coordenam sua transcrição gênica temporalmente ao longo do ciclo de multiplicação, sendo identificadas três classes de genes: genes precoces, genes intermediários e genes tardios (MOSS, 2007). Os genes precoces codificam proteínas envolvidas na replicação do DNA, biossíntese de nucleotídeos e transcrição de genes intermediários, além de proteínas envolvidas na evasão da resposta imune do hospedeiro. Sob condições normais, o desnudamento do cerne e a consequente liberação do genoma resultam no fim da transcrição dos genes precoces e no início da transcrição dos genes intermediários, que codificam principalmente fatores de transcrição para os genes tardios. A necessidade de replicação do DNA para o início da transcrição dos genes intermediários provavelmente se deve à inacessibilidade do genoma, enquanto no interior do cerne, aos fatores de transcrição recém-sintetizados. Os

genes tardios, por sua vez, codificam proteínas envolvidas na morfogênese, bem como as proteínas requeridas para a transcrição dos genes precoces e que são empacotadas nas novas partículas virais para serem utilizadas na próxima infecção (BROYLES, 2003; MOSS, 2007).

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

2.3.3. *Replicação do genoma*

A replicação do genoma dos poxvírus se inicia entre 1 e 2 h após a infecção e leva à geração de cerca de 10.000 cópias do genoma por célula, sendo que aproximadamente metade desse número será empacotada em vírions ao final do ciclo de multiplicação. Os poxvírus codificam todas as proteínas consideradas essenciais para replicação de DNA viral, como DNA polimerase, nucleosídeo trifosfatase e DNA glicosilase, sendo que muitos poxvírus também codificam proteínas envolvidas na biossíntese de nucleotídeos (MOSS, 2007).

A liberação do DNA viral no citoplasma ocorre apenas após a síntese das proteínas precoces, sem a qual não há o desnudamento do cerne e o sistema ubiquitina-proteassomo celular é co-optado para cooperar nesse processo (SCHRAMM; LOCKER, 2005; MERCER *et al.*, 2012). A ATPase viral D5, codificada por um gene precoce, desempenha um papel essencial na liberação do genoma viral no citoplasma durante o desnudamento do cerne (KILCHER *et al.*, 2014).

A replicação do DNA dos poxvírus ocorre inteiramente no citoplasma, em sítios específicos denominados “fábricas virais” (MOSS, 2007). Cisternas individuais do retículo endoplasmático são recrutadas para o sítio de replicação, onde se fundem entre si para formarem um envelope, composto de duas bicamadas lipídicas, dentro do qual se procede a replicação do DNA viral.

Morfologicamente, esse envelope lembra o envoltório nuclear sendo, por isso, denominado “mininúcleo” por alguns autores (TOLONEN *et al.*, 2001; SCHRAMM & LOCKER, 2005). Entretanto, essa denominação tem sido contestada, já que foi demonstrado recentemente que além de sítio de replicação, as fábricas virais também são sítios de transcrição e tradução de proteínas virais, o que deve aumentar significativamente a eficiência da multiplicação viral e contribuir para a usurpação da maquinaria celular pelo vírus (KATSAFANAS; MOSS, 2007).

Em nível molecular, a replicação parece começar com a introdução de pequenas quebras nas extremidades do genoma, sem a necessidade de origem de replicação, seguida por deslocamento de de umas das fitas de DNA e síntese de DNA por um mecanismo de autoiniciação (*self-priming*) (MOSS, 2013). Esse modelo de replicação do DNA viral tem sido questionado atualmente devido à identificação de uma proteína viral (D5, a mesma envolvida no desnudamento) com atividade de DNA primase (DE SILVA *et al.*, 2007; DE SILVA *et al.*, 2009). Dessa maneira, o modelo atual envolveria a síntese de iniciadores de RNA pela proteína D5 para a síntese da fita líder de DNA ao invés da clivagem da extremidade do DNA viral (MOSS, 2013). A replicação do DNA dos poxvírus leva à formação de concatâmeros, que são posteriormente resolvidos com a participação da proteína viral A22, que atua como uma resolvase do tipo HJ (junção de Holliday) (GARCIA; MOSS, 2001; MOSS, 2007).

2.3.4. Morfogênese e liberação

A montagem das partículas dos poxvírus se inicia nas fábricas virais. As primeiras estruturas identificadas são as crescentes, que consistem de uma membrana, com a superfície convexa com aspecto de favos de uma colmeia e a concavidade preenchida por material granular. A proteína viral D13 forma o arcabouço que sustenta, dá a forma convexa às crescentes e serve como sítio de ancoragem para os componentes do vírion durante a morfogênese (HEUSER, 2005; MOSS, 2007). Contudo, a natureza da membrana das crescentes ainda é controversa, havendo dúvida se é sintetizada *de novo* ou derivada do retículo endoplasmático, e também se as crescentes são constituídas por apenas uma ou múltiplas membranas (SMITH; LAW, 2004; SCHRAMM; LOCKER, 2005;

CONDIT *et al.*, 2006). Estudos genéticos recentes identificaram proteínas virais envolvidas nas etapas iniciais da morfogênese dos poxvírus, tais como A11, A17, A30.5, e L2. Porções de membrana derivadas do retículo endoplasmático seriam estabilizadas pelas proteínas A11, A30.5 e L2 e recrutadas até as fábricas virais para assistir à formação das crescentes (MARURI-AVIDAL *et al.*, 2011; 2013a; 2013b; 2013c). A proteína A17, por sua vez, localiza-se nessas porções de membrana e medeia a interação da membrana da crescente com o arcabouço de D13 (UNGER *et al.*, 2013; MARURI-AVIDAL *et al.*, 2013c).

Posteriormente, surgem os vírions imaturos (IV), quando a membrana das crescentes se fecha dando origem a estruturas circulares preenchidas por uma massa nucleoproteica densa. O empacotamento do genoma no interior dos IV ocorre após a resolução dos concatâmeros em um processo envolvendo uma ATPase e proteínas teloméricas virais (GARCIA; MOSS, 2001; CONDIT *et al.*, 2006; MOSS, 2007). Também ocorre o empacotamento da maquinaria de transcrição viral, incluindo VETF (HU *et al.*, 1998).

Com a progressão da morfogênese, verifica-se a transição de IV para IMV, com uma marcante mudança na forma da partícula, de esférica para o formato de tijolo característico dos poxvírus. Durante o processo de transição, os IV perdem o arcabouço formado pela proteína viral D13, que lhes confere o formato esférico, e diversas proteínas da membrana externa e do cerne sofrem processamento proteolítico, aparentemente mediado pelas proteases codificadas pelos genes virais G1L e I7L (HEUSER, 2005; CONDIT *et al.*, 2006; MOSS, 2007). Após a morfogênese, os IMVs são transportados das fábricas virais até o centro organizador de microtúbulos (MTOC) (SMITH *et al.*, 2002).

Os IMVs de alguns poxvírus, a saber, CPXV, *Ectromelia virus*, *Raccoonpox virus* e *Fowlpox virus*, são oclusos em uma matriz proteica densa no citoplasma, denominadas de inclusões do tipo acidófilo (ATI). Possivelmente, as ATIs são liberadas no ambiente após a degeneração das células infectadas. A principal proteína das ATI de CPXV apresenta cerca de 160kDa, sendo que algumas amostras de VACV também codificam uma proteína homóloga truncada, mas a mesma não forma ATIs em células infectadas (SMITH; LAW, 2004; MOSS, 2007).

Parte dos IMVs gerados é transportada via microtúbulos a partir do MTOC e adquire mais duas membranas derivadas de vesículas da rede *trans*-Golgi ou endossomos, dando origem às formas IEVs (TOOZE *et al.*, 1993; SCHMELZ *et al.*, 1994; SMITH *et al.*, 2002). Algumas proteínas virais exclusivas das formas IEV e EEV são incorporadas nas membranas desses compartimentos, tais como F12, F13, A33, A34, A36, A56 e B5, sendo que as proteínas F12 e A36 estão ausentes nos EEVs. Os IEVs são transportados via microtúbulos até a superfície da célula, onde o envelope externo dos IEVs se funde à membrana plasmática, liberando uma parte dos vírions no meio extracelular como EEVs, enquanto a outra parte permanece associada à célula hospedeira como CEVs (SMITH *et al.*, 2002; SMITH; LAW, 2004).

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

2.4. Patogênese

As infecções pelos *Orthopoxvirus* podem ser classificadas como sistêmicas ou localizadas (restritas ao sítio de entrada do vírus). A entrada do vírus no organismo do hospedeiro ocorre através da pele ou através do trato respiratório. Inicialmente, o vírus se multiplica no sítio primário de infecção podendo ou não atingir os linfonodos da região acometida, o que determinará se a infecção será sistêmica ou localizada, respectivamente. Após atingir os linfonodos regionais, o vírus chega à corrente sanguínea causando a viremia primária. Em seguida, o vírus se espalha e multiplica no baço, fígado, medula óssea e outros órgãos reticuloendoteliais, ocasionando uma segunda onda de viremia. A viremia secundária é responsável pela disseminação do vírus para sítios distantes, especialmente a pele, causando as lesões cutâneas

generalizadas características das infecções pelos *Orthopoxvirus* (DAMON, 2007).

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

3. Interação poxvírus-hospedeiro: balanço entre fatores celulares e produtos gênicos virais

Os vírus dependem da maquinaria de síntese celular para completarem seu ciclo de vida e gerarem novos vírions para a propagação da infecção. Dessa forma, ao longo da coevolução com seus hospedeiros, os vírus desenvolveram estratégias altamente eficientes para co-optar fatores celulares, modificar o ambiente intracelular e escapar das respostas antivirais do hospedeiro, a fim de garantir o sucesso da sua replicação (GREBER, 2002; LUDWIG *et al.*, 2003; BONJARDIM, 2005; MÜNTER *et al.*, 2006).

Os poxvírus, dado o seu grande genoma, codificam muitas proteínas envolvidas na interação vírus-hospedeiro, principalmente no que tange à evasão da resposta imune (Figura 4). Mesmo assim, os poxvírus requerem muitos fatores celulares, que são co-optados pelo vírus durante a infecção, a fim de garantir a geração da progênie viral (MCFADDEN, 2005). Dentre as proteínas codificadas pelos poxvírus com papel de modular as funções celulares e evadir às respostas do hospedeiro pode se citar homólogos de fatores de crescimento, proteínas regulatórias do sistema complemento, homólogos de receptores de citocinas, homólogos de citocinas e quimiocinas, serpinas (inibidores de serina proteases), proteínas antiapoptóticas, entre outras (JOHNSTON; MCFADDEN, 2003).

As vias de transdução do sinal desempenham um papel central na regulação das mais diversas funções celulares, como sobrevivência, crescimento, apoptose, migração, tráfego intracelular e resposta imune. Dessa

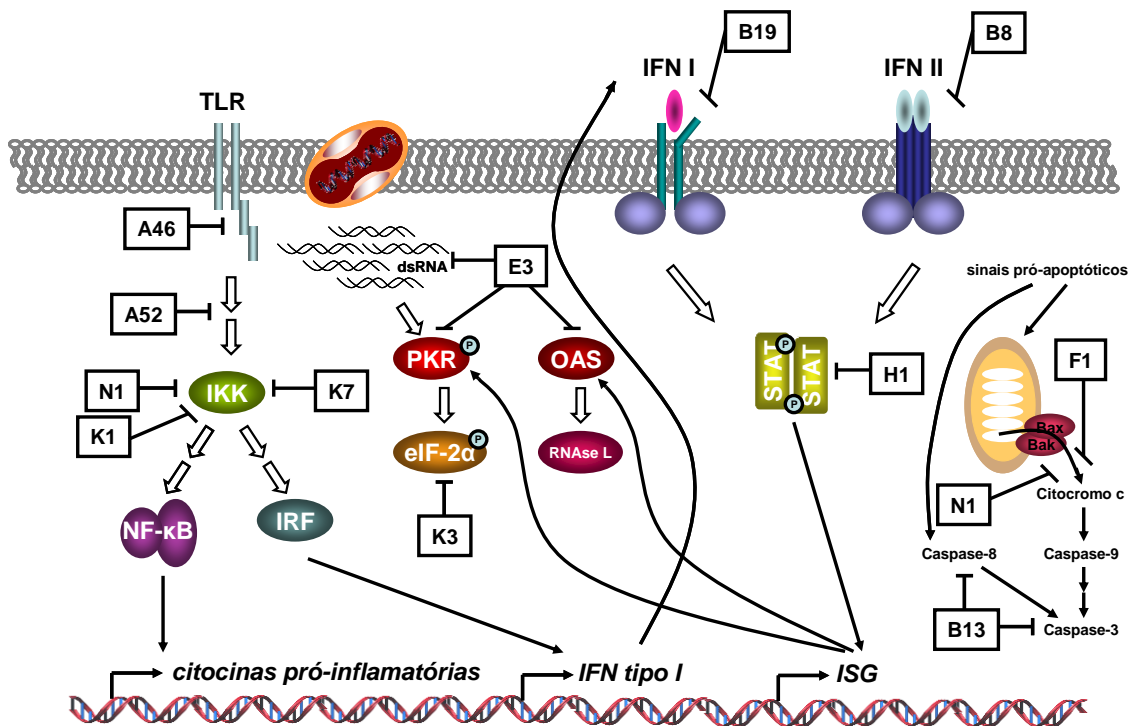


Figura 4. Algumas estratégias codificadas pelo *Vaccinia virus* para escapar da resposta imune do hospedeiro (modificado de PERDIGUERO; ESTEBAN, 2009).

A célula dispõe de receptores de padrão molecular (e.g. TLRs), capazes de detectar componentes estruturais de agentes patogênicos, dentre eles os vírus. Uma vez ativados, os TLRs transmitem o sinal através de uma cascata de proteínas sinalizadoras, culminando com a ativação de fatores de transcrição como NFκB e IRF, que induzem a expressão de citocinas pró-inflamatórias e interferon (IFN) do tipo I, importantes para conter a disseminação da infecção. Cinco proteínas codificadas por VACV (A46, A52, K1, K7 e N1) interceptam essa cascata sinalizadora e são importantes fatores de virulência. A ligação dos IFNs dos tipos I e II aos seus receptores cognatos também é bloqueada por proteínas codificadas por VACV. B19 é uma proteína que se liga a IFN-α/β ao passo que B8 é homólogo do receptor de IFNγ. A fosfatase viral H1 desfosforila os fatores de transcrição STAT, importantes na ativação da expressão dos ISG (genes estimulados por interferon). PKR e OAS são dois ISGs essenciais para a resposta antiviral, cuja ativação depende de dsRNA. Quando ativados, PKR inativa a tradução através da fosforilação do eIF (fator eucariótico de iniciação da tradução) 2α enquanto OAS leva à ativação da RNase L. As proteínas virais E3 e K3 inibem esse sistema de defesa do hospedeiro através da ligação a dsRNA e da similaridade a eIF2α, respectivamente. A apoptose consiste numa importante estratégia antiviral e pode ocorrer pela via extrínseca através da ativação de “receptores de morte” (TNFR, Fas), dependente de caspase-8, ou pela via intrínseca dependente de caspase-9. Membros pró-apoptóticos da família Bcl2 associados à apoptose pela via intrínseca (Bax, Bak, Bim, Bid, Bad) são inibidos pelas proteínas F1 e N1 de VACV. Já a proteína B13 é capaz de inibir a atividade de caspases.

forma, não é surpresa que os vírus interfiram com a ativação de vias de sinalização de modo a alterar o ambiente intracelular e o tornar mais propício à geração e disseminação virais (GREBER, 2002; LUDWIG *et al.*, 2003; MÜNTER *et al.*, 2006).

Durante anos, estudos realizados pelo Grupo de Transdução do Sinal da UFMG vêm demonstrando o envolvimento de vias sinalizadoras celulares durante a infecção pelos *Orthopoxvirus* VACV e CPXV (Figura 5). Esses estudos mostraram que a ativação sustentada da via MEK-ERK durante a infecção pelo VACV e pelo CPXV leva à expressão do fator de transcrição EGR1, que se mostrou essencial para a multiplicação do VACV, mas não para o CPXV. Por outro lado, a via MEK-ERK-EGR1 regula a liberação das formas envelopadas de ambos os vírus (DE MAGALHÃES *et al.*, 2001; ANDRADE *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2006; BRASIL, 2010). Duas proteínas virais, C11/VGF e O1, cooperam para a ativação e sustentação do sinal da via MEK-ERK, respectivamente (ANDRADE *et al.*, 2004; SCHWENEKER *et al.*, 2012).

Contrariamente ao efeito promotor da multiplicação do VACV, durante a infecção pelo *Myxoma virus* (MYXV), a ativação de MEK-ERK leva à fosforilação do fator de transcrição IRF3 (fator regulatório de IFN 3), que induz a expressão de IFN β , responsável pela restrição da replicação viral em fibroblastos embrionários murinos, tornando-os não permissivos ao MYXV (WANG *et al.*, 2004a).

A via MKK/JNK também é ativada durante a infecção por VACV e CPXV, segundo estudos realizados pelo Grupo de Transdução do Sinal. Apesar da inibição de JNK não provocar redução da multiplicação, essa via regula a liberação das partículas envelopadas de VACV, através da modulação da dinâmica do citoesqueleto de actina e de microtúbulos durante a infecção (SOARES, 2007; PEREIRA *et al.*, 2012a). A interação da cinase viral B1 com a proteína adaptadora JIP1 aumenta a estabilidade da ligação de MKK7, TAK1 e JNK fosforilada a JIP1, contribuindo para a fosforilação de c-Jun por JNK (SANTOS *et al.*, 2006). Entretanto, a relevância dessa interação no contexto da infecção viral carece de verificação experimental. Durante a infecção pelo VACV, a fosforilação do fator de transcrição c-Jun é temporalmente regulada por ERK e JNK e exerce importante papel na geração e disseminação da progênie viral

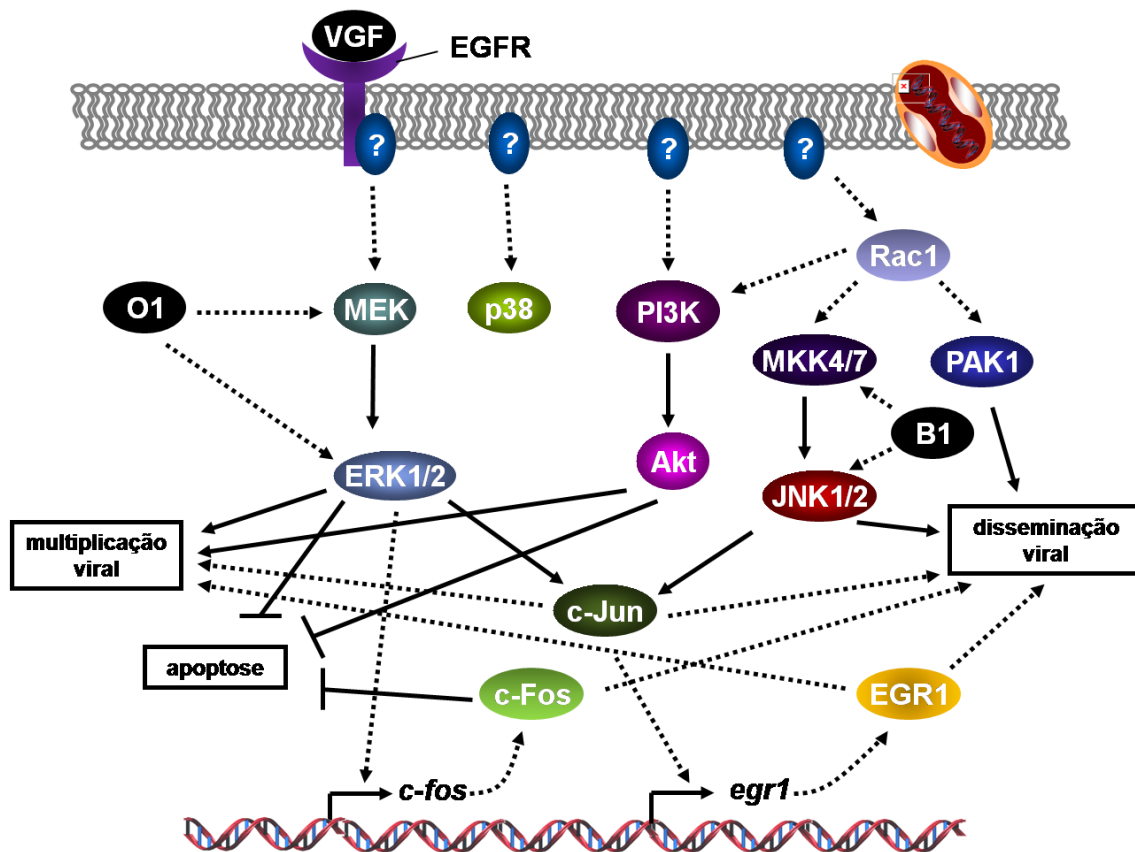


Figura 5. Vias sinalizadoras celulares são requeridas durante a infecção pelo *Vaccinia virus*.

As vias sinalizadoras MEK-ERK, MKK-JNK, PI3K-Akt e PAK1 são ativadas durante a infecção pelo VACV-WR. MEK-ERK e PI3K-Akt são requeridas tanto para a replicação viral como para a inibição da apoptose durante a infecção. Dois fatores de transcrição ativados via MEK-ERK (EGR1 e c-Fos), assim como MKK-JNK e PAK1 são importantes para a regulação da liberação das formas envelopadas. Por sua vez, a ativação do fator de transcrição c-Jun é regulada por ERK e JNK durante a infecção, sendo requerido para a multiplicação viral. A interação de algumas proteínas virais com essas vias sinalizadoras também é indicada (KING *et al.*, 1986; DE MAGALHÃES *et al.*, 2001; ANDRADE *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2006; MERCER & HELENIUS *et al.*, 2008; SOARES *et al.*, 2009; POSTIGO *et al.*, 2009; BRASIL, 2010; LEITE, 2010; PEREIRA *et al.*, 2012a; SCHWENEKER *et al.*, 2012; SALGADO *et al.*, 2013; OLIVEIRA, 2013; ANDRADE; ALBARNAZ *et al.*, em preparação).

(PEREIRA, 2007; LEITE, 2010). A ativação de JNK durante a infecção pelo VACV, mas não pelo CPXV, é dependente da GTPase celular Rac1 (CARNEIRO *et al.*, 2013).

O VACV e o CPXV também modulam a ativação da via PI3K/Akt durante a infecção, para a transmissão de sinais antiapoptóticos e para regular a tradução de proteínas virais e a morfogênese viral (SOARES *et al.*, 2009; ZABOROWSKA; WALSH, 2009). De modo semelhante a JNK, a ativação de Akt foi dependente da GTPase Rac1 apenas durante a infecção pelo VACV, mas não pelo CPXV (CARNEIRO *et al.*, 2013). A ativação de Akt também ocorre durante a infecção pelo MYXV, desempenhando um papel central na determinação da permissividade celular à infecção viral. A proteína viral M-T5 associa-se a Akt aumentando sua atividade de cinase para regular importantes funções celulares, tais como sobrevivência, apoptose, proliferação e crescimento (WANG *et al.*, 2006; WERDEN; MCFADDEN, 2008). M-T5 também interage com a E3 ubiquitina ligase celular Cullin-1, formando um complexo responsável pela ubiquitinação de p27-Kip1 e sua subsequente degradação proteossômica, o que promove a progressão do ciclo celular e a eficiente multiplicação viral (JOHNSTON *et al.*, 2005; WERDEN; MCFADDEN, 2008).

Algumas das vias sinalizadoras ativadas pela infecção pelos poxvírus estão envolvidas com as profundas alterações no citoesqueleto observadas durante a infecção, tais como reorganização dos microtúbulos, perda da integridade e da função do centrosomo, perda das fibras de estresse de actina, estímulo da migração celular, perda da adesão e formação das caudas de actina (MÜNTER *et al.*, 2006). A estimulação da migração celular durante a infecção pelo VACV é mediada pela inibição da via da GTPase RhoA/mDia, importante na regulação da dinâmica do citoesqueleto de actina e de microtúbulos, que são necessários durante a liberação das formas envelopadas de VACV (VALDERRAMA *et al.*, 2006; ARAKAWA *et al.*, 2007).

Durante a formação das caudas de actina, tirosina cinases celulares das famílias Src e Abl são ativadas pela proteína viral B5 e fosforilam a proteína A36 do envelope externo do IEV, promovendo o desligamento de A36 de cinesina-1, interação responsável pelo movimento intracelular do IEV via microtúbulos até a superfície da célula (NEWSOME *et al.*, 2004; NEWSOME *et al.*, 2006). A36

fosforilada induz o recrutamento de diversas proteínas celulares, tais como NCK, N-WASP, WIP, ARP2/3 e GRB2, que formam um complexo que desencadeia o processo de polimerização de actina sob a partícula viral, responsável pela propulsão do CEV da célula infectada (MOREAU *et al.*, 2000; SCAPLEHORN *et al.*, 2002; MÜNTER *et al.*, 2006). A liberação do CEV da ponta da cauda de actina, por sua vez, é dependente apenas das proteínas tirosina cinases da família Abl (REEVES *et al.*, 2005). Estudos do Grupo de Transdução do Sinal demonstraram que a fosforilação do componente regulatório ARPC1/p41-Arc do complexo ARP2/3 pela serina-treonina cinase celular PAK1 (cinase ativada por p21) desempenha um papel importante durante a formação das caudas de actina induzidas pelo VACV (ANDRADE; ALBARNAZ *et al.*, em preparação). A formina FHOD1, outra proteína celular nucleadora de actina, coopera com o complexo ARP2/3 durante a formação das caudas de actina do VACV. Após ativação pela GTPase Rac1, FHOD1 promove a polimerização de filamentos de actina que servem de base para a polimerização de filamentos de actina ramificados por ARP2/3 (ALVAREZ; AGAISSE, 2013).

Apenas a capacidade dos vírus de orquestrar a maquinaria biossintética celular em benefício próprio não garante um ciclo de vida bem sucedido no interior da célula hospedeira. Os vírus também precisam dispor de estratégias para inibir e evadir às respostas antivirais do hospedeiro contra a infecção. Os TLR (receptores do tipo Toll) compõem uma família de receptores encarregados de detectar biomoléculas derivadas de patógenos virais, bacterianos e fúngicos, e desencadear uma cascata de sinalização que culmina com a ativação das MAPKs e dos fatores de transcrição NFκB e IRF3, levando à expressão dos IFNs (interferons) e de citocinas inflamatórias (TNFα, IL6), além de outros mediadores da resposta do hospedeiro à infecção (BONJARDIM *et al.*, 2009). Os poxvírus codificam diversas proteínas que interceptam a transmissão do sinal dos TLR impedindo assim a ativação de NFκB e IRF3 e a consequente indução da expressão de citocinas pró-inflamatórias e IFNs. Exemplos incluem as proteínas de VACV A46, A52, B14, K7, M2 e N1 (HARTE *et al.*, 2003; DIPERNA *et al.*, 2004; STACK *et al.*, 2005; GEDEY *et al.*, 2006).

Os IFNs constituem uma das mais poderosas armas do hospedeiro contra as infecções virais e os poxvírus contrapõem a ação dos IFNs através da

expressão de proteínas que ligam IFN α/β (IFN α/β -BP) e de homólogos dos receptores de IFN γ (IFN γ R), que atuam sequestrando essas citocinas e as impedindo de regular a resposta imune contra a infecção viral. Proteínas com essas propriedades são codificadas por VACV, MYXV, CPXV, *Ectromelia virus*, *Fowlpox virus* e *Camelpox virus* (JOHNSTON; MCFADDEN, 2003; MOSS, 2007). Os poxvírus também interferem com as cascatas de sinalização desencadeadas em resposta aos IFNs, via JAK (cinase Janus)/STAT (transdutor do sinal e ativador da transcrição). O gene H1L de VACV codifica uma fosfatase capaz de desfosforilar de STAT (NAJARRO *et al.*, 2001). A fosfatase H1 é empacotada nos corpúsculos laterais do vírion e é liberada imediatamente após a fusão entre as membranas virais e celulares (SCHMIDT *et al.*, 2013).

Além da proteína B8, homólogo de IFN γ R, e B19, homólogo de IFN α/β -BP, VACV codifica outras duas proteínas, E3 e K3, que inibem a ação de PKR (proteína cinase dependente de RNA), um dos principais efetores da resposta celular a IFNs. PKR é ativada por intermediários de dsRNA que se formam durante a infecção viral, sendo um de seus substratos o fator de iniciação da tradução eIF2 α , cuja fosforilação inibe drasticamente a síntese protéica. Como E3 liga-se a dsRNA e K3 é um homólogo não funcional de eIF2 α , essas proteínas inibem a atividade de PKR por competir por ativadores e substratos, respectivamente (JOHNSTON; MCFADDEN, 2003; MOSS, 2007).

A apoptose consiste noutro importante mecanismo disposto pelo sistema imune do hospedeiro para a eliminação de células infectadas por vírus que é extensivamente regulado por uma complexa rede de vias sinalizadoras. Portanto, não é surpresa que os poxvírus também disponham de estratégias para interferir com essas vias sinalizadoras (TAYLOR; BARRY, 2006). O receptor de TNF (fator de necrose tumoral) (TNFR) e Fas, quando estimulados, são importantes indutores de apoptose pela via extrínseca, que depende da ativação de caspase-8. Proteínas homólogas ao TNFR são codificadas por diversos poxvírus, tais como MYXV, VACV, CPXV, *Ectromelia virus* e *Variola virus*. Os homólogos virais de TNFR são secretados durante a infecção e sequestram TNF, inibindo assim a apoptose induzida por essa citocina (TAYLOR; BARRY, 2006). Dentre as diversas proteínas com efeito antiapoptótico codificadas pelos poxvírus também encontram-se cinco serpinas:

SPI1, SPI2 (B13 ou CrmA) e SPI3, codificadas pelos *Orthopoxvirus*, e Serp1 e Serp2, codificadas pelo MYXV. A proteína CrmA de CPXV, por exemplo, possui efeito inibitório sobre caspase-1, caspase-8, caspase-3 e granzima B, participando tanto da inibição da apoptose quanto do processamento de citocinas pró-inflamatórias (TAYLOR; BARRY, 2006).

A família de proteínas Bcl2 desempenha um papel central na regulação da via mitocondrial ou intrínseca de apoptose, reunindo tanto proteínas antiapoptóticas (Bcl2, BclXL, Mcl1) como pró-apoptóticas (Bak, Bax, Bid, Bad, Bim, Puma, Noxa). A apoptose por sinais intrínsecos induz disfunção mitocondrial, levando à liberação de proteínas pró-apoptóticas no citoplasma, como o citocromo c, que disparam a ativação da cascata de caspases, iniciando pela caspase-9 (TAYLOR; BARRY, 2006). As proteínas F1 do VACV, M11 de MYXV e FPV039 de *Fowlpox virus* são homólogas de Bcl2 capazes de inibir a apoptose pela via mitocondrial, através da interação com Bak, sendo que F1 e M11 também são capazes de interagir de maneira independente com Bax (WANG *et al.*, 2004b; WASILENKO *et al.*, 2005; SU *et al.*, 2006; TAYLOR *et al.*, 2006; BANADYGA *et al.*, 2007). Essas diferentes estratégias de interação com o hospedeiro não atuam separadamente, mas de modo cooperativo e finamente regulado ao longo da infecção. Por exemplo, a ativação da via VGF/MEK/ERK coopera com a proteína F1 na inibição da apoptose induzida durante a infecção pelo VACV (POSTIGO *et al.*, 2009).

4. MAPKs (proteínas cinases ativadas por mitógenos)

A família das MAPKs (proteínas cinases ativadas por mitógenos) está envolvida nos mais diversos mecanismos de regulação celular e reúne seis grupos distintos de proteínas: (i) ERK1/2 (cinases reguladas por sinal extracelular), (ii) JNK1/2/3 (cinase do NH₂-terminal de Jun), (iii) p38 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$, (iv) ERK7/8, (v) ERK3/4 e (vi) ERK5. As MAPKs são ativadas por diversos estímulos, tais como fatores de crescimento, hormônios, citocinas e estresse ambiental. Esses sinais são transmitidos através de receptores tirosina cinases, receptores acoplados à proteína G (GPCRs), receptores de citocinas e receptores serina-treonina cinases, e coordenam diversas atividades celulares como expressão

gênica, ciclo celular, metabolismo, motilidade, sobrevivência, apoptose e diferenciação (KRISHNA; NARANG, 2008).

Um aspecto característico das vias sinalizadoras das MAPK é que são organizadas em módulos compostos por três cinases evolucionariamente conservadas e que atuam em sequência: (i) uma MAPK, (ii) uma MAP2K (MAPK cinase) e (iii) uma MAP3K (MAPK cinase cinase) (Figura 6) As MAP3Ks são serina-treonina cinases ativadas através de fosforilação e (ou) interação com GTPases monoméricas em resposta a estímulos extracelulares. Uma vez ativada, a MAP3K fosforila e ativa uma MAP2K. As MAP2Ks são cinases de dupla especificidade, isto é, são capazes de fosforilar as MAPKs tanto nos resíduos de treonina quanto de tirosina na região conservada Thr-Xaa-Tyr, levando à ativação das MAPKs. Após a ativação, as MAPKs fosforilam seus substratos em resíduos de serina ou treonina apenas quando esses são seguidos por resíduos de prolina. Os substratos das MAPKs incluem fatores de transcrição, MKs ou MAPKAPKs (proteínas cinases ativadas por MAPK) ou outras proteínas, como proteínas do citoesqueleto (KRISHNA; NARANG, 2008).

4.1. p38 MAPK

A p38 MAPK, juntamente com JNK, são também denominadas SAPK (proteínas cinases ativadas por estresse). São ativadas principalmente por estresse ambiental (estresse osmótico, estresse oxidativo, radiação), citocinas (TNF α , IL1, TGF β) e em resposta à ativação dos TLRs. Proliferação, diferenciação, apoptose, metabolismo, migração e inflamação estão entre as principais funções celulares reguladas por p38 MAPK (Figura 6) (CUENDA; ROSSEAU, 2007; KRISHNA; NARANG, 2008; WAGNER; NEBRED, 2009; CUADRADO; NEBRED, 2010).

A p38 MAPK também compartilha com JNK muitas MAP3Ks envolvidas na sua ativação, que incluem MLK2/3, ASK1, TAK1, DLK, MEKK, dentre outras. Já MKK3 e MKK6 são as duas MAP2Ks altamente específicas responsáveis pela ativação de p38 MAPK. Porém, em resposta a alguns estímulos, MKK4 também pode contribuir para a sua ativação. GTPases da subfamília Rho, tais como Rac1, Rho, Cdc42 e Rit, e GPCR estão entre as proteínas responsáveis pela ativação das MAP3Ks da via de p38 MAPK em resposta a sinais extracelulares.

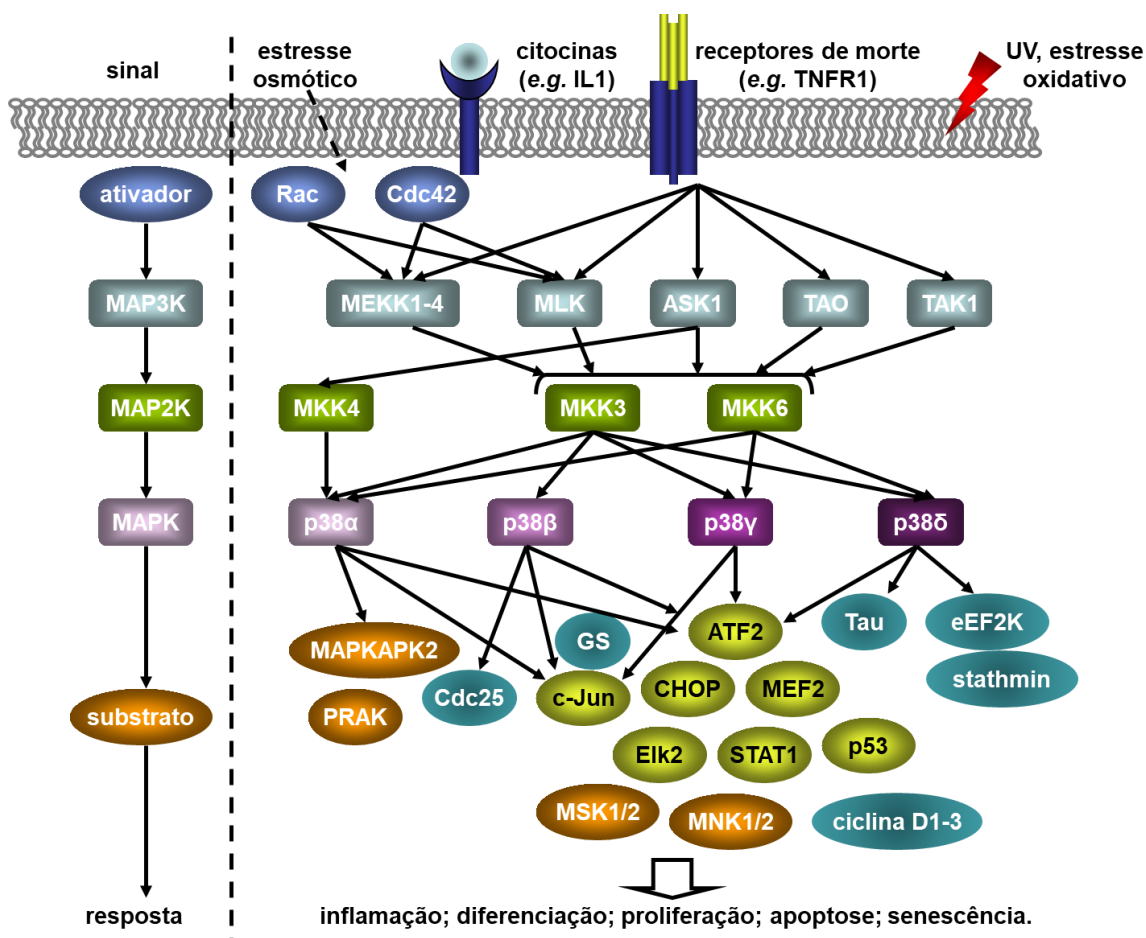


Figura 6. Representação esquemática da via sinalizadora de p38 MAPK (modificado de CHOULTHARD *et al.*, 2009).

Quando estimulados por sinais extracelulares, tais como estresse (osmótico, oxidativo, UV) e citocinas (TNF, IL1), tem-se início uma cascata sinalizadora na qual MAP3Ks fosforilam as MAP2Ks específicas de p38 MAPK (MKK3 e MKK6 e, sob certas circunstâncias, MKK4). Uma vez ativadas, as quatro isoformas de p38 (α , β , γ e δ) fosforilam uma série de substratos, a saber, fatores de transcrição (em amarelo), proteínas cinases (em laranja), e outras proteínas citoplasmáticas e nucleares (em azul). Os substratos fosforilados por p38 desencadeiam e (ou) modulam variadas respostas biológicas, que incluem inflamação, diferenciação, proliferação, apoptose e senescência.

Já a regulação negativa de p38 MAPK fica a cargo de proteínas tirosinas fosfatases (PTPs), serina-treonina fosfatases (PP2C) e fosfatases de especificidade dupla (DUSPs) ou MAPK fosfatases (MKPs), que desfosforilam os resíduos de tirosina e (ou) treonina essenciais à atividade de p38 MAPK (KRISHNA; NARANG, 2008; CUENDA; ROSSEAU, 2007; CUADRADO; NEBREDA, 2010).

Os substratos de p38 podem ser agrupados em dois grandes grupos: os fatores de transcrição e as proteínas cinases. Os fatores de transcrição incluem p53, ATF2, Elk1, MEF2, NFAT, GADD e C/EBP β . Já entre as proteínas cinases encontram-se MAPKAPK2/3 (MK2/3), MSK1 (cinases ativadas por mitógenos e estresse) e MNK1/2 (cinases que interagem com MAPK) (KRISHNA; NARANG, 2008; WAGNER; NEBREDA, 2009). Muitos substratos de MK2/3 também são fatores de transcrição, tais como ATF1, CREB e SRF, dentre outras proteínas (CUENDA; ROSSEAU, 2007; KRISHNA; NARANG, 2008).

Diferente de ERK e JNK, que normalmente ativam a proliferação celular, p38 MAPK comumente exerce regulação negativa sobre a progressão do ciclo celular nas etapas de transição G1/S e G2/M, principalmente através da repressão de ciclinas, indução de inibidores de CDK (cinases dependentes de ciclinas) e modulação da atividade de p53. A regulação negativa sobre a via JNK/c-Jun também contribui para o papel antiproliferativo de p38 MAPK. Entretanto, p38 MAPK também pode regular positivamente a proliferação celular, função que está relacionada ao nível de ativação e à interação com outras vias sinalizadoras (THORNTON; RINCON, 2009; WAGNER; NEBREDA, 2009).

A indução de apoptose é um evento classicamente associado à ativação de p38 em resposta ao estresse. Esse papel pode ser mediado tanto no nível de transcrição como pós-tradução, envolvendo geralmente membros pró- e antiapoptóticos da família Bcl2, e p53. A apoptose também pode ser um evento secundário à ativação de p38 MAPK, tal como a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pela via TLR-ASK1-p38 MAPK. A ativação de p38 MAPK juntamente com JNK, via ASK1, pode levar à apoptose de modo dependente de p53 e do complexo AP1 (proteína ativadora) (SUMBAYEV; YASINSKA, 2006; WAGNER; NEBREDA, 2009). Entretanto, p38 MAPK também pode transmitir sinais antiapoptóticos, por exemplo, através do controle da autofagia ou da

inativação de GSK3 β (glicogênio sintase cinase), que leva ao acúmulo do fator de transcrição de β -catenina, que exerce papel pró-sobrevivência celular (THORNTON; RINCON, 2009; WAGNER; NEBREDA, 2009; CUADRADO; NEBREDA, 2010).

O controle da inflamação é outro papel classicamente atribuído à p38 MAPK. Essa função é desempenhada principalmente através da regulação da expressão de mediadores e citocinas pró-inflamatórias, tais como COX2 (ciclo-oxigenase 2), IL1, IL6 e TNF α , tanto no nível de transcrição (via NF κ B, por exemplo) como pós-tradução, por regular a estabilidade do mRNA (via MK2) e a tradução de proteínas (via MNK1) (CUENDA; ROSSEAU, 2007; WAGNER; NEBREDA, 2009).

Em relação à regulação da migração celular, p38 MAPK possui a capacidade de fosforilar Paxillin, proteína que compõe as adesões focais, cuja montagem e desmontagem são cruciais para a migração celular e reguladas por fosforilação. A cinase MK2, um substrato de p38 MAPK, também é capaz de fosforilar ARPC5/p16-Arc, um componente regulatório do complexo nucleador de actina ARP2/3, e HSP27. HSP27, quando fosforilada, perde a habilidade de inibir a polimerização de actina e a formação de fibras de estresse, eventos associados à migração (HUANG *et al.*, 2004)

4.2.1. MAPK p38 e os vírus

Diante do papel central de p38 MAPK na regulação de processos celulares como proliferação, sobrevivência, apoptose, metabolismo, migração e inflamação, não é surpresa que os vírus interfiram com a atividade dessa proteína sinalizadora durante a sua manipulação do ambiente intracelular. A ativação de p38 MAPK durante a infecção já foi relatada para muitos vírus, a saber, VACV (DE MAGALHÃES *et al.*, 2001), *Influenza virus* (MARUOKA *et al.*, 2003), *Coronavirus* da Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS) (MIZUTANI *et al.*, 2004), *Human herpesvirus 1* (HHV1) (KARACA *et al.*, 2004), vírus da varicela-zóster (VZV) (RAHAUS *et al.*, 2004), *Human immunodeficiency virus 1* (HIV1) (PERFETTINI *et al.*, 2005), HHV8 (PAN *et al.*, 2006), *Rhinovirus* (DMITRU *et al.*, 2006), *Hepatitis B virus* (HBV) (CHANG *et al.*, 2008), *Enterovirus 71* (TUNG *et al.*, 2010), vírus coxsackie B3 (CVB3) (SI *et al.*, 2005; JENSEN *et al.*, 2013),

Dengue virus (NAGILA *et al.*, 2013), *Sendai virus* (JOHNSEN *et al.*, 2013), dentre outros.

Em suma, p38 MAPK pode atuar em três grandes processos durante uma infecção viral: (i) a replicação viral; (ii) a morte celular; e (iii) a resposta inflamatória.

Durante a infecção por HHV1 (KARACA *et al.*, 2004), HHV8 (PAN *et al.*, 2006), *Rotavirus* (HOLLOWAY; COULSON, 2006), CVB3 (SI *et al.*, 2005), HBV (CHANG *et al.*, 2008), VZV (RAHAUS *et al.*, 2004) e *Porcine circovirus* (WEI *et al.*, 2009), a ativação de p38 MAPK desempenha função determinante para a eficiente geração e liberação da progênie infecciosa. Em muitos desses casos, a habilidade de p38 MAPK de modular a atividade de componentes do complexo AP1 está associada ao desempenho de tal função (HOLLOWAY; COULSON, 2006; PAN *et al.*, 2006; WEI *et al.*, 2009). Durante a infecção pelo HHV-8, por exemplo, AP1 é regulado por p38 MAPK, em conjunto com ERK e JNK, para promover a atividade do promotor viral RTA, importante durante a infecção lítica, tanto primária quanto após reativação de infecção latente (PAN *et al.*, 2006; XIE *et al.*, 2008).

A p38 MAPK medeia a apoptose em resposta à infecção por muitos vírus. Alguns exemplos incluem HIV1 (PERFETTINI *et al.*, 2005; GUTIERREZ-SANMARTIN *et al.*, 2008), *Influenza virus* (MARUOKA *et al.*, 2003), *Japanese encephalitis virus* (YANG *et al.*, 2009), *Coronavirus da SARS* (MIZUTANI *et al.*, 2004), *Pseudorabies virus* (YEH *et al.*, 2008), *Theiler virus* (SON *et al.*, 2009), e *Dengue virus* (NAGILA *et al.*, 2013). Em alguns casos, a ativação de p53 contribui para a apoptose durante a infecção viral (PERFETTINI *et al.*, 2005; SON *et al.*, 2009). Durante a infecção pelo *Influenza virus*, a via ASK1-p38 MAPK e JNK transmitem o sinal pró-apoptótico em resposta à ativação de PKR e (ou) ao estresse do retículo endoplasmático (MARUOKA *et al.*, 2003; SUMBAYEV; YASINSKA, 2006). Já durante a infecção pelo CVB3, a ativação de p38 MAPK pode resultar em efeitos contrastantes, dependendo do equilíbrio entre diferentes vias sinalizadoras: morte celular por necrose e, indiretamente, apoptose, devido à inibição de ERK1/2 por p38 MAPK, ou sobrevivência, via ativação de ERK5, dependente de p38 MAPK (JENSEN *et al.*, 2013).

Em relação à modulação, por p38 MAPK, da inflamação em resposta às infecções virais, alguns exemplos incluem *Influenza virus* (LEE *et al.*, 2005; HUI *et al.*, 2009), HIV1 (LEGHMARI *et al.*, 2008); *Rabies virus* (NAKAMICHI *et al.*, 2005), *Hepatitis C virus* (ISHIDA *et al.*, 2004), *Sendai virus* (JOHNSEN *et al.*, 2013) e *Dengue virus* (NAGILA *et al.*, 2013). Os altos níveis de TNF α secretados em resposta ao *Influenza virus* aviário H5N1 está diretamente relacionada à ativação de p38 MAPK durante a infecção por H5N1, mas não por H1N1 (LEE *et al.*, 2005). A indução de IFN estimulada pela infecção viral também pode ser mediada por p38 (ISHIDA *et al.*, 2004; MIKKELSEN *et al.*, 2009), assim como a expressão de quimiocinas (NAKAMICHI *et al.*, 2005). Durante a infecção pelo *Sendai virus*, a expressão de IFN β e outras citocinas pro-inflamatórias é induzida por ICER, um regulador transcricional modulado por p38 MAPK (JOHNSEN *et al.*, 2013). Durante a infecção pelo *Dengue virus*, a ativação de p38 MAPK é responsável tanto pela indução de apoptose, como de TNF α , em resposta à infecção (NAGILA *et al.*, 2013).

Dada a participação de p38 MAPK nas respostas celulares contra as infecções, alguns vírus dispõem de estratégias para inibir a sua função. Um exemplo é a proteína NS5 do *Hepatitis C virus* (HCV), que interage com e inibe a MAP3K MLK3, o que atenua a ativação de p38 MAPK e promove a sobrevivência da célula infectada (AMAKO *et al.*, 2013).

JUSTIFICATIVA

Os vírus dependem das funções celulares de seus hospedeiros durante a infecção. Para completarem seu ciclo de vida, os vírus modificam o meio intracelular a fim de torná-lo propício à multiplicação e disseminação virais e, ao mesmo tempo, escapar da resposta imune do hospedeiro contra a infecção viral. Para tal, as vias de sinalização responsáveis por regular aspectos centrais da fisiologia celular, como proliferação, sobrevivência e apoptose, são comumente co-optadas pelos vírus durante a infecção (GREBER, 2002; BONJARDIM *et al.*, 2009; MÜNTER *et al.*, 2006).

Os poxvírus se caracterizam por apresentarem um grande genoma que codifica diversas proteínas envolvidas na interação com os seus hospedeiros. Algumas dessas proteínas interferem com a atividade de importantes vias sinalizadoras celulares durante a infecção, com o objetivo de garantir o sucesso reprodutivo viral. Dessa forma, as vias sinalizadoras ativadas durante a infecção da célula hospedeira são importantes determinantes do tropismo viral e da susceptibilidade do hospedeiro à infecção pelos poxvírus (MCFADDEN, 2005). Visto que as vias sinalizadoras celulares desempenham um papel central no ciclo de vida de diversos vírus e, conseqüentemente, na patogênese da infecção e da doença, isso implica que o estudo dessas vias sinalizadoras ativadas durante a infecção pelos poxvírus pode revelar novos alvos terapêuticos, assim como contribuir para o aperfeiçoamento das tentativas de aplicação dos poxvírus como vetores vacinais ou agentes oncolíticos (MCFADDEN, 2005).

A busca de novos alvos terapêuticos para os poxvírus é particularmente importante diante do aumento do número de infecções por esses vírus em humanos nos últimos anos (LEWIS-JONES, 2004; SHCHELKUNOV, 2013). No Brasil, há muitos registros de infecções zoonóticas por VACV em bovinos e em humanos. Desses surtos foram isolados diversas amostras de VACV geneticamente e biologicamente divergentes. Cantagalo, Passatempo, Araçatuba, Guarani P1, Guarani P2 e Mariana são algumas dessas amostras (DAMASO *et al.*, 2000; TRINDADE *et al.*, 2003; LEITE *et al.*, 2005; TRINDADE *et al.*, 2006; ABRAHÃO *et al.*, 2009). Amostras de VACV também foram isoladas de roedores, tais como BeAn 58058, SPAn 232, Belo Horizonte e Mariana

(FONSECA *et al.*, 1998; FONSECA *et al.*, 2002; TRINDADE *et al.*, 2004; ABRAHÃO *et al.*, 2009). Estudos realizados no Laboratório de Vírus já mostraram diferenças significativas quanto à virulência dessas amostras que correlacionaram com as diferenças genéticas entre elas, sendo o VBH considerado o mais virulento (TRINDADE *et al.*, 2007; FERREIRA *et al.*, 2008).

Há anos, o Grupo de Transdução do Sinal da UFMG tem se dedicado ao estudo da intrincada interação poxvírus-célula hospedeira, através da análise da ativação e da relevância funcional de vias de sinalização celulares durante a infecção pelos *Orthopoxvirus* VACV e CPXV. Demonstrou-se que as vias MEK-ERK e MKK-JNK são ativadas durante a infecção por ambos os vírus e desencadeiam a ativação de fatores de transcrição, como c-Fos, EGR1 e c-Jun, que desempenham seu papel em diferentes etapas do ciclo de vida viral, afetando ora a multiplicação, ora a liberação dos vírions extracelulares, ora ambas (DE MAGALHÃES *et al.*, 2001; ANDRADE *et al.*, 2004; SILVA *et al.*, 2006; PEREIRA *et al.*, 2012a; BRASIL, 2010; LEITE, 2010; OLIVEIRA, 2013). O Grupo de Transdução do Sinal também demonstrou a ativação da via PI3K-Akt durante infecção por VACV e CPXV, revelando seu papel antiapoptótico e promotor da multiplicação viral, através da regulação da síntese proteica e da morfogênese (SOARES *et al.*, 2009).

Esses estudos foram realizados utilizando-se das amostras de referência VACV Western Reserve (VACV-WR) e CPXV Brighton Red (CPXV-BR). Entretanto, durante meu mestrado, foi observado que o *Vaccinia virus* Belo Horizonte (VBH) se comporta de modo diferente em relação ao papel de algumas vias sinalizadoras celulares para o ciclo de vida viral, quando comparado ao VACV-WR, apesar da proximidade genética entre os dois vírus. Ao contrário do VACV-WR, as vias sinalizadoras MEK-ERK e PI3K-Akt não foram essenciais para a multiplicação do VBH, assim como a MAPK JNK não foi requerida para regular a liberação de vírus envelopados. Por outro lado, a inibição farmacológica de p38 MAPK afetou significativamente a multiplicação do VBH, mas não do VACV-WR, sugerindo um possível papel diferencial dessa via sinalizadora durante os ciclos de vida do VBH e do VACV-WR (ALBARNAZ, 2010).

O VACV-WR foi obtido a partir de sucessivas passagens da amostra vacinal NYCBH (New York Board of Health) em cérebros de camundongos

neonatos, o que o tornou altamente neurovirulento (BRONSON; PARKER, 1941). Não se sabe, entretanto, o quanto que o caráter “artificial” do VACV-WR pode levar a interpretações equivocadas, particularmente em aspectos da interação vírus-hospedeiro. Diante disso, as diferentes amostras de VACV isoladas no Brasil a partir de infecções naturais em diferentes hospedeiros (roedores, bovinos, equinos e humanos) constituem importantes ferramentas na investigação da biologia do VACV e da sua interação com o hospedeiro.

Grandes dúvidas ainda existem acerca da origem das amostras de VACV circulantes no Brasil assim como os seus reservatórios naturais (TRINDADE *et al.*, 2007; ABRAHÃO *et al.*, 2009). Uma investigação mais acurada sobre a interação vírus-hospedeiro durante a infecção por essas amostras brasileiras, aliando abordagens *in vitro*, *in vivo*, genômicas e ecológicas, pode ajudar a responder esses intrigantes questionamentos. A investigação dos aspectos bioquímicos e celulares da infecção ajudará com certeza a enriquecer essa busca.

Diante do exposto acima e do possível papel que p38 MAPK parece desempenhar no ciclo de vida do VACV, a proposta do meu doutorado é estudar a ativação de p38 MAPK durante a infecção pelo VBH, em comparação com o VACV-WR, avaliando a relevância funcional dessa proteína sinalizadora do hospedeiro para o tropismo viral, no que se refere à habilidade de geração e disseminação da progênie viral.

OBJETIVOS

1. Objetivo Geral

Investigar a ativação e a relevância funcional da MAPK p38 durante o ciclo de vida do *Vaccinia virus* (VACV).

2. Objetivos Específicos

2.1. Caracterizar a cinética de ativação de p38 MAPK durante a infecção pelo VACV Western Reserve (VACV-WR) e pelo VACV Belo Horizonte (VBH);

2.2. Avaliar o papel de p38 MAPK para a multiplicação do VACV-WR e do VBH;

2.3. Verificar a relevância de p38 MAPK para o acúmulo de proteínas virais precoces e tardias do VACV-WR e do VBH;

2.4. Avaliar a relevância de p38 MAPK para a morfogênese do VACV-WR e do VBH;

2.5. Avaliar o papel de p38 MAPK para a disseminação do VACV-WR;

2.6. Investigar o envolvimento de p38 MAPK na ativação de MK2 desencadeada durante a infecção pelo VACV-WR;

2.7. Investigar o envolvimento de p38 MAPK na regulação da expressão de Cyclin D1 e a relevância funcional desta regulação durante a infecção pelo VACV-WR.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Células

1.1. Células BSC-40

As células BSC-40, linhagem contínua de células epiteliais derivadas de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*), foram gentilmente cedidas pelo Dr. Bernard Moss (National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Bethesda, Maryland, Estados Unidos), e foram cultivadas em meio mínimo essencial (MEM) autoclavável (Gibco), suplementado com 6% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab), L-glutamina a 200 mM, bicarbonato de sódio a 2,25 g/L, antibióticos (gentamicina a 40 µg/mL e penicilina a 200 U/mL) e antifúngico (anfotericina B a 1,5 µg/mL). Essas células foram mantidas a 37°C, sob atmosfera de CO₂ a 5%, assim como as demais células que foram utilizadas durante este trabalho.

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

1.2. Células A31

As células A31, linhagem contínua de fibroblastos 3T3 derivados de camundongos BALB/c, foram gentilmente cedidas pelos Drs. Hugo A. Armelin e Mari C. Sogayar (Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, USP) e foram cultivadas em meio mínimo essencial modificado por Dulbecco (DMEM) (Cultilab), suplementado com 8% de SFB e o mesmo coquetel de antibióticos e antifúngico utilizado para as células BSC-40.

1.3. Células HeLa

As células HeLa, linhagem contínua de células epiteliais de adenocarcinoma cervical humano, foram cultivadas em meio mínimo essencial (MEM) autoclavável (Gibco), suplementado com 7% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab), L-glutamina a 200 mM, bicarbonato de sódio a 2,25 g/L, antibióticos (gentamicina a 40 µg/mL e penicilina a 200 U/mL) e antifúngico (anfotericina B a 1,5 µg/mL).

2. Vírus

O *Vaccinia virus* Western Reserve (VACV-WR) foi cedido pelos Drs. Flávio Guimarães da Fonseca (Departamento de Microbiologia, ICB/UFMG) e Bernard Moss (National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Bethesda, Maryland, Estados Unidos).

O *Vaccinia virus* Belo Horizonte (VBH) foi isolado no Laboratório de Vírus a partir de amostras clínicas de camundongos doentes, durante um surto de varíola murina (*mousepox*) no Centro de Bioterismo da UFMG. O isolamento viral foi feito através de inoculação em membrana corioalatoide de ovos embrionados de galinha e em culturas de células Vero (linhagem contínua de células epiteliais de macaco verde africano). Após o isolamento, o vírus foi propagado e titulado em células Vero (DINIZ *et al.*, 2001). O vírus foi submetido à purificação de placa em células BSC-40, a fim de garantir a sua homogeneidade genética, e sua autenticidade foi verificada através de amplificação do gene A25L/AT1 e sequenciamento dos genes A56R e B19R.

O VACV- Δ TK-GFP, gentilmente cedido pelo Dr. Richard Moyer (University of Florida, Gainesville, Florida, Estados Unidos), expressa a proteína verde fluorescente (GFP), sob controle do promotor viral precoce, no locus do gene da timidina cinase viral (J2R/TK).

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

2.1. Produção dos estoques virais

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

por 15 min a 4°C (rotor A384, centrífuga Sorvall RT6000B) e, então, congeladas a -20°C para posterior purificação.

2.2. Purificação viral

A purificação dos estoques virais foi realizada de acordo com metodologia descrita por Joklik (1962). Sucintamente, as células coletadas foram submetidas à lise mecânica com o auxílio de um homogeneizador Dounce, em tampão de lise (MgCl₂ 1 mM; Tris-HCl 10 mM pH 7,0; KCl 10 mM), e centrifugadas a 2.500 rpm por 15 min a 4°C (rotor A384, centrífuga Sorvall RT6000B). O sobrenadante, contendo os vírus e restos celulares, foi coletado e centrifugado em colchão de sacarose a 36% a 14.000 rpm por 2 h a 4°C (rotor AH-629, ultracentrífuga Sorvall Combi), para a remoção dos restos celulares. O sedimento foi suspenso em tampão Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e submetido a sonicação por 2 ciclos de 30 s (Sonic Desmembrator-50, Fisher Scientific). A seguir, a suspensão viral foi centrifugada em gradiente de sacarose, variando de 25 a 40%, a 12.000 rpm por 45 min a 4°C (rotor AH 629, ultracentrífuga Sorvall Combi). A banda inferior formada após a centrifugação, correspondente às partículas virais completas e infecciosas do tipo IMV, foi coletada e centrifugada em tampão Tris-HCl 10 mM pH 8,0 a 20.000 rpm por 1 h a 4°C (rotor AH 629, ultracentrífuga Sorvall Combi), para a remoção da sacarose. O sedimento resultante foi então coletado, suspenso no mesmo tampão, distribuído em alíquotas e congelado a -70°C, para posterior titulação e uso nos experimentos.

2.3. Titulação viral

A titulação dos estoques virais obtidos e dos experimentos descritos a seguir foi realizada de acordo com metodologia proposta por Campos e Kroon (1993). Resumidamente, células BSC-40 foram cultivadas em placas de seis ou 24 cavidades (TPP), por 16 h, até atingirem cerca de 90-100% de confluência. Duzentos microlitros de uma série de diluições seriadas decimais da suspensão contendo o vírus a ser titulado foram inoculados nas culturas de células. Uma cultura foi falsamente infectada e mantida como controle celular. Após 1 h de adsorção viral, foi adicionado meio contendo 1% de SFB. A revelação foi realizada após 48 h de infecção, através da fixação das culturas com formaldeído

a 3,7% por 30 min e coloração com solução de violeta cristal a 1% (p/v) em etanol 20% (v/v), por 15 min. As culturas contendo entre 10 e 100 placas de lise foram utilizadas para a determinação do título viral, expresso em pfu/mL (unidades formadoras de placa por mL).

3. Anticorpos e inibidores

Os anticorpos anti-fosfo-p38 (Thr180/Tyr182), anti-p38 total, anti-fosfo-ATF-2 (Thr69/Thr71), anti-fosfo-ERK-1/2 (Thr202/Tyr204), anti-fosfo-JNK-1/2 (Thr 183/Tyr185), anti-fosfo-MKK3/6 (Ser189/Ser207), anti-fosfo-MK2 (Thr334), anti-PARP (poli-ADP-ribose polimerase), anti-Cyclin D1, anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase, anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (Cell Signaling Technology), anti-p21-Cip1 (Becton-Dickinson), anti-MKP1 (Millipore) e anti- β -actina (Sigma-Aldrich) foram utilizados nos ensaios de transferência de “Western” nas diluições recomendadas pelos fabricantes. Os anticorpos para as proteínas virais A3, A17, A36, F18, H3 (gentilmente cedidos pelo Dr. Bernard Moss, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Bethesda, Maryland, Estados Unidos) e CrmA/SPI-2/B13 (gentilmente cedido pelo Dr. David Pickup, Duke University Medical Center, Estados Unidos) também foram utilizados.

O inibidor de p38 α / β MAPK [SB203580 – 4-(4-fluorofenil)-2-(4-metilssulfonilfenil)-5-(4-piridil)-imidazol], o inibidor de JNK VIII [N-(4-amino-5-ciano-6-etoxipiridin-2-il)-2-(2,5-dimetoxifenil)-acetamida] (Calbiochem), e de síntese do DNA (AraC, arabinosídeo C) (Sigma-Aldrich) foram utilizados segundo as recomendações do fabricante, em concentrações ótimas para a inibição específica de seus respectivos alvos, sem causar efeito tóxico às células.

4. Silenciamento de p38 α MAPK através da tecnologia de RNA interferente

Neste estudo, foi utilizada a tecnologia de RNA de interferência para silenciar a expressão do gene de *Mus musculus Mapk14* (Número de acesso no Genbank: NM_011951.2), que codifica p38 α MAPK. Para tanto, foram utilizadas duas sequências de shRNAs (RNAs em alça curto, do inglês *short hairpin RNA*) alvo previamente descritas e que levaram a redução da expressão de p38 α MAPK, sem afetar a expressão das demais isoformas de p38 MAPK (WANG *et*

al., 2008) (Tabela 1). Como controle negativo, foi utilizada uma sequência cujo alvo é o mRNA da proteína verde fluorescente (GFP) (WANG *et al.*, 2008) (Tabela 1).

As células A31 foram utilizadas para a transfecção estável, empregando-se o vetor de expressão p*Silencer*3.1-H1 neo (Figura 7) (Ambion), que confere resistência ao antibiótico neomicina, através da qual foi possível a seleção dos clones obtidos. De acordo com recomendações da Ambion, foram sintetizadas sequências de 63-64 nucleotídeos senso e antissenso que, quando pareadas, apresentaram, no sentido 5'-3': o sítio de restrição da endonuclease *Bam*HI, shRNA senso, uma alça de 9 nucleotídeos, shRNA antissenso, o sinal de terminação da RNA polimerase III e o sítio de restrição da endonuclease *Hind*III. As sequências foram sintetizadas sob encomenda pela Integrated DNA Technologies.

4.1. Clonagem do inserto dos shRNAs no vetor p*Silencer*

Os oligonucleotídeos sintetizados foram solubilizados a 1 µg/µL em água deionizada e, posteriormente, 2 µg de cada fita foram pareados em solução de pareamento de DNA (Ambion). Essa mistura foi aquecida a 90°C por 3 min, resfriada e incubada a 37°C por 1 hora, para o pareamento. Após pareado, o DNA foi clonado no vetor p*Silencer*3.1-H1 neo (Figura 7). Num tubo de 1,5 mL, foram adicionados 8 ng do DNA fita dupla, tampão da T4 DNA ligase (Tris-HCl 30 mM pH 7,8; MgCl₂ 10 mM; DTT (1,4-ditiotreitol) 10 mM; ATP (adenosina trifosfato) 1 mM] (Promega), 3 U de T4 DNA ligase, 100 ng do vetor p*Silencer* linearizado com as enzimas *Bam*HI e *Hind*III, e água deionizada q.s.p. 10 µL. A reação foi realizada a 4°C por 16 h e, em seguida, utilizada para transformação de bactérias *Escherichia coli* DH5α quimiocompetentes.

Após a transformação bacteriana, três colônias foram escolhidas aleatoriamente, crescidas em meio LB (Luria-Bertani) a 37°C por 16 h. O DNA plasmidial purificado com o kit Wizard Plus SV Minipreps (Promega) foi digerido com endonucleases *Bam*HI e *Hind*III para confirmação da liberação do inserto de tamanho esperado (~65 pb). Os plasmídeos positivos foram sequenciados para a confirmação da sequência. Os plasmídeos escolhidos foram crescidos para purificação plasmidial em média escala, com o kit Wizard Pure Yield

Tabela 1. Sequências dos shRNAs utilizados para o silenciamento da expressão de p38 α MAPK ou GFP (WANG *et al.*, 2008).

shRNA	Sequência senso
p38 α MAPK #1	5'-AGC CCA GCA ACC TAG CTG T-3'
p38 α MAPK #2	5'-GAG CCT GAC CTA TGA TGA A-3'
GFP	5'-GCT GAC CCT GAA GTT CAT C-3'

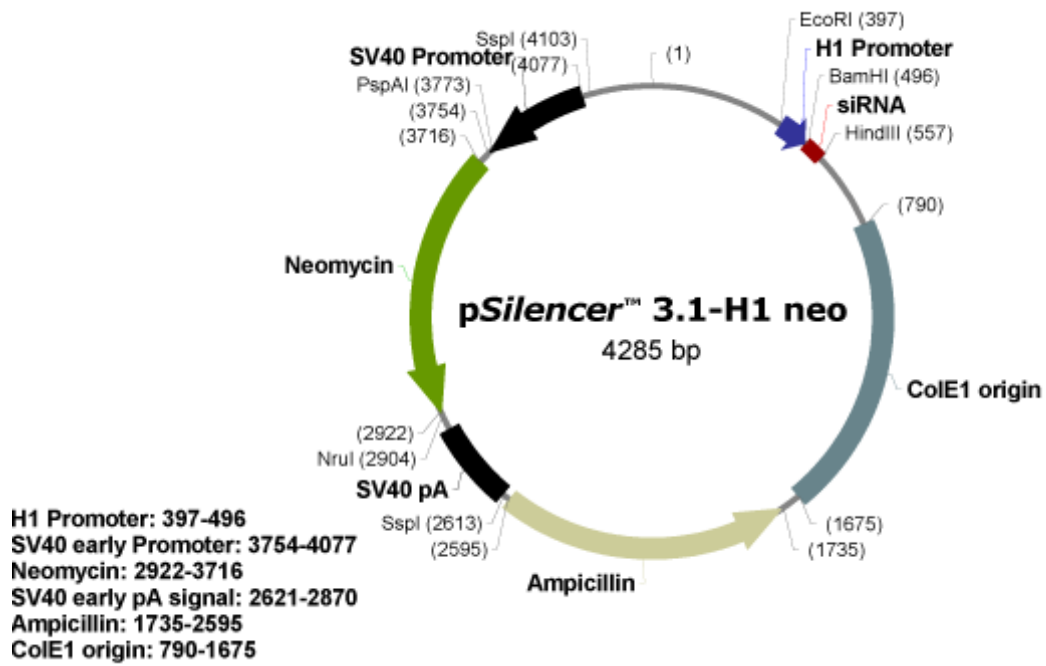


Figura 7. Representação esquemática do vetor pSilencer3.1-H1 neo. (Fonte: www.ambion.com)

Midipreps (Promega), para obtenção de quantidade de DNA suficiente para transfecção das células A31.

4.2. Transfecção de células A31 com fosfato de cálcio e seleção dos clones

Para a transfecção, uma suspensão de DNA/CaCl₂ foi preparada conforme descrito a seguir. Em um tubo de 1,5 mL, 10 µg do DNA foram adicionados a 450 µL de H₂O. A essa suspensão, foram adicionados 50 µL de CaCl₂ a 2,5 M. A mistura DNA/CaCl₂ foi adicionada, gota a gota, sobre 500 µL de tampão HeBS 2× (solução tamponada por HEPES), sob vortexação vigorosa e incubada por 40 min a temperatura ambiente. Após a incubação, a suspensão de DNA/CaCl₂ foi utilizada para a transfecção.

Células A31 recém-descongeladas foram cultivadas em placas de 10 cm de diâmetro até atingirem confluência de 25-50%, quando o meio de cultivo (DMEM suplementado com 8% de SFB) foi trocado por meio novo. Após 1 h, foi adicionada a suspensão de DNA/CaCl₂, gota a gota, sobre as células. Depois de homogeneizadas, as placas foram incubadas a 37°C, sob atmosfera de CO₂ a 5% por 16 h. A seguir, as células foram lavadas três vezes com PBS e DMEM suplementado com 8% de SFB e G418 (Geneticin, Gibco), um análogo sintético da neomicina, a 800 µg/mL foi adicionado para a seleção dos clones.

A confirmação dos clones expressando shRNA de p38α MAPK foi realizada através de RT-PCR quantitativo, para quantificar a expressão relativa de p38α MAPK e p38β MAPK. Dentre os clones mais eficientes em silenciar a expressão de p38α MAPK, foram escolhidos três clones mais uma mistura de clones para cada sequência utilizada (shRNA-p38α #1, shRNA- p38α #2, e shRNA-GFP) para a realização dos experimentos.

5. Infecção *in vitro*

Células A31, células A31 expressando shRNA de p38α MAPK ou de GFP, ou células HeLa, foram cultivados em garrafas de 25 cm² (TPP), para extração das proteínas totais, ou em placas de 24 poços (TPP), para posterior titulação da produção viral. Para os experimentos realizados em presença de alta concentração de soro (8%, células não carenciadas), após atingirem 90% de confluência, as células foram infectadas em presença de 8% de SFB, conforme

descrito abaixo. Para os experimentos realizados em presença de baixa concentração de soro, ao atingirem 90% de confluência, as células foram carenciadas em meio DMEM suplementado com 1% de SFB por no mínimo 12 h. O objetivo do carenciamento é minimizar o estímulo mitogênico exercido pelos componentes do SFB, sincronizando as células no estado quiescente (fase G0 do ciclo celular). As células foram infectadas com VBH ou VACV-WR na MOI desejada, em meio contendo SFB a 8% (células não carenciadas) ou 1% (células carenciadas) e mantidas por 1 h, sob agitação intermitente, para a adsorção viral. A seguir, nos experimentos para análise da produção viral, o inóculo viral foi removido e as células lavadas uma vez com PBS aquecido a 37°C, para remoção das partículas não adsorvidas. Após a adsorção, DMEM contendo 8% ou 1% de SFB foi adicionado e as células foram incubadas por tempos variando de 1 h a 72 h, dependendo do objetivo do experimento. Quando inibidores farmacológicos foram utilizados, as células foram pré-tratadas por 30 min antes da infecção, e os mesmos foram mantidos no meio de cultura durante todo o tempo de infecção.

Para os experimentos de titulação da produção viral, após os diferentes tempos de infecção, as células mais o meio de cultura foram congelados e descongelados três vezes para promover a lise celular e liberação da progênie viral. O lisado celular foi utilizado para a determinação dos títulos virais em células BSC-40, conforme descrito no item 2.3.

6. Fenótipo da placa de lise viral

Para a análise do fenótipo da placa de lise do VACV, células A31, células A31 expressando shRNA de p38 α MAPK ou de GFP ou células BSC-40 foram cultivados em placas de seis poços (TPP) e, após atingirem 90% de confluência, foram carenciadas com meio contendo 1% de SFB por, no mínimo, 12 h. As células foram infectadas com duas diluições decimais subsequentes do estoque do VACV-WR e incubadas por 1 h, sob agitação intermitente, para a adsorção viral. A seguir, as células foram lavadas com PBS aquecido a 37°C, para remoção das partículas não adsorvidas às células, e DMEM contendo 1% de SFB foi adicionado. Após 48 h e 72 h de infecção, as monocamadas celulares foram fixadas com formaldeído a 3,7% por 30 min, e coradas com solução de violeta cristal a 1% (p/v) em etanol 20% (v/v), por 15 min.

7. Extração de proteínas totais

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

8. Fracionamento celular

Para os ensaios de fracionamento celular, as células foram crescidas em garrafas de 75 cm² (TPP). Após o tempo de infecção, as células foram lavadas três vezes com PBS gelado, raspadas em 1,5 mL de PBS gelado e coletadas em tubos de 2,0 mL. Após centrifugação a 3.500 rpm por 5 min a 4°C em microcentrífuga (Eppendorf 5417R), o sobrenadante foi cuidadosamente removido, e as células foram suspensas em 900 µL de tampão RBS suplementado com inibidores de proteases e fosfatases [Tris-HCl pH 7,4 10 mM; NaCl 10 mM; MgCl₂ (cloreto de magnésio) 3 mM; EGTA 0,1 mM; DTT 0,5 mM; leupeptina 2,5 µg/mL; aprotinina 2,7 µg/mL; PMSF 1 mM; NaVO₃ 1 mM; NaF 50 mM] e incubadas no gelo por 20 min. A seguir, foram adicionados 100 µL de NP-40 a 5%, misturados por inversão e incubados no gelo por 5 min. Após centrifugação a 6.000 rpm por 5 min a 4°C, o sobrenadante contendo as proteínas citoplasmáticas foi coletado e estocado a -20°C. Os precipitados foram deslocados, lavados uma vez em tampão RBS (Tris-HCl pH 7,4 10 mM; NaCl 10 mM; MgCl₂ 3 mM) gelado e centrifugados a 9.000rpm por 5min a 4°C. Os precipitados foram vigorosamente homogeneizados, por pipetagem, em 60 µL de tampão C mais inibidores (NaCl 0,42 M; MgCl₂ 1,5 mM; glicerol 25%; HEPES 20

mM pH 7,4; EDTA 0,2 mM; DTT 0,5 mM; leupeptina 2,5 µg/mL; aprotinina 2,7 µg/mL; PMSF 1 mM; NaVO₃ 1 mM; NaF 50 mM) e incubados por 30-40 min no gelo, sendo homogeneizados por pipetagem a cada 15min. Após centrifugação a 13.500 rpm por 10 min a 4°C, aproximadamente 40-50 µL do sobrenadante contendo as proteínas nucleares foram transferidos para tubos de 0,6mL novos e igual volume de tampão D mais inibidores (KCl 50 mM; glicerol 20%; HEPES 20 mM pH 7,4; EDTA 0,2 mM; DTT 0,5 mM; leupeptina 2,5 µg/mL; aprotinina 2,7 µg/mL; PMSF 1 mM; NaVO₃ 1 mM; NaF 50 mM) foi adicionado e homogeneizado. Após, as proteínas foram mantidas a -20°C até o momento do uso. A concentração de proteínas citoplasmáticas ou nucleares foi determinada por espectrofotometria, utilizando o kit Bio-Rad Assay (Bio-Rad Laboratories).

9. Transferência de “Western”

Tampão LB (“Laemmli buffer”) 5x [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 10-50 µg/amostra de extratos proteicos, que foram então desnaturadas por 5 min a 99°C. As amostras foram submetidas a fracionamento em gel de poliacrilamida/dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE) a 10%. Após o fracionamento, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose Hybond ECL (GE Healthcare) ou de PVDF (fluoreto de polivinilideno) Hybond-P (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 transferência, além da informação sobre a equivalência das quantidades de proteínas utilizadas.

A seguir, as membranas foram bloqueadas em leite em pó desnatado a 5% (p/v) e Tween-20 a 0,1% (v/v) em PBS. Após 1 h a temperatura ambiente, as membranas foram lavadas três vezes em PBS/Tween-20 a 0,1% e incubadas com o anticorpo primário desejado por 24 h a 4°C, na diluição recomendada pelo fabricante, em albumina sérica bovina (BSA) a 5% (p/v) em PBS/Tween-20. As membranas foram novamente lavadas três vezes em PBS/Tween-20 e incubadas por 1 h a temperatura ambiente com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase, na diluição recomendada pelo fabricante em leite em pó desnatado a 5% (p/v) em PBS/Tween-20. Após as membranas serem

novamente lavadas em PBS/Tween-20, as mesmas foram incubadas em solução reveladora ECL ou ECL Plus (GE Healthcare) pelo tempo recomendado pelo fabricante, expostas contra filme Hyperfilm ECL (GE Healthcare) e reveladas com revelador e fixador (Kodak), de acordo com as instruções do fabricante.

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

10. Extração do RNA total

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

11. Transcrição reversa

Para a síntese do cDNA (DNA complementar), 0,5-1 µg de RNA foram adicionados à mistura de reação a seguir: tampão da transcriptase reversa (Tris-HCl 50mM pH 8,3; KCl 75 mM; MgCl₂ 3 mM; DTT 10 mM), 0,5 µg de oligonucleotídeo dT, dNTP (deoxirribonucleotídeo trifosfato) 500 µM, 200 U de transcriptase reversa MMLV (vírus da leucemia murina Moloney) (Promega) e água deionizada tratada com DEPC q.s.p. 25 µL. Antes da adição à mistura de reação, o RNA, o oligonucleotídeo dT e água deionizada tratada com DEPC q.s.p. 15 µL foram desnaturados a 70°C por 5 min e, posteriormente, mantidos no gelo por 2 min. A reação de transcrição reversa foi realizada por 1 h a 42°C, em termociclador (Eppendorf).

12. PCR Quantitativo

O PCR quantitativo foi realizado em equipamento StepONE Real Time PCR System (Applied Biosystems). A mistura de reação foi a seguinte: 5 µL de mistura para PCR Power SYBR Green (Applied Biosystems), 0,2 µM de cada iniciador (*forward* e reverso), 1 µL de cDNA diluído 1:3 e água deionizada q.s.p. 10 µL. As condições de reação foram: desnaturação inicial de 10 min a 95°C, seguida de 40 ciclos de 15 s a 95°C e 1 min a 60°C. Após o fim da reação, a especificidade dos produtos amplificados foi confirmada através da curva de dissociação, observando-se a temperatura específica de dissociação (T_m) para cada um dos alvos. Os iniciadores para a análise dos níveis de mRNA de p38α MAPK, p38β MAPK e β-actina são mostrados na Tabela 2 (WANG *et al.*, 2008).

O método utilizado para a análise da expressão do mRNA foi a quantificação por curva padrão relativa. Os níveis de mRNA de p38α MAPK e p38β MAPK foram normalizados em relação aos níveis de mRNA de β-actina. Para a geração da curva padrão relativa para cada um dos alvos, foram utilizadas diluições seriadas decimais de produtos de PCR específicos, variando entre 10⁻⁴ a 10⁻⁸, às quais foram atribuídos valores arbitrários variando de 100.000 a 10, respectivamente. As quantidades relativas de mRNA de p38α MAPK e p38β MAPK nas células shRNA-p38α, shRNA-p38β e shRNA-GFP foram normalizadas em relação às quantidades detectadas nas células A31 parentais, às quais foi atribuído valor igual a 1.

Tabela 2. Iniciadores utilizados para a avaliação da expressão do mRNA de p38 α MAPK e p38 β MAPK nas células expressando shRNA de p38 α MAPK e de GFP.

Iniciador	Sequência	Alvo	Tamanho do Produto (pb)
F ^a	5'-GCA GGG ACC TTC TCA TAG AT-3'	p38 α MAPK	150
R ^b	5'-GAG GGA TAG CCT CAG ACC-3'		
F	5'-CTG CAA GGA AAG GCC CTC-3'	p38 β MAPK	117
R	5'-CAG GCA ATG CCT CAC TGC-3'		
F	5'-AAA TCG TGC GTG ACA TCA AAG A-3'	β -actina	64
R	5'-GCC ATC TCC TGC TCG AAG TC-3'		

^aforward; ^breverso

13. Microscopia eletrônica de transmissão

Células A31 foram cultivadas em placas de Petri de vidro de 60 mm de diâmetro até atingirem 90% de confluência, quando foram carenciadas com DMEM contendo 1% de SFB carenciadas por no mínimo 12 h. As células A31 foram pré-tratadas com DMSO ou SB203580 por 30 min e infectadas com VACV-WR ou VBH com MOI igual a 10 e mantidas por 1 h, sob agitação intermitente, para a adsorção viral. A seguir, foi adicionado DMEM contendo 1% de SFB com DMSO ou com inibidor. Após 24 h de infecção, as células foram lavadas com DMEM sem soro e fixadas em glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 por 1 h a temperatura ambiente. Em seguida, o fixador foi removido, tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 foi adicionado e as amostras foram encaminhadas para processamento no Centro de Microscopia da UFMG. Resumidamente, a seguir, as células foram pós-fixadas com tetróxido de ósmio 2%, incluídas em resina Epon, e os cortes ultrafinos foram contrastados com acetato de uranila 2%. As amostras foram examinadas ao microscópio eletrônico de transmissão Tecnai G2-Spirit BioTwin (FEI) operando a 80kV, no Centro de Microscopia da UFMG.

14. Microscopia confocal a laser

As células A31 ou HeLa foram cultivadas sobre lamínulas de 13 mm de diâmetro (Perfecta) inseridas em placas de 24 poços (TPP), até atingirem 90% de confluência. As células A31 foram carenciadas com DMEM contendo 1% de SFB carenciadas por no mínimo 12 h. As células foram pré-tratadas com DMSO ou SB203580 por 30 min e infectadas com duas diluições seriadas decimais do estoque VACV- Δ TK-GFP. Após adsorção por 1 h, sob agitação intermitente, o inóculo viral foi removido, as células foram lavadas com PBS aquecido a 37°C e DMEM contendo 1% de SFB acrescido de DMSO ou inibidor foi adicionado. Após 48 h de infecção, as células foram lavadas duas vezes com PBS, fixadas com paraformaldeído a 4% em PBS por 10 min, permeabilizadas com Triton X-100 a 0,2% em PBS/BSA 3% por 5 min, e bloqueadas com SFB a 2% em PBS/BSA 3% durante 30 min. Em seguida, as células foram lavadas três vezes com PBS/BSA 3% e as lamínulas transferidas para uma câmara úmida protegida da luz. As células foram incubadas com faloidina conjugada à rodamina (Molecular Probes), para marcação do citoesqueleto de actina, durante 30 min a temperatura

ambiente. Após três lavagens com PBS, as lamínulas montadas sobre lâminas de vidro utilizando-se uma gota de Mowiol (Sigma-Aldrich). As células foram analisadas ao microscópio confocal a laser 510 META (Zeiss), do Centro de Aquisição e Processamento de Imagens do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (CAPI-ICB).

15. Análise estatística

A análise estatística foi realizada através do teste t de Student ou pela análise de variância com dois fatores (Two-way ANOVA), seguida de pós-teste de Bonferroni.

RESULTADOS

1. O inibidor de p38 α / β MAPK SB203580 afeta diferencialmente a multiplicação de duas amostras de *Vaccinia virus*

Ao longo do meu mestrado, o meu objetivo principal foi avaliar a relevância funcional de diferentes vias sinalizadoras da célula hospedeira para a multiplicação do *Vaccinia virus* Belo Horizonte (VBH) em comparação ao *Vaccinia virus* Western Reserve (VACV-WR). Através do uso de inibidores farmacológicos, verificaram-se diferenças significativas entre essas duas amostras virais, das quais se destacam: (i) LY294002, inibidor de PI3K, inibiu significativamente mais a multiplicação do VACV-WR (redução de 75% da progênie viral) do que a multiplicação do VBH (redução de 50%); e (ii) SB203580, inibidor de p38 α / β MAPK, apresentou efeito oposto, inibindo menos a multiplicação do VACV-WR (redução de 30-60%) que a do VBH (redução de 90%) (ALBARNAZ, 2010). Diante dessas diferenças, decidiu-se conduzir uma série de experimentos para caracterizar melhor esta possível função diferencial de p38 MAPK do hospedeiro no ciclo de vida do VACV-WR e do VBH.

Inicialmente, analisou-se se o efeito do SB203580 sobre a multiplicação do VBH em células A31 mantidas em baixa concentração de soro (carenciadas) era dose-dependente. Conforme a Figura 8A, concentrações crescentes de SB203580 acarretaram em reduções também crescentes da progênie do VBH após a infecção com alta multiplicidade de infecção (MOI). O mesmo efeito dose-dependente não foi observado para o VACV-WR, pois se observou valores comparáveis de unidades formadoras de placa (pfu) após a infecção na presença das diferentes concentrações de SB203580. Entretanto, todas as doses utilizadas inibiram a multiplicação do VACV-WR, variando entre 50% (5 μ M) e 73% (20 μ M) de redução da progênie viral em presença de SB203580 (Figura 8A).

De modo a avaliar se as concentrações de SB203580 utilizadas estavam afetando a viabilidade das células A31, o ensaio do MTT foi empregado. A concentração média testada (20 μ M) não apresentou nenhum efeito prejudicial à viabilidade celular quando comparada ao DMSO (Figura 8B). As células tratadas com as duas concentrações maiores (40 e 80 μ M) apresentaram uma

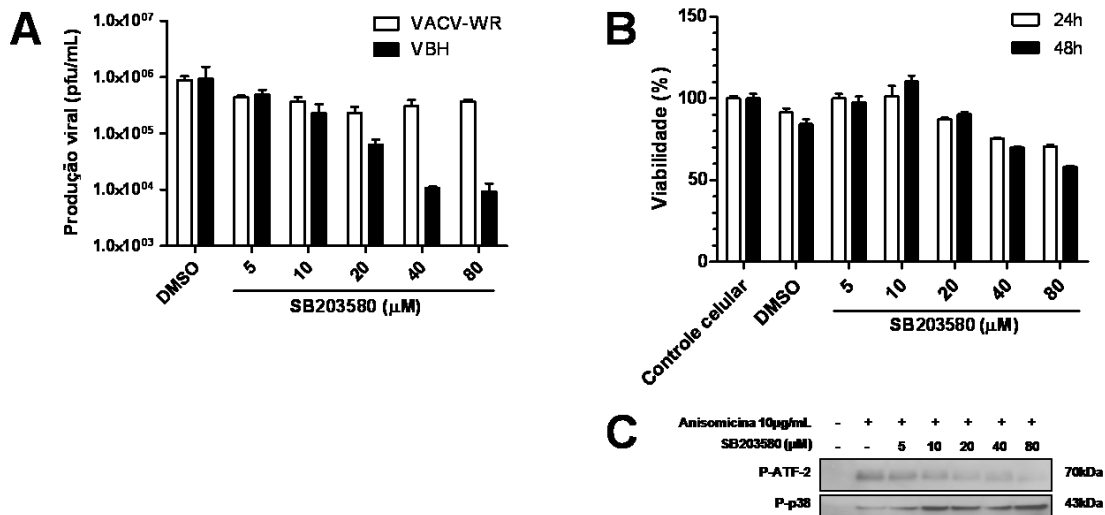


Figura 8. O inibidor de p38α/β MAPK SB203580 inibe diferencialmente a multiplicação do *Vaccinia virus* Western Reserve e Belo Horizonte.

Células A31 carenciadas, pré-tratadas com DMSO 0,2% ou diferentes concentrações de SB203580 por 30 min, foram infectadas com VACV-WR ou VBH (MOI 10) em presença de DMSO ou do inibidor SB203580 nas respectivas concentrações ao longo de toda a infecção (A) ou mantidas sem infecção em presença do inibidor SB203580 nas respectivas concentrações (B, C). A, Após 48 h pós-infecção (hpi), as células mais o meio de cultura foram congelados e descongelados por três vezes, e titulados em células BSC-40. B, Após 24 h ou 48 h, as células foram submetidas ao ensaio de viabilidade do MTT. C, Após o pré-tratamento, as células foram tratadas com anisomicina a 10 μg/ml por 15 min. Extratos de proteínas totais (50 μg) foram submetidos a fracionamento eletroforético seguido de transferência para membrana de nitrocelulose. Após bloqueio de ligações inespecíficas, as membranas foram incubadas com anticorpo primário (anti-fosfo-ATF2-Thr69/Thr71 e fosfo-p38 MAPK-Thr180/Tyr182), (diluição 1:1000) seguido de incubação com anticorpo secundário conjugado à peroxidase (diluição 1:3000) e revelação. As massas moleculares das proteínas são indicadas na direita da figura.

perda de aproximadamente 15% na viabilidade, valor inferior à redução observada na progênie do VBH (Figura 8A). E, finalmente, para verificar se as concentrações empregadas de SB203580 afetam a função de cinase de p38 MAPK, avaliou-se o seu efeito sobre a fosforilação do fator de transcrição ATF2 em resposta ao tratamento com anisomicina, um clássico indutor das SAPKs p38 e JNK (Figura 8C). O efeito do SB203580 sobre a fosforilação de ATF2 foi dose-dependente, mas não foi absoluto, porque mesmo em presença de 80 μ M de SB203580 ainda foi possível observar ATF2 fosforilado (Figura 8C). Essa constatação possivelmente se deve ao fato de ATF2 não ser substrato exclusivo de p38 MAPK em resposta à anisomicina; tanto p38 MAPK, quanto JNK fosforilam ATF2 em células tratadas com anisomicina (MORTON *et al.*, 2004).

Para melhor caracterizar o efeito do SB203580 sobre a multiplicação do VACV-WR e do VBH em células A31, foi testada a influência da multiplicidade de infecção e da concentração de soro durante a infecção sobre a ação do inibidor. Quando a infecção foi conduzida com MOI igual a 5, o efeito do SB203580 foi maior e estatisticamente significativo apenas nas células infectadas com o VBH (Figura 9A), ao passo que com MOI igual a 1, pôde se observar que ambas as amostras de VACV foram afetadas, mas o VBH foi consideravelmente mais sensível que o VACV-WR à ação do SB203580 (Figura 9A). Com a MOI igual a 1 (tanto 24 h quanto 48 h após a infecção), o VBH foi seis vezes mais sensível ao SB203580, quando comparado ao VACV-WR: a redução na progênie do VBH foi de mais de 30 vezes, enquanto a redução na progênie do VACV-WR foi de 5,5 vezes.

Na Figura 9B, é mostrada a influência do soro sobre a ação do SB203580. Quando o soro esteve presente em alta concentração (8%) antes e ao longo de todo o período de infecção, observou-se uma grande redução na progênie do VACV-WR (98,7%, $P < 0,05$), se comparada à redução de 73,9% ($P = 0,0536$) em baixa concentração de soro (1%) antes e ao longo de todo o período de infecção. Quando células mantidas em alta concentração de soro foram infectadas, mas a infecção foi conduzida com soro a 1%, a inibição da progênie viral pelo SB203580 também foi grande (97,4%, $P < 0,05$). Contudo, com a condição inversa à anterior, ou seja, a infecção é feita em células carenciadas (soro a 1%) por 12h, mas soro a 8% é adicionado após a adsorção e mantido ao longo da

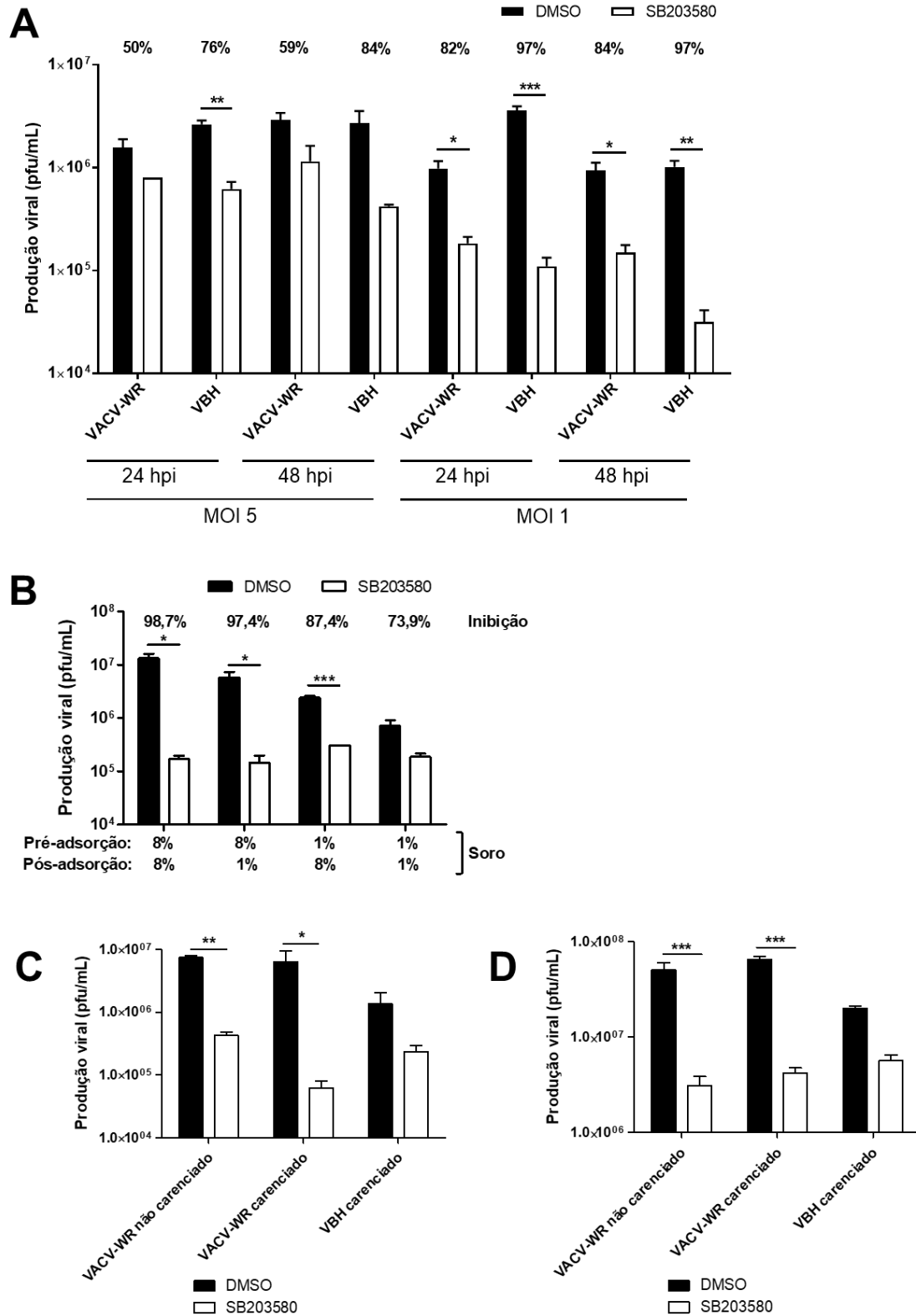


Figura 9. A multiplicidade de infecção, a concentração de soro e a linhagem celular influenciam o efeito do inibidor de p38 α / β MAPK SB203580 sobre a multiplicação do *Vaccinia virus*.

A, Células A31 carenciadas, pré-tratadas com DMSO 0,2% ou SB203580 20 μ M por 30 min, foram infectadas com VACV-WR ou VBH (MOI 5 ou 1) em presença de DMSO ou do inibidor SB203580 ao longo de toda a infecção. Após 24 hpi e 48 hpi, as células mais o meio de cultura foram congelados e descongelados por três vezes, e titulados em células BSC40. B, Células A31 mantidas nas diferentes concentrações de soro, conforme indicado no gráfico, foram pré-tratadas com DMSO 0,2% ou SB203580 20 μ M por 30 min e a seguir foram infectadas com VACV-WR (MOI 10) em presença de DMSO ou do inibidor SB203580. Após 1 h de adsorção sobre o gelo, o inóculo viral foi removido, as células foram lavadas com PBS gelado, e foi adicionado meio aquecido a 37°C contendo soro nas concentrações indicadas. Após 48 hpi, as células mais o meio de cultura, foram congelados e descongelados por três vezes, e titulados em células BSC-40. C e D, Células HeLa (C) ou BSC40 (D) não carenciadas ou carenciadas foram pré-tratadas com DMSO 0,2% ou SB203580 20 μ M por 30min, e a seguir foram infectadas com VACV-WR ou VBH (MOI 10) em presença de DMSO ou do inibidor SB203580. Após 1 h de adsorção sobre o gelo, o inóculo viral foi removido, as células foram lavadas com PBS gelado, e foi adicionado meio aquecido a 37°C contendo soro 1% (carenciadas) ou 7% (não carenciadas). Após 48 hpi, as células mais o meio de cultura, foram congelados e descongelados por três vezes, e titulados em células BSC-40.

infecção, a redução foi menor (87,4%, $P < 0,001$). Em células infectadas pelo VBH, a concentração de soro também afetou a ação do SB203580. Em células mantidas em alta concentração de soro antes e ao longo da infecção, a redução na progênie viral foi de 97,7% ($P < 0,01$), ao passo que células carenciadas nas quais a infecção foi conduzida com soro a 1%, a redução foi de 90% ($P < 0,01$) (dados não mostrados). A observação da Figura 9B também leva à constatação de que o soro influenciou o crescimento do VACV-WR em células A31, obtendo-se os maiores títulos virais quando a infecção foi realizada na presença de soro em alta concentração antes e ao longo da infecção, e os menores títulos virais, quando a infecção foi realizada na presença de soro em baixa concentração antes e ao longo da infecção.

A fim de verificar se o efeito do SB203580 sobre a multiplicação do VACV-WR se reproduz em outras linhagens celulares, foram testadas duas linhagens epiteliais: HeLa (humano) e BSC-40 (primata não humano) (Figura 9C). A multiplicação do VACV-WR foi igualmente afetada pelo SB203580 nas células HeLa e BSC-40, independentemente da concentração de soro, com reduções da progênie maiores que 95% em presença do inibidor (Figura 9D). Por outro lado, o efeito do SB203580 sobre a multiplicação do VBH foi menor e não significativo estatisticamente nas células BSC40 (redução de 72%) e HeLa (redução de 83%) (Figura 9C e D).

2. Efeito do inibidor de p38 α / β MAPK SB203580 sobre o acúmulo de proteínas e a morfogênese do *Vaccinia virus*

Dada a diferença entre o VACV-WR e o VBH em relação à sensibilidade ao SB203580, hipotetizou-se se essa diferença estaria associada a algum defeito numa das diferentes etapas do ciclo de multiplicação do vírus. Para testar essa hipótese, foi avaliado o acúmulo de proteínas virais precoces e tardias, por transferência de “Western”, e a morfogênese viral, por microscopia eletrônica de transmissão, em células carenciadas e infectadas com MOI 10.

Na Figura 10A, observa-se o acúmulo de proteína precoce B13 em todos os tempos de infecção analisados (3 a 36 hpi), tanto para VACV-WR como para o VBH. A proteína precoce/tardia A36 foi detectada entre 12 e 36 h nas células infectadas pelo VACV-WR, e entre 3 e 36 h nas células infectadas pelo VBH. Já

as proteínas tardias A3, H3, A17 e F17 acumularam entre 12 e 36 hpi. Vale ressaltar ainda que as proteínas A3 e A17 foram processadas proteoliticamente, sendo as bandas menores (60 e 21 kDa, respectivamente) equivalentes às formas processadas (CONDIT *et al.*, 2006).

Durante a infecção pelo VACV-WR em presença do SB203580, a cinética de acúmulo das proteínas virais foi semelhante à da infecção realizada na ausência do inibidor, mas o nível de acúmulo foi diferente entre as proteínas analisadas. A proteína H3, seguida das proteínas A17 e F17, foram as mais afetadas pelo SB203580, mas 36 hpi observou-se um decréscimo no nível de acúmulo de todas as proteínas analisadas. Durante a infecção pelo VBH em presença do SB203580, o acúmulo das proteínas virais foi cineticamente semelhante ao da infecção na ausência do inibidor. Os níveis de B13 e A36 no tempo de 3 hpi foram menores nas células tratadas com SB203580, e H3 e, em menor grau, A17, foram as proteínas mais afetadas pelo inibidor. No tempo de 36 hpi, apenas A36, H3 e A17 foram reduzidas em presença do SB203580.

Na Figura 10B, são apresentadas as curvas de crescimento de ciclo único do VACV-WR e do VBH, na ausência e na presença de SB203580. Na ausência de inibidor, VACV-WR e do VBH apresentaram um comportamento bem diferente, com destaque para a acentuada queda da infecciosidade durante a fase “eclipse” do VBH em 3 hpi, quando comparado ao VACV-WR. A partir de 3 hpi já é possível detectar o crescimento do VBH, ao passo que a fase “eclipse” do VACV-WR é mais prolongada e o crescimento viral só é detectado a partir de 6 hpi. Após a análise visual do gráfico, é evidente que, quando analisado o tempo de 48hpi, o efeito do SB203580 é mais acentuado sobre o VBH que sobre o VACV-WR. De fato, o SB203580 acarretou em crescimento 3,5 vezes menor da progênie do VACV-WR, enquanto a progênie do VBH cresceu 10 vezes menos.

O efeito do SB203580 sobre o acúmulo de proteínas do VACV-WR em células HeLa não carenciadas também foi avaliado. Observou-se um efeito semelhante ao verificado nas células A31. Com exceção da proteína tardia H3, cujo acúmulo foi praticamente abolido em presença do SB203580, a cinética de acúmulo das proteínas virais foi semelhante nas células tratadas com DMSO ou SB203580 (Figura 11). O acúmulo da proteína tardia A17 também sofreu uma redução acentuada em presença do inibidor de p38 α/β MAPK (Figura 11). Já a

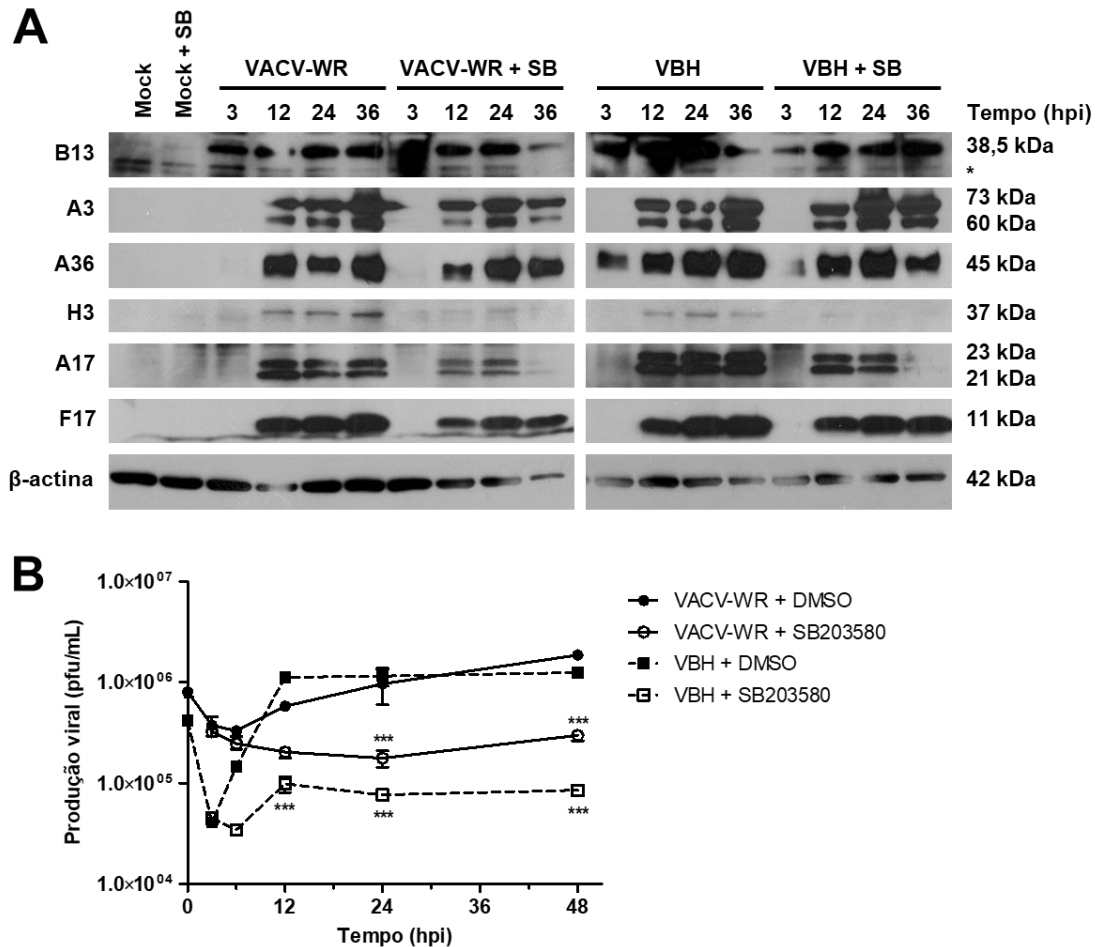


Figura 10. Efeito do inibidor de p38 α / β MAPK SB203580 sobre o acúmulo de proteínas precoces e tardias do *Vaccinia virus* em células A31.

Células A31 carenciadas, pré-tratadas com DMSO 0,2% ou SB203580 20 μ M por 30 min, foram infectadas com VACV-WR ou VBH (MOI 10) em presença de DMSO ou do inibidor SB203580 ao longo de toda a infecção. A, Após os diferentes tempos de infecção, extratos de proteínas totais (10 a 25 μ g) foram submetidos a fracionamento eletroforético seguido de transferência para membrana de nitrocelulose. Após bloqueio de ligações inespecíficas, as membranas foram incubadas com anticorpo primário (diluição 1:1000), seguido de incubação com anticorpo secundário conjugado à peroxidase (diluição 1:3000) e revelação. O controle interno das quantidades de proteínas foi feito pelo uso do anticorpo primário anti- β -actina (diluição 1:3000). As massas moleculares das proteínas são indicadas na direita da figura. O asterisco indica banda inespecífica detectada com o anticorpo anti-CrmA/SPI2/B13. B, Após 1 h de adsorção, o inóculo viral foi removido, as células foram lavadas com PBS, e foi adicionado meio contendo soro a 1% mais DMSO ou SB203580. Após os diferentes tempos de infecção, as células mais o meio de cultura foram congelados e descongelados por três vezes, e titulados em células BSC-40.

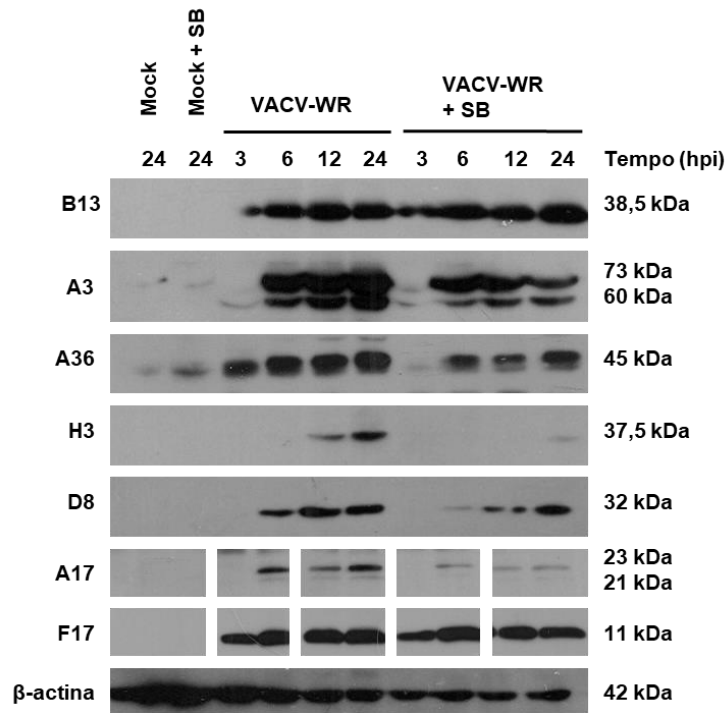


Figura 11. O inibidor de p38 α / β MAPK SB203580 afeta o acúmulo de proteínas do *Vaccinia virus* em células HeLa.

Células HeLa não carenciadas, pré-tratadas com DMSO 0,2% ou SB203580 20 μ M por 30 min, foram infectadas com VACV-WR ou VBH (MOI 10) em presença de DMSO ou do inibidor SB203580 ao longo de toda a infecção. Após os diferentes tempos de infecção, extratos de proteínas totais (10 a 25 μ g) foram submetidos a fracionamento eletroforético seguido de transferência para membrana de nitrocelulose. Após bloqueio de ligações inespecíficas, as membranas foram incubadas com anticorpo primário (diluição 1:1000), seguido de incubação com anticorpo secundário conjugado à peroxidase (diluição 1:3000) e revelação. O controle interno das quantidades de proteínas foi feito pelo uso do anticorpo primário anti- β -actina (diluição 1:3000). As massas moleculares das proteínas são indicadas na direita da figura.

proteína precoce B13 e a proteína tardia F17 não foram afetadas pela presença do SB203580, e as proteínas A3 (tardia) e A36 (precoce/tardia) apresentaram uma sensível redução no seu acúmulo (Figura 11). Por último, o SB203580 levou a um atraso no acúmulo da proteína tardia D8 (Figura 11).

Em seguida, o efeito do SB203580 sobre a morfogênese de ambas as amostras de VACV em células A31 foi investigado por microscopia eletrônica de transmissão. Após 24 h de infecção, tanto na ausência como na presença de SB203580, todas as estruturas características da morfogênese dos poxvírus foram detectadas, a saber, virossomos, crescentes, vírions imaturos sem e com nucleoide (IV) e vírions maduros (MV) (Figura 12A-D). Vírions empacotados (WV) e vírions envelopados (EV) também foram encontrados (Figura 12 e dados não mostrados). Após a quantificação dessas estruturas, observou-se uma redução de 60% no número de MVs nas células infectadas com o VBH em presença do SB203580 (Figura 12E).

O tratamento das células A31 com o inibidor SB203580 induziu uma extensa vacuolização das células, independentemente da infecção pelo VACV-WR ou VBH, e isso foi facilmente observável ao microscópio de luz invertido (dados não mostrados). Essa constatação foi corroborada pela análise das micrografias eletrônicas da infecção pelo VACV-WR e do VBH em presença do SB203580 (para a microscopia eletrônica, o controle de células não infectadas não foi incluído). Conforme mostrado na Figura 13A e C é possível observar uma extensa vacuolização do citoplasma das células tratadas com SB203580 e infectadas pelo VACV-WR (Figura 13A) ou pelo VBH (Figura 13C). A vacuolização induzida pelo SB203580 não foi observada nas células HeLa ou BSC40 tratadas com o inibidor (dados não mostrados).

A análise das micrografias das células tratadas com SB203580 e infectadas com VACV-WR ou VBH também revelou a presença de autofagossomos típicos, caracterizados como vesículas delimitadas por membrana dupla (Figura 13B e D) (MIZUSHIMA *et al.*, 2013). Nos autofagossomos mostrados nas Figuras 13B e D é possível identificar estruturas semelhantes a MVs em seu interior. Autofagossomos são encontrados nas células A31 infectadas na ausência de SB203580 também, mas autofagossomos contendo estruturas semelhantes a MVs em seu interior não foram detectados.

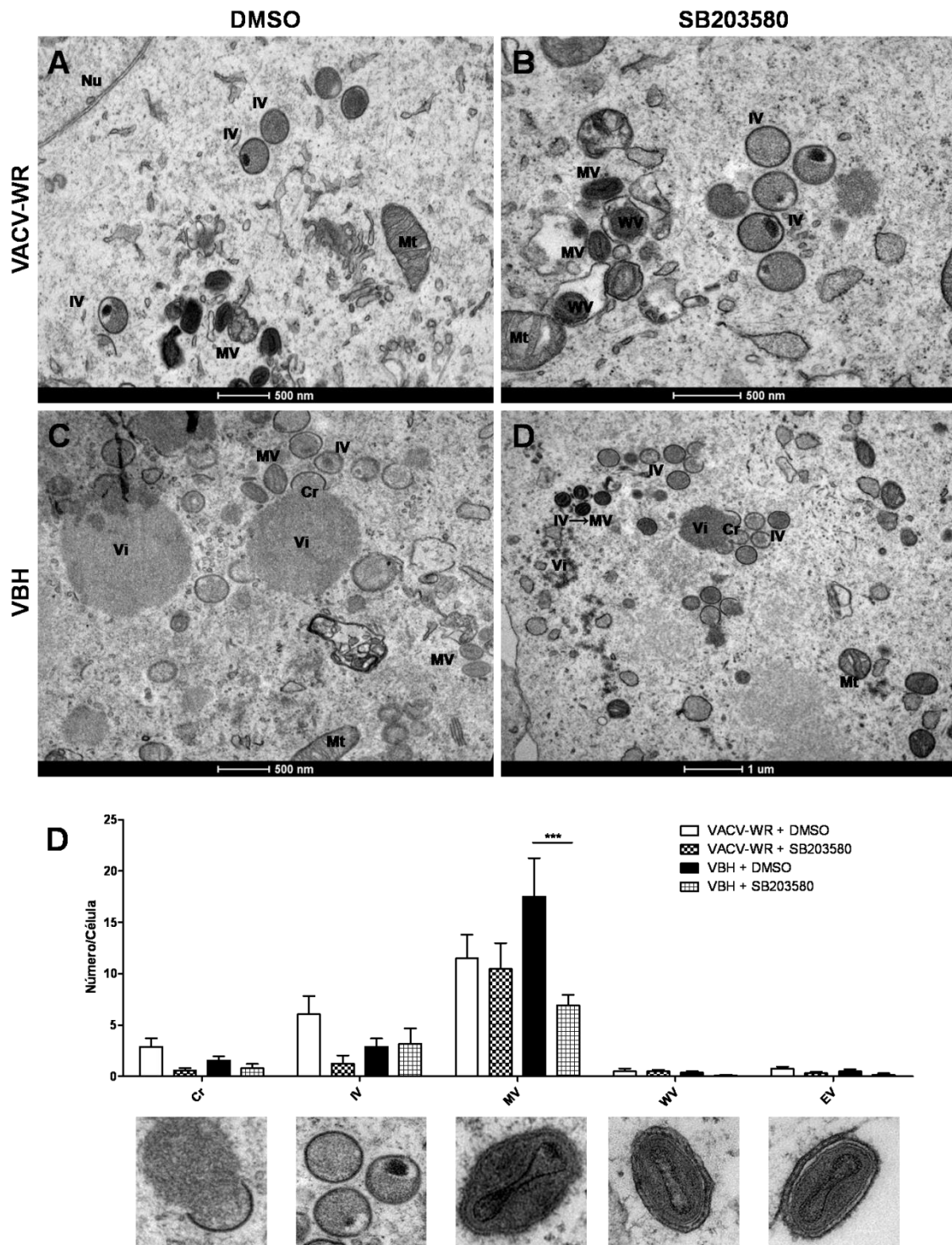


Figura 12. O inibidor de $p38\alpha/\beta$ MAPK SB203580 inibe a morfogênese de vírions maduros do *Vaccinia virus* (VACV) Belo Horizonte, mas não do VACV Western Reserve.

Células A31 carenciadas, pré-tratadas com DMSO 0,2% (A, C) ou SB203580 20 μ M (B, D) por 30 min, foram infectadas com VACV-WR (A, B) ou VBH (C, D) (MOI 10) em presença de DMSO ou do inibidor SB203580 ao longo de toda a

infecção. Após 24 hpi, as células foram lavadas duas vezes em meio sem soro, fixadas com glutaraldeído 1% em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 e processadas para microscopia eletrônica de transmissão. Cr, crescente; IV, vírion imaturo; MV, vírion maduro; IV→MV, intermediários entre IV e MV; WV, vírion empacotado; Mt, mitocôndria; Nu, núcleo; Vi, virossomo. As escalas são de 500 nm (A, B, C) ou 1 µm (D). E, Quantificação dos intermediários da morfogênese do VACV-WR e do VBH na ausência e na presença de SB203580. Os intermediários quantificados estão exemplificados abaixo do gráfico, a saber, Cr, crescente; IV, vírion imaturo; MV, vírion maduro; WV, vírion empacotado; e EV, vírion extracelular. ***, P < 0,001.

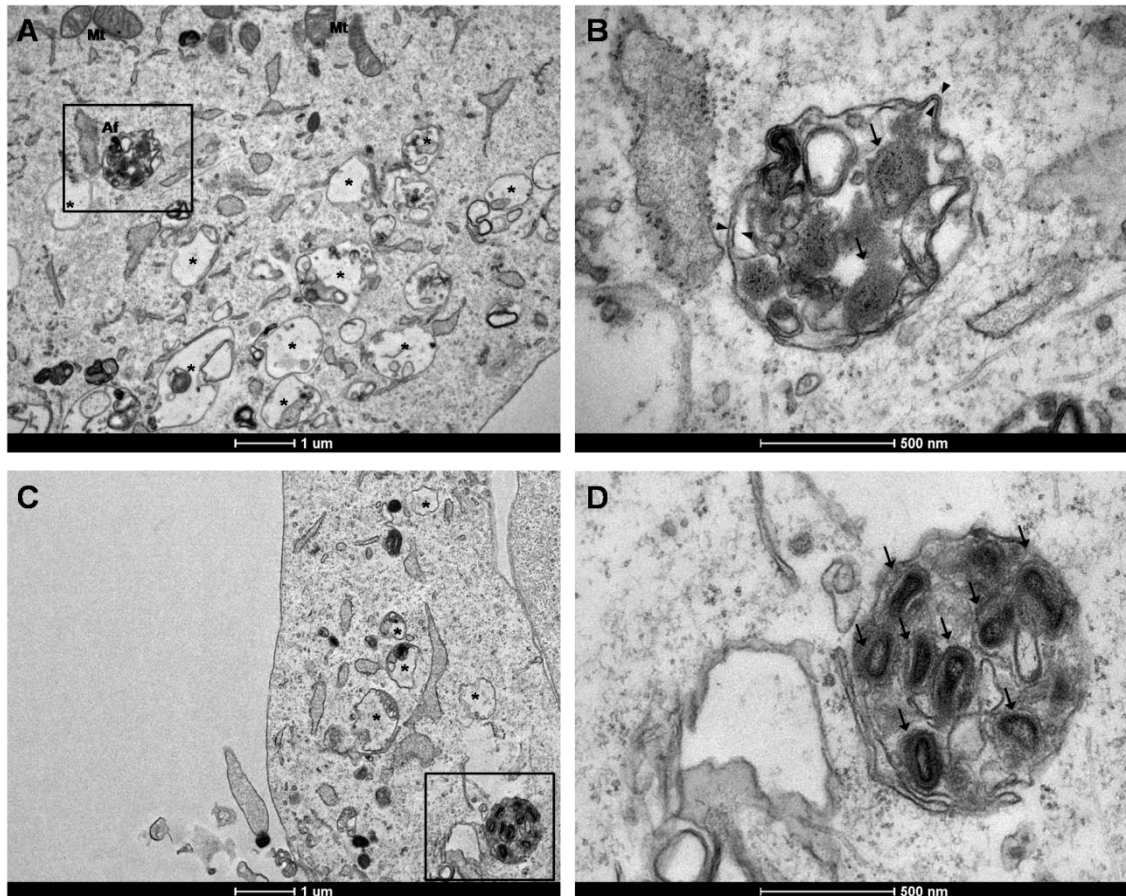


Figura 13. O inibidor de p38 α / β MAPK SB203580 induz extensa vacuolização do citoplasma.

Células A31 carenciadas, pré-tratadas com SB203580 20 μ M por 30 min, foram infectadas com VACV-WR (A) ou VBH (C) (MOI 10) em presença do inibidor SB203580 ao longo de toda a infecção. Após 24 hpi, as células foram lavadas duas vezes em meio sem soro, fixadas com glutaraldeído 1% em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 e processadas para microscopia eletrônica de transmissão. Af, autofagossomo; Mt, mitocôndria. Os asteriscos indicam a extensa vacuolização do citoplasma das células tratadas com SB203580. B e D, Detalhes dos autofagossomos mostrados em A e C, respectivamente, nos quais é possível visualizar estruturas semelhantes a MVs (indicados pelas setas). A membrana dupla característica do autofagossomo é indicada pelas pontas de seta em B.

Outra observação feita a partir da análise das micrografias eletrônicas foi em relação ao empacotamento de MVs. Para dar origem os WVs, os MVs passam por um processo de empacotamento no qual adquirem dois envelopes adicionais derivados dos endossomos precoces ou de vesículas da rede *trans*-Golgi (TGN) (TOOZE *et al.*, 1993; SCHMELZ *et al.*, 1994). O processo de empacotamento teve um aumento nas células infectadas, em presença do inibidor de p38 α / β MAPK (Figura 14A-D). Quando o número de MVs sendo empacotados por célula foi analisado, houve um aumento de aproximadamente duas vezes nas células tratadas com SB203580 e infectadas com VACV-WR, e uma redução pela metade nas células tratadas e infectadas com o VBH (Figura 14D). As duas amostras de VACV também se comportaram diferentemente quando o percentual de MVs em processo de empacotamento foram comparados na ausência e na presença do SB203580, com um aumento de quase quatro vezes para o VACV-WR (aproximadamente, 22,6% nas células tratadas com SB203580 *versus* 5,9% nas células não tratadas), ao passo que não houve variação relevante para o VBH (Figura 14D). Todavia, quando o percentual de MVs em processo de empacotamento foi corrigido pelo número de células em cada amostra, observou-se que a inibição de p38 α / β MAPK acarretou num aumento de aproximadamente três vezes ou duas vezes em células infectadas com VACV-WR ou com VBH, respectivamente (Figura 14E). Em conjunto, essas análises apontaram para um potencial envolvimento de p38 MAPK na regulação negativa do empacotamento de MVs para dar origem aos WVs, que são transportados até a superfície da célula para disseminação como EVs (revisado por SMITH *et al.*, 2002; MOSS, 2006).

3. O *Vaccinia virus* regula temporalmente a ativação das MAPKs ERK, JNK e p38

O efeito diferencial do inibidor de p38 α / β SB203580 sobre a multiplicação do VACV-WR e do VBH trouxe o interesse de investigar o status da via sinalizadora de p38 MAPK ao longo da infecção por essas amostras de VACV. A forma ativa de p38 MAPK, duplamente fosforilada nos resíduos de Thr180 e Tyr182, foi detectada a partir de 6 hpi e se manteve ativa até 36 hpi, com o pico em 12 hpi, durante a infecção de células A31 carenciadas pelo VACV-WR

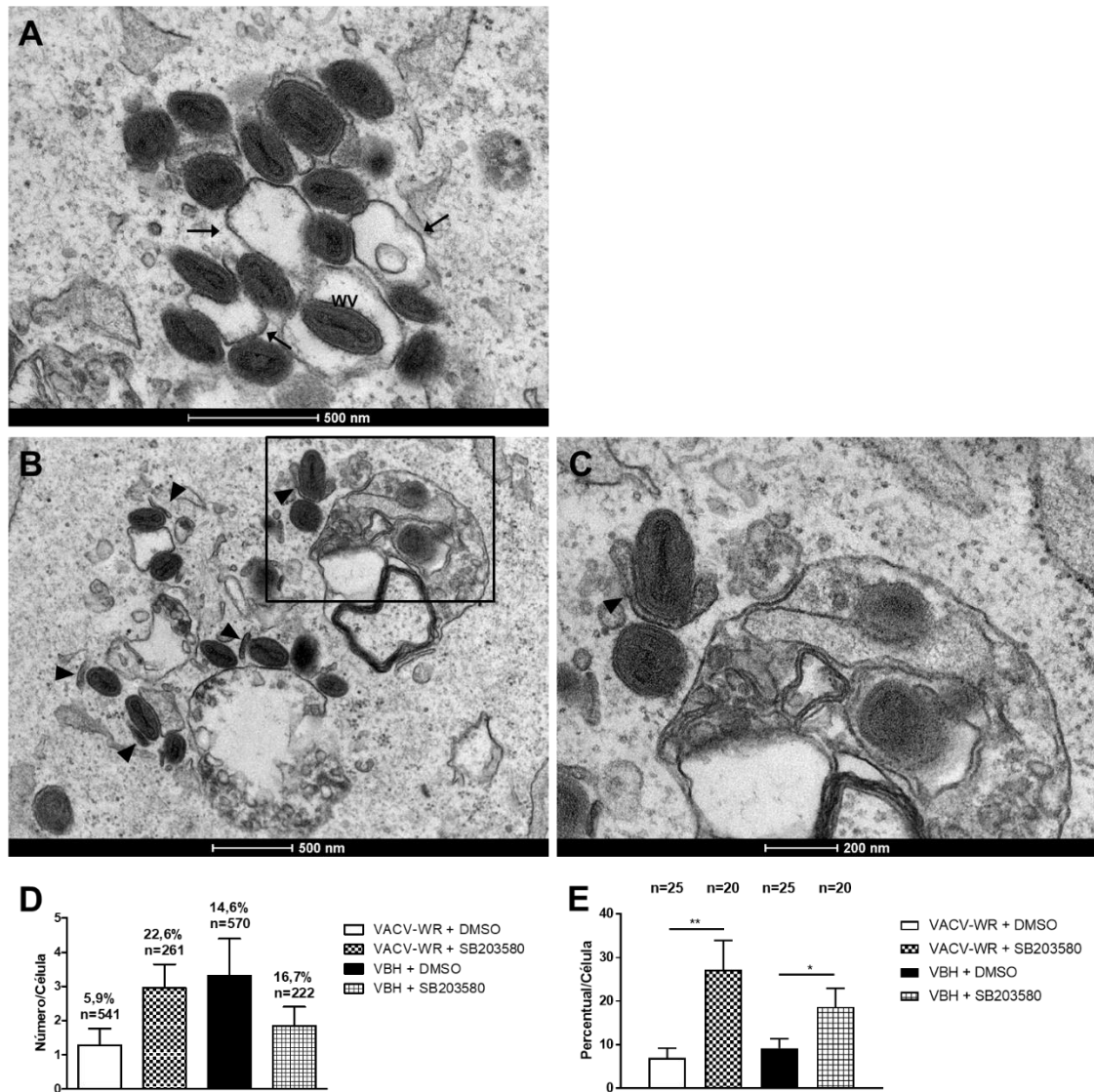


Figura 14. O inibidor de p38 α / β MAPK SB203580 afeta o empacotamento de vírions maduros.

Células A31 carenciadas, pré-tratadas com SB203580 20 μ M por 30 min, foram infectadas com VACV-WR (A, B) ou VBH (dados não mostrados) (MOI 10) em presença do inibidor SB203580 ao longo de toda a infecção. Após 24 hpi, as células foram lavadas duas vezes em meio sem soro, fixadas com glutaraldeído 1% em tampão fosfato 0,1 M pH 7,4 e processadas para microscopia eletrônica de transmissão. A, As setas indicam o empacotamento de MVs por vesículas semelhantes a endossomos; WV, vírion empacotado. B, As pontas de seta indicam o empacotamento de MVs por vesículas semelhantes a fagóforos ou membranas de isolamento. C, Detalhe do empacotamento de MV mostrado em B. D, Quantificação de MVs em processo de empacotamento nas células infectadas pelo VACV-WR ou VBH, na ausência e na presença de SB203580. Acima de cada coluna são indicados o percentual de MVs em processo de empacotamento e o número total de MVs contados em cada uma das amostras. E, Percentual de MVs em processo de empacotamento. Acima de cada coluna são indicados o número de células avaliadas em cada uma das amostras. *, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$

(Figura 15). Já nas células infectadas pelo VBH, observou-se p38 fosforilada a partir de 6 hpi, com o pico em 12 hpi (Figura 15). Entretanto, quando células não infectadas e infectadas foram comparadas, não foi detectada alteração relevante no nível de fosforilação de MKK3/6 (Ser189 e Ser207, respectivamente), MAP2Ks altamente específicas de p38 MAPK e que mais comumente fosforilam p38 MAPK em resposta a diferentes estímulos (CUADRADO; NEBREDA, 2010).

Para avaliar a localização subcelular de p38 MAPK ativa durante a infecção viral, foi realizada a separação das proteínas celulares em frações citoplasmática e nuclear. Conforme mostrado na Figura 16, todo o conteúdo de p38 MAPK ativo durante a infecção pelo VACV-WR ou pelo VBH ficou restrito ao compartimento citoplasmático, ao passo que p38 MAPK ativada em resposta ao tratamento com anisomicina foi detectado nos compartimentos citoplasmático e nuclear.

As infecções de células carenciadas pelo VACV-WR e pelo VBH também levaram à ativação das MAPKs ERK1/2 (fosforilação nos resíduos de Thr202/Tyr204 e Thr185/Tyr187, respectivamente) e JNK1/2 (fosforilação nos resíduos de Thr183/Tyr185). As MAPKs ERK1/2 foram fosforiladas entre 1 hpi e 12 hpi, durante a infecção pelo VACV-WR ou pelo VBH, mas sofreram uma redução nos níveis de fosforilação em 24 e 36 hpi (Figura 15). Em relação a JNK1/2, a fosforilação da forma p46 ocorreu ao longo de todo o ciclo de infecção do VBH, ao passo que durante a infecção pelo VACV-WR, houve aumento nos níveis de fosforilação a partir de 6 hpi (Figura 15). Entre 6 e 36 hpi, a fosforilação de JNK1/2 é comparável entre o VACV-WR e VBH, mas em 1 e 3 hpi, a infecção pelo VBH induziu níveis elevados de fosforilação desta MAPK, os mesmos não sendo observados durante a infecção pelo VACV-WR.

4. Ativação das MAPKs ERK, JNK e p38 durante a infecção pelo *Vaccinia virus* na presença do inibidor de p38 α / β MAPK SB203580

A fim de verificar se o tratamento com o inibidor de p38 α / β MAPK SB203580 afetaria a ativação das MAPKs durante a infecção pelo VACV, o status da fosforilação de ERK1/2, JNK1/2 e p38 MAPK foi avaliado. Células A31 carenciadas e tratadas com SB203580 apresentaram uma profunda alteração nos níveis de fosforilação das três MAPKs em diferentes tempos após a infecção

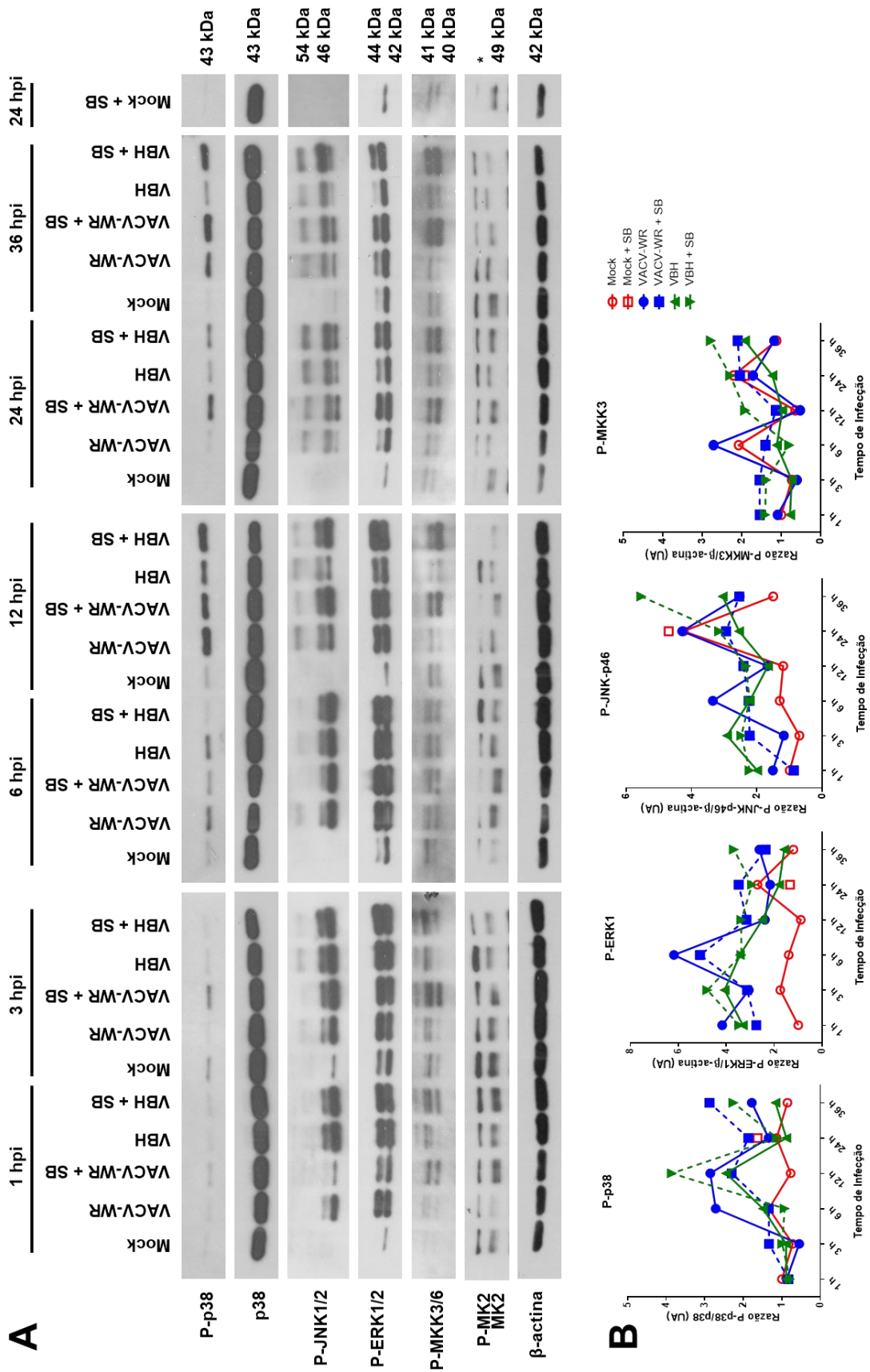


Figura 15. *Vaccinia virus* Western Reserve e Belo Horizonte disparam a ativação de p38 MAPK em células A31.

A, Células A31 carenciadas, pré-tratadas com DMSO 0,2% ou SB203580 20 μ M por 30 min, foram infectadas com VACV-WR ou VBH (MOI 10) em presença de DMSO ou do inibidor SB203580 ao longo de toda a infecção. Após os diferentes tempos de infecção, extratos de proteínas totais (50 μ g) foram submetidos a fracionamento eletroforético seguido de transferência para membrana de PVDF. Após bloqueio de ligações inespecíficas, as membranas foram incubadas com anticorpo primário (diluição 1:1000), seguido de incubação com anticorpo secundário conjugado à peroxidase (diluição 1:3000) e revelação. O controle interno das quantidades de proteínas foi feito pelo uso do anticorpo primário anti- β -actina (diluição 1:3000). As massas moleculares das proteínas são indicadas na direita da figura. O asterisco indica banda inespecífica detectada com o anticorpo anti-fosfo-MK2 (Thr334). B, Análise densitométrica das bandas relativas à P-p38 (em relação a p38), P-ERK1 (em relação a β -actina), P-JNK-p46 (em relação a β -actina) e P-MKK3 (em relação a β -actina).

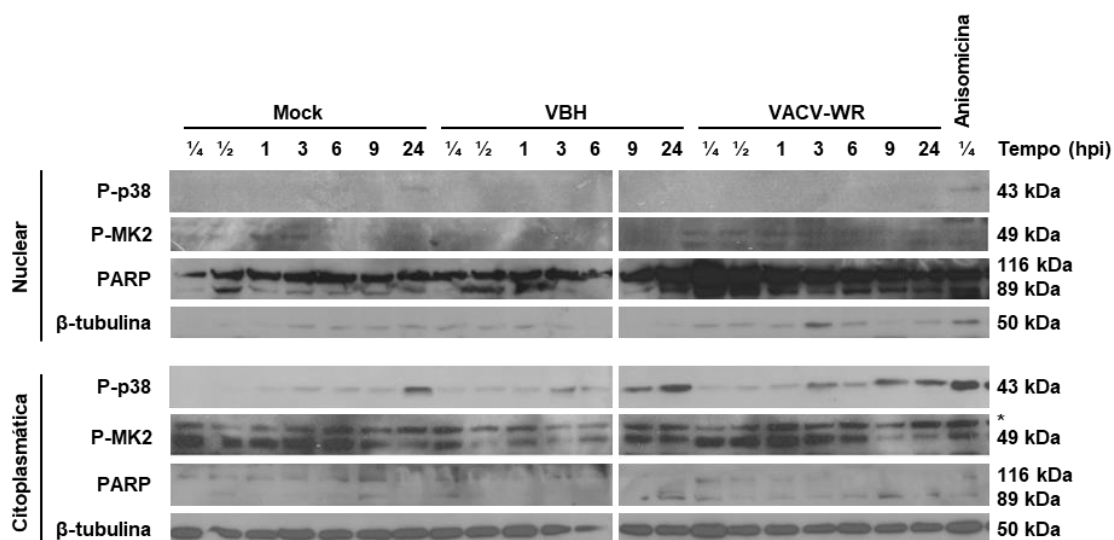


Figura 16. p38 MAPK e seu substrato MK2 localizam-se no compartimento citoplasmático das células infectadas pelo *Vaccinia virus*.

Células A31 carenciadas, pré-tratadas com DMSO 0,2% ou SB203580 20 μ M por 30 min, foram infectadas com VACV-WR ou VBH (MOI 10) em presença de DMSO ou do inibidor SB203580 ao longo de toda a infecção. Após os diferentes tempos de infecção, extratos de proteínas citoplasmáticas ou nucleares (50 μ g) foram submetidos a fracionamento eletroforético seguido de transferência para membrana de nitrocelulose. Após bloqueio de ligações inespecíficas, as membranas foram incubadas com anticorpo primário (diluição 1:1000), seguido de incubação com anticorpo secundário conjugado à peroxidase (diluição 1:3000) e revelação. O controle interno do fracionamento celular foi feito pelo uso dos anticorpos primários anti- β -tubulina (diluição 1:1000), para a fração citoplasmática, e anti-PARP (diluição 1:1000), para a fração nuclear. As massas moleculares das proteínas são indicadas na direita da figura. O asterisco indica banda inespecífica detectada com o anticorpo anti-fosfo-MK2 (Thr334).

pelo VACV-WR e pelo VBH (Figura 15).

Durante a infecção pelo VACV-WR ou VBH, em presença de SB203580, a ativação de p38 MAPK também foi inibida em 6 e 12 hpi, ou 6 hpi, respectivamente (Figura 15). Contudo, entre os tempos de 24 hpi e 36 hpi ou 12 e 36 hpi, respectivamente, houve um aumento da fosforilação de p38 MAPK durante a infecção pelo VACV-WR ou VBH em presença de SB203580 (Figura 15).

Em relação à MAPK JNK1/2, o tratamento com SB203580 teve um efeito dual durante a infecção pelo VBH: houve redução da fosforilação de JNK1/2 em 1 e 3 hpi, e aumento na fosforilação desta MAPK entre 6 e 36 hpi (Figura 15). Durante a infecção pelo VACV-WR, observou-se apenas um aumento na ativação de JNK1/2, na presença de SB203580, entre 3 e 24 hpi (Figura 15). Já em relação à ERK1/2, entre 6 e 24 hpi (para o VACV-WR) ou em 3 e 12 hpi (para o VBH), a inibição farmacológica de p38 α / β MAPK promoveu um aumento na ativação da MAPK ERK1/2 (Figura 15). A fosforilação de MKK3/6 também aumentou durante a infecção pelo VACV-WR ou VBH em presença do SB203580, principalmente entre 12 e 36 hpi (Figura 15).

5. Ativação de MK2 durante a infecção pelo *Vaccinia virus*

Paralelamente à ativação de p38 MAPK, a fosforilação de MK2 também ocorreu durante a infecção tanto pelo VACV-WR quanto pelo VBH, a partir de 6 hpi até 36 hpi (Figura 15). A fosforilação de MK2 foi visualizada pela verificação de retardo na mobilidade eletroforética da proteína, através do uso de anticorpo policlonal de coelho direcionado para a detecção de MK2 fosforilada na Thr334 (CELL SIGNALING TECHNOLOGY, 2013). A fosforilação de MK2 durante as infecções pelo VACV-WR ou VBH foi sensível ao SB203580, indicando que p38 α / β MAPK sejam as cinases responsáveis pela fosforilação (Figura 15). Ao contrário do SB203580, o tratamento com o inibidor de JNK VIII não alterou o retardo na mobilidade de MK2 durante a infecção viral (Figura 17).

Assim como aconteceu com p38 MAPK fosforilada, MK2 fosforilada durante as infecções pelo VACV-WR ou VBH foi encontrada apenas no compartimento citoplasmático (Figura 16).

A seguir foi avaliado se a fosforilação de MK2 seria dependente da infecção viral ativa e da replicação de DNA viral. Após as infecções com VACV-WR ou VBH inativados com radiação UV por 5 min, não foi detectada a fosforilação de MK2 24 hpi (Figura 17). Já a presença de arabinosídeo C, um inibidor da replicação de DNA viral, não alterou a fosforilação de MK2 durante a infecção tanto pelo VACV-WR quanto pelo VBH 24hpi (Figura 17).

A fim de verificar se a ativação da via p38-MK2 ocorreria em outra linhagem celular durante a infecção viral, células HeLa foram infectadas com VACV-WR e o status da fosforilação de p38 MAPK e MK2 foi analisado. Como pode ser observado na Figura 18, os níveis de fosforilação de p38 e MK2 foram elevados entre 6 e 24 hpi, com o pico de p38 MAPK ativa em 12 hpi. A ativação de MK2 durante a infecção de células HeLa, assim como nas células A31, foi dependente de p38 MAPK e da replicação viral ativa, mas independente da replicação do DNA viral (dados não mostrados).

6. O inibidor de p38 α / β SB203580 inibe a disseminação do *Vaccinia virus*

Sabendo que o efeito do SB203580 sobre a multiplicação viral em células carenciadas era menor para o VACV-WR do que para o VBH, a seguir se investigou impacto desse inibidor de p38 α / β sobre a disseminação do VACV-WR, através da análise do fenótipo de placa de lise viral e da curva de crescimento viral em ciclos múltiplos (MOI 0,001) em células A31, BSC40 e HeLa. Conforme mostrado na Figura 19A), o SB203580 aboliu completamente a formação da placa de lise do VACV-WR em células A31, mesmo após 72 hpi, e reduziu consideravelmente o fenótipo de placa em células BSC-40.

A fim de assegurar que as placas de lise não estavam se formando na presença do SB203580 por que a infecção pelo VACV-WR não estava ocorrendo, as células A31 foram infectadas com VACV- Δ TK-GFP, na ausência e na presença do SB203580. O VACV- Δ TK-GFP expressa a proteína GFP sob o controle do promotor precoce do gene da timidina cinase viral (TK), permitindo a análise das células infectadas pelo VACV ao microscópio de fluorescência (P. Turner e R. Moyer, comunicação pessoal). Após 48 h de infecção, as placas de lise do VACV- Δ TK-GFP repletas de células expressando GFP foram facilmente

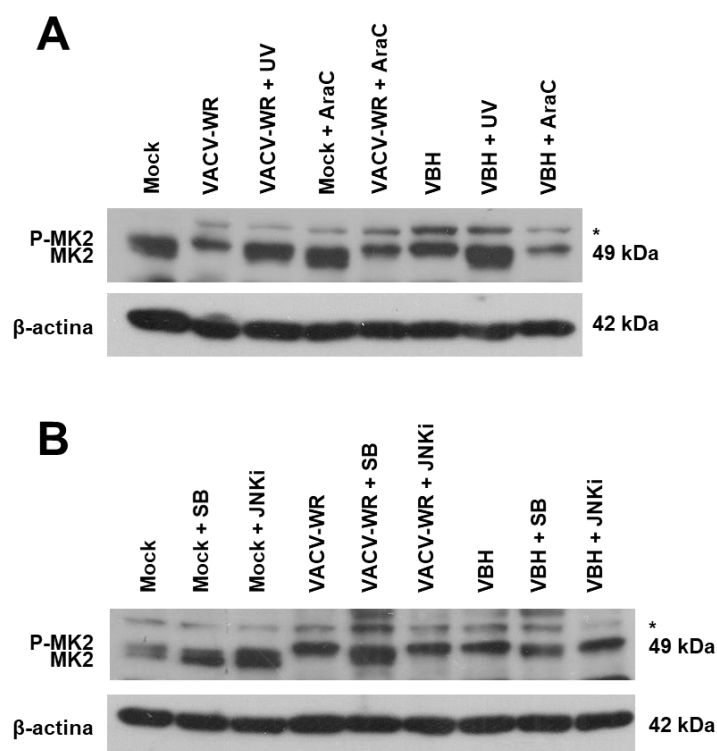


Figura 17. A ativação da via p38-MK2 durante a infecção pelo *Vaccinia virus* é disparada por um sinal pré-replicativo.

A, Células A31 carenciadas, pré-tratadas com DMSO 0,2% ou arabinosídeo C (AraC) por 30 min, foram infectadas com VACV-WR ou VBH (MOI 10) em presença de DMSO ou do AraC ao longo de toda a infecção. As mesmas quantidades de VACV-WR ou VBH previamente inativados com radiação UV também foram utilizadas. B, Células A31 carenciadas, pré-tratadas com DMSO 0,2%, SB203580 20 μ M ou inibidor de JNK VIII 4 μ M por 30 min, foram infectadas com VACV-WR ou VBH (MOI 10) em presença de DMSO ou dos inibidores ao longo de toda a infecção. Após 24 hpi, extratos de proteínas totais (50 μ g) foram submetidos a fracionamento eletroforético seguido de transferência para membrana de PVDF. Após bloqueio de ligações inespecíficas, as membranas foram incubadas com anticorpo primário (diluição 1:1000), seguido de incubação com anticorpo secundário conjugado à peroxidase (diluição 1:3000) e revelação. O controle interno das quantidades de proteínas foi feito pelo uso do anticorpo primário anti- β -actina (diluição 1:3000). As massas moleculares das proteínas são indicadas na direita da figura. O asterisco indica banda inespecífica detectada com o anticorpo anti-fosfo-MK2 (Thr334).

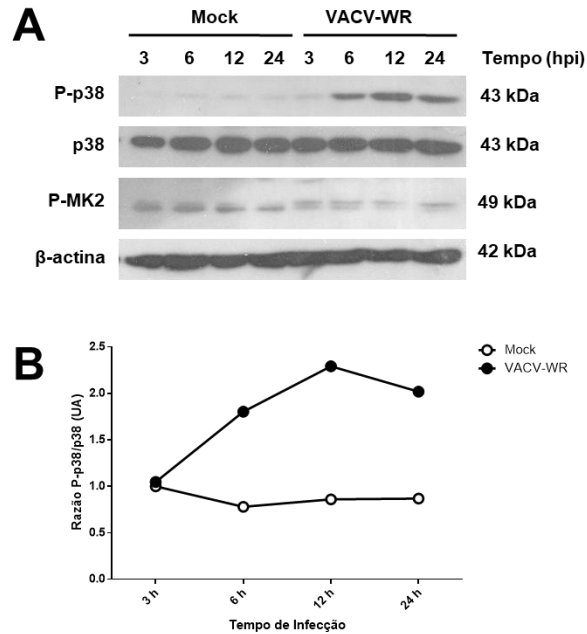


Figura 18. *Vaccinia virus* dispara a ativação de p38 MAPK e MK2 em células HeLa.

A, Células HeLa não carenciadas foram infectadas com VACV-WR (MOI 10) por diferentes tempos. Extratos de proteínas totais (50 μ g) foram submetidos a fracionamento eletroforético seguido de transferência para membrana de PVDF. Após bloqueio de ligações inespecíficas, as membranas foram incubadas com anticorpo primário (diluição 1:1000), seguido de incubação com anticorpo secundário conjugado à peroxidase (diluição 1:3000) e revelação. O controle interno das quantidades de proteínas foi feito pelo uso do anticorpo primário anti- β -actina (diluição 1:3000). As massas moleculares das proteínas são indicadas na direita da figura. B, Análise densitométrica das bandas relativas à P-p38 (em relação à p38).

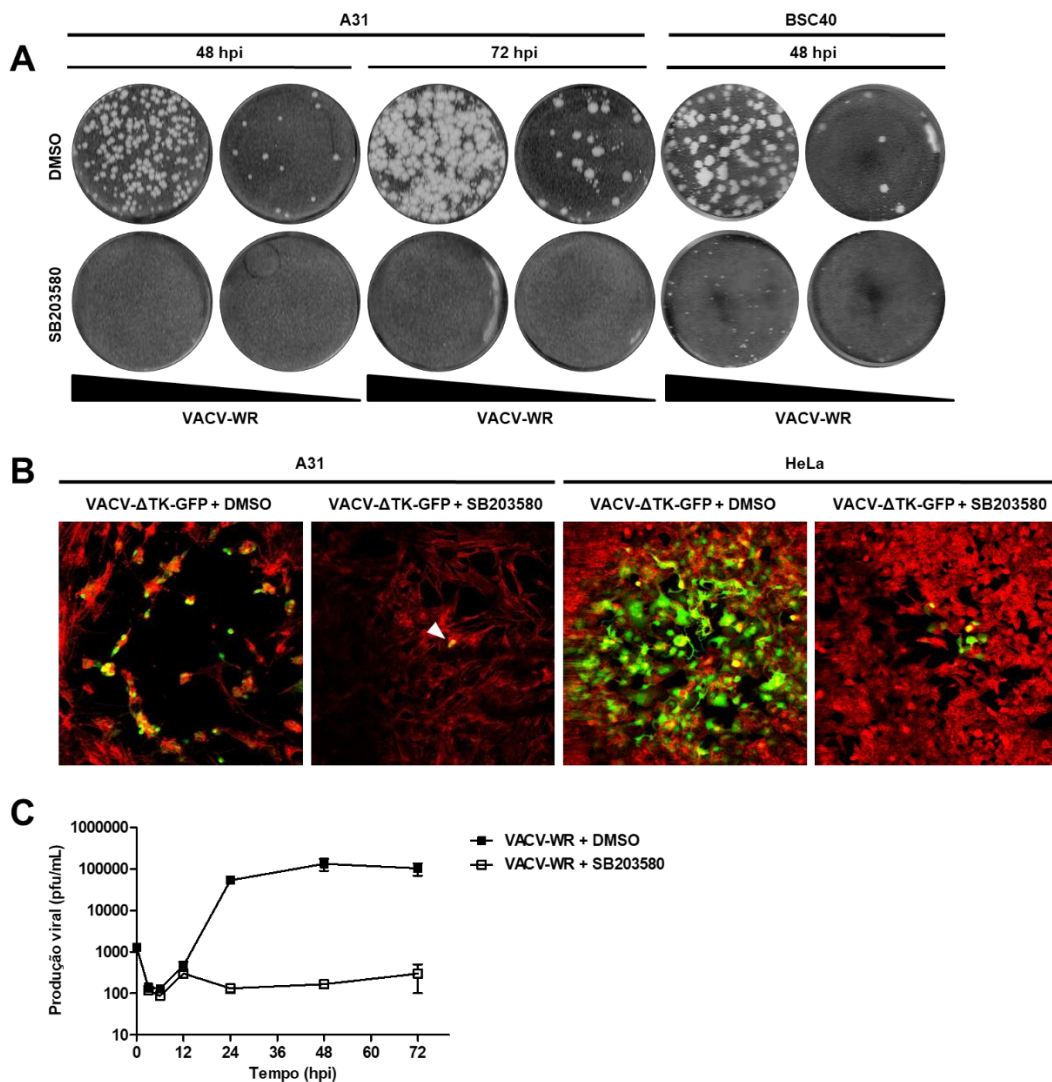


Figura 19. O inibidor de p38 α / β MAPK SB203580 inibe a disseminação do *Vaccinia virus*.

Células A31 (A, B), BSC-40 (A) ou HeLa (B) carenciadas, pré-tratadas com DMSO 0,2% ou SB203580 20 μ M por 30 min, foram infectadas com diluições decimais consecutivas de VACV-WR (A) ou VACV- Δ TK-GFP (B) em presença de DMSO ou do inibidor SB203580 ao longo de toda a infecção. A, Após 48 hpi ou 72 hpi, as células foram fixadas com formaldeído 3,7% e coradas com cristal violeta, para visualização das placas de lise viral. B, Após 48 hpi, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% em PBS, permeabilizadas com Triton-X100 0,2%, tratadas para bloqueio de ligações inespecíficas, coradas com faloidina conjugada a rodamina e montadas para observação ao microscópio confocal a laser. A ponta de seta branca indica uma célula infectada. C, Células A31 carenciadas, pré-tratadas com DMSO 0,2% ou SB203580 20 μ M por 30 min, foram infectadas com VACV-WR (MOI 0,001) em presença de DMSO ou do inibidor SB203580 ao longo de toda a infecção. Após 1 h de adsorção, o inóculo viral foi removido, as células foram lavadas com PBS, e foi adicionado meio contendo soro a 1% mais DMSO ou SB203580. Após os diferentes tempos de infecção, as células mais o meio de cultura foram congelados e descongelados por três vezes, e titulados em células BSC-40.

visualizadas (Figura 19B). Já na presença do SB203580, células infectadas isoladas expressando GFP foram detectadas ao longo da monocamada celular que permaneceu não infectada em sua maioria. Isso é um forte indício que o SB203580 impediu que progênie do VACV- Δ TK-GFP se disseminasse a partir da infecção primária em direção às células vizinhas não infectadas. Como controle, uma infecção com MOI 10 na ausência e na presença do SB203580 foi feita para verificar o efeito do inibidor sobre a multiplicação do VACV- Δ TK-GFP. O SB203580 inibiu a multiplicação do VACV- Δ TK-GFP em 65%. Células HeLa infectadas com VACV- Δ TK-GFP também mostraram uma redução conspícua na disseminação da infecção pela monocamada de células em presença do inibidor de p38 α / β MAPK (Figura 19B).

E, por último, a infecção de células A31 pelo VACV-WR com MOI 0,001 foi conduzida na ausência e na presença do SB203580. Conforme apresentado na Figura 19C, a curva de crescimento do VACV-WR apresentou o mesmo perfil até 12hpi, indicando que a infecção viral progrediu sem problemas até esse tempo, mesmo em presença do SB203580. Entretanto, a partir de 12 hpi, em presença do SB203580, o VACV-WR não apresentou nenhum acréscimo na sua progênie, acarretando numa inibição de quase 99,9% em relação à infecção na ausência do inibidor (Figura 19C). Esse resultado corroborou o resultado obtido com o VACV- Δ TK-GFP indicando o SB203580 impediu que progênie do VACV se disseminasse a partir da infecção primária em direção às células vizinhas não infectadas.

7. Efeito do silenciamento de p38 α MAPK sobre o ciclo de vida do *Vaccinia virus*

Para verificar se as ações do SB203580 sobre o VACV-WR e o VBH eram devidas à inibição específica sobre p38 MAPK, foram geradas linhagens celulares, a partir das células A31, expressando shRNA de p38 α MAPK ou de GFP, para o silenciamento da expressão de p38 α MAPK ou de GFP como controle, respectivamente. A caracterização dos clones de células expressando shRNA foi feita através de RT-PCR quantitativo para a quantificação relativa dos níveis de mRNA de p38 α MAPK/*Mapk14*, p38 β MAPK/*Mapk11*, e β -actina, como gene normalizador.

Na Figura 20A, é mostrado que os clones de células shRNA-GFP apresentaram níveis de mRNA de p38 α MAPK e de p38 β MAPK comparáveis aos das células A31. Já os clones de células shRNA-p38 α #1 e shRNA-p38 α #2 apresentaram uma grande redução dos níveis de mRNA de p38 α MAPK, de 79% a 100% (o que significa que o mRNA de p38 α MAPK foi indetectável). Em relação à p38 β MAPK, houve um aumento considerável dos níveis do mRNA em alguns clones de células shRNA-p38 α #1 (cl. 11 e cl. 14) e shRNA-p38 α #2 (cl. 1), e redução dos níveis do mRNA noutros (shRNA-p38 α #1 pool, e shRNA-p38 α #2 pool e cl. 10). Como os desvios-padrão obtidos foram muito grandes nesse experimento, e a eficiência da reação de PCR quantitativo para os três alvos (p38 α MAPK, p38 β MAPK, e β -actina) foi baixa (~60%) não foi possível afirmar se essas alterações têm relevância biológica.

Quando foi realizada infecção das células expressando shRNA carenciadas pelo VACV-WR ou pelo VBH com MOI 10, houve uma grande variação na taxa de multiplicação do VACV entre os diferentes clones de cada shRNA (Figura 20B).

Em nenhum dos clones testados foi observado o mesmo grau de inibição da multiplicação do VACV-WR ou do VBH em presença do SB203580 (nesse experimento, 81% e 91%, respectivamente) (Figura 20B). Entretanto, uma avaliação dos clones em conjunto nos leva à constatação de que o silenciamento de p38 α MAPK reduziu pela metade a multiplicação do VACV-WR (comparar shRNA-GFP cl. 1, cl. 2 e pool com shRNA-p38 α MAPK #1 e #2). Quanto à multiplicação do VBH, houve ainda maior variação entre os clones de cada shRNA, o que indica que o silenciamento de p38 α MAPK não afeta significativamente a multiplicação dessa amostra de VACV.

A seguir, o fenótipo de placa do VACV-WR foi avaliado nos clones de shRNA-GFP, shRNA-p38 α MAPK #1 e shRNA-p38 α MAPK #2, mantidos em baixa concentração de soro (Figura 21). Novamente, foi observado uma grande variação entre os clones de cada shRNA. Com exceção do shRNA-p38 α MAPK #1 cl. 11, todos os demais clones apresentaram placas de lise reduzidas quando comparados às células A31 parentais. Apesar da variabilidade dentro os clones, o silenciamento de p38 α MAPK não afetou a formação da placa de lise do VACV-

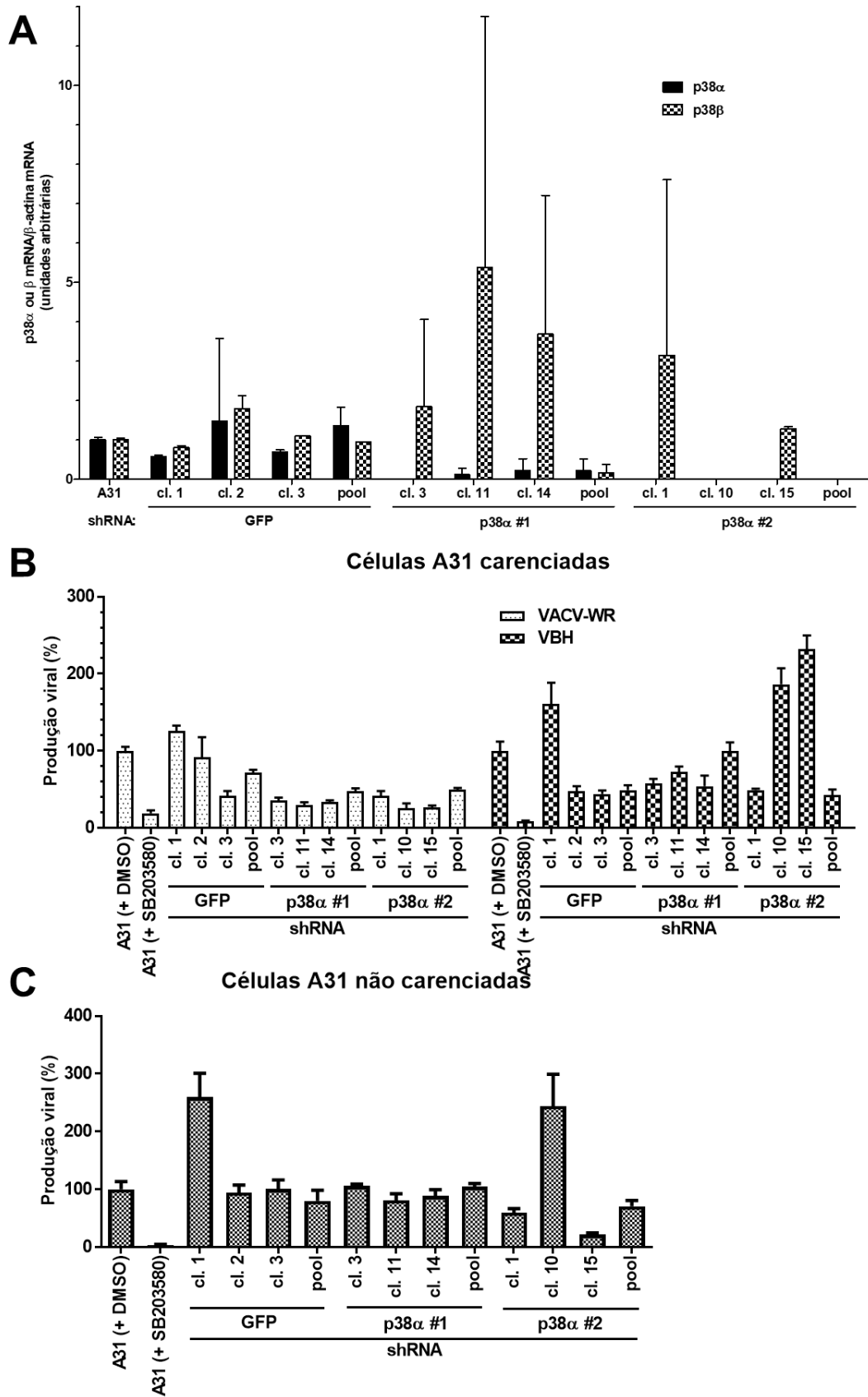


Figura 20. Efeito do silenciamento de p38 α MAPK por shRNA sobre a multiplicação do *Vaccinia virus* Western Reserve e Belo Horizonte.

A, RNA total de células A31 expressando shRNA de p38 α MAPK ou de GFP foi submetido a tratamento com DNase I, transcrição reversa e PCR quantitativo para detecção do mRNA de p38 α MAPK, p38 β MAPK e β -actina. O mRNA de β -actina foi utilizado como controle endógeno e os níveis de mRNA de p38 α MAPK e p38 β MAPK nos clones expressando shRNA foi normalizado em relação aos níveis presentes nas células A31 parentais, aos quais foi atribuído o valor 1. B, Clones de células shRNA-GFP, shRNA-p38 α #1 e shRNA-p38 α #2 carenciados foram infectados com VACV-WR ou VBH (MOI 10). Após 1 h de adsorção, o inóculo viral foi removido, as células foram lavadas com PBS, e foi adicionado meio contendo soro a 1%. Após 48 h, as células mais o meio de cultura foram congelados e descongelados por três vezes, e titulados em células BSC-40. C, Clones de células shRNA-GFP, shRNA-p38 α #1 e shRNA-p38 α #2 não carenciadas foram infectadas com VACV-WR (MOI 10). Após 1 h de adsorção, o inóculo viral foi removido, as células foram lavadas com PBS, e foi adicionado meio contendo soro a 1%. Após 48 h, as células mais o meio de cultura foram congelados e descongelados por três vezes, e titulados em células BSC-40. Células A31 parentais tratadas com DMSO 0,2% ou SB203580 20 μ M foram utilizadas como controle da multiplicação. Os gráficos B e C mostram o percentual de multiplicação viral em relação às células A31, às quais foi atribuído o valor de 100%.

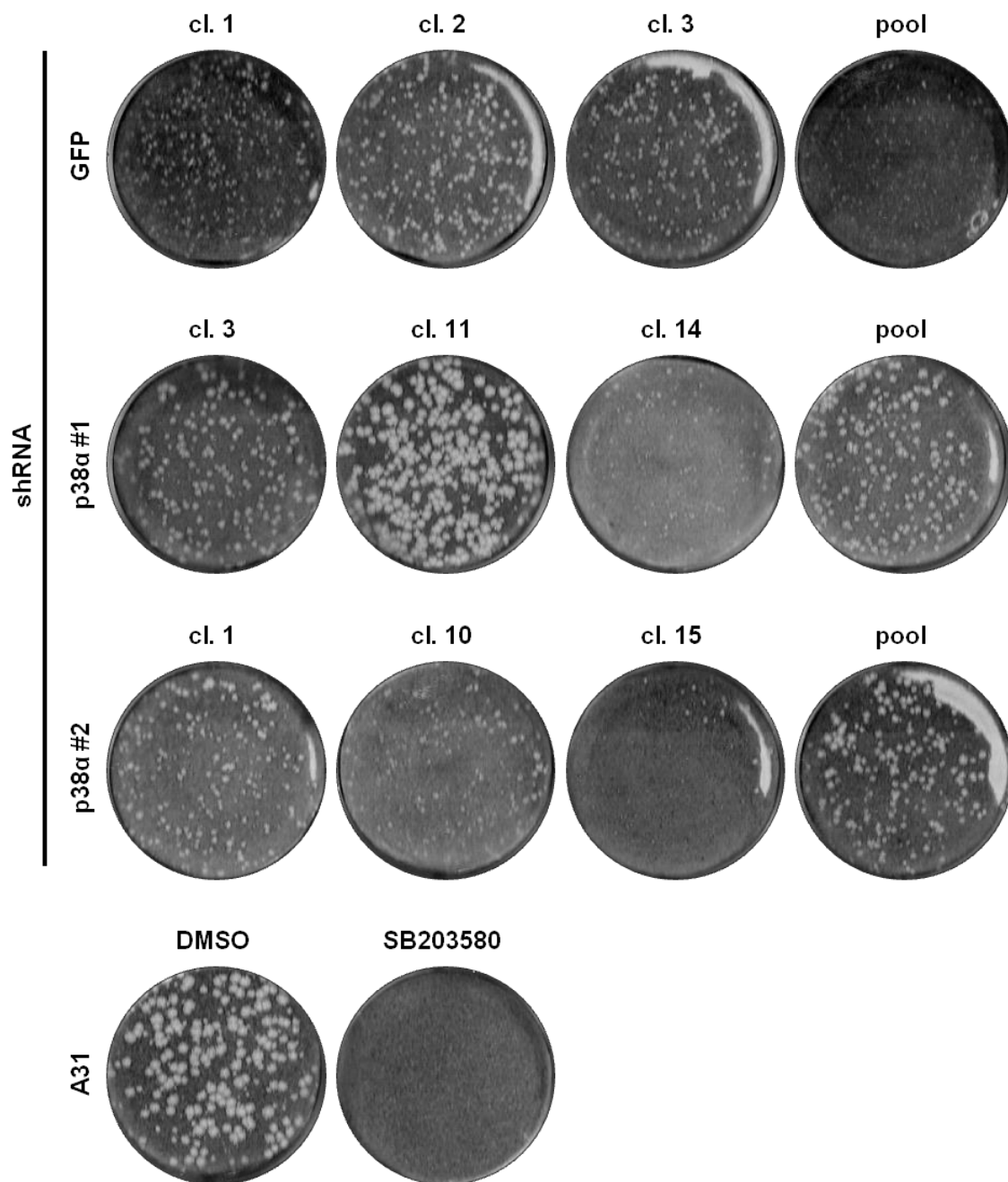


Figura 21. Efeito do silenciamento de p38 α MAPK por shRNA na formação das placas de lise do *Vaccinia virus*.

Clones de células shRNA-GFP, shRNA-p38 α #1 e shRNA-p38 α #2 carenciadas foram infectadas com diluição seriada decimal de VACV-WR. Após 1 h de adsorção, foi adicionado meio contendo soro a 1%. Após 48 h, as células foram fixadas com formaldeído 3,7% e coradas com cristal violeta, para a visualização das placas de lise. Células A31 parentais tratadas com DMSO 0,2% ou SB203580 20 μ M foram utilizadas como controle.

WR da mesma forma que o SB203580, sugerindo que p38 α MAPK não participe na disseminação célula-célula do VACV.

8. Efeitos da inibição de p38 MAPK sobre multiplicação do *Vaccinia virus* em células mantidas com alta concentração de soro

Conforme mostrado acima na Figura 9B, a concentração de soro no meio de cultura influencia a ação do inibidor de p38 α/β MAPK SB203580 sobre a multiplicação do VACV-WR. Em presença de 8% de soro, a inibição da progênie viral pelo SB203580 é sempre superior a 90% ($>1 \log_{10}$) (Figura 9B). A fim de melhor investigar a infecção de células A31 não carenciadas pelo VACV-WR, a ativação de p38 MAPK foi avaliada, em primeiro lugar.

Conforme mostrado na Figura 22, em presença de soro em alta concentração, os níveis de fosforilação de p38 MAPK foram elevados entre 3 hpi e 6 hpi, mesmo na ausência de infecção. Contudo, foi possível observar um aumento na fosforilação de p38 MAPK entre 12 hpi e 36 hpi (Figura 22). Assim como nas células carenciadas, não foi detectada diferença na fosforilação de MKK3/6 entre as células não infectadas e infectadas pelo VACV-WR em presença de soro em alta concentração, indicando que MKK3/6 podem não serem as MAP2Ks responsáveis pela fosforilação de p38 MAPK durante a infecção pelo VACV (Figura 15 e Figura 22).

A seguir, o efeito do SB203580 sobre o acúmulo de proteínas virais durante a infecção pelo VACV-WR em presença de soro em alta concentração.

Em relação à proteína precoce B13, houve um retardo no acúmulo na presença do SB203580, mas a partir de 12 hpi os níveis de B13 são similares na ausência e na presença do inibidor (Figura 23A) O acúmulo das demais proteínas foi variável na presença do SB203580. Na presença do inibidor farmacológico, foi observado um retardo no acúmulo da proteína tardia A3 e sua forma processada, uma redução no acúmulo da proteína precoce/tardia A36 e na proteína tardia F17, e a proteína tardia A17 não foi detectada (Figura 23B). Por último, foi avaliado o impacto do inibidor do SB203580 sobre a curva de crescimento de ciclo único do VACV-WR. Em presença do SB203580, o VACV-WR foi incapaz de estabelecer infecção produtiva em células não carenciadas (Figura 23C).

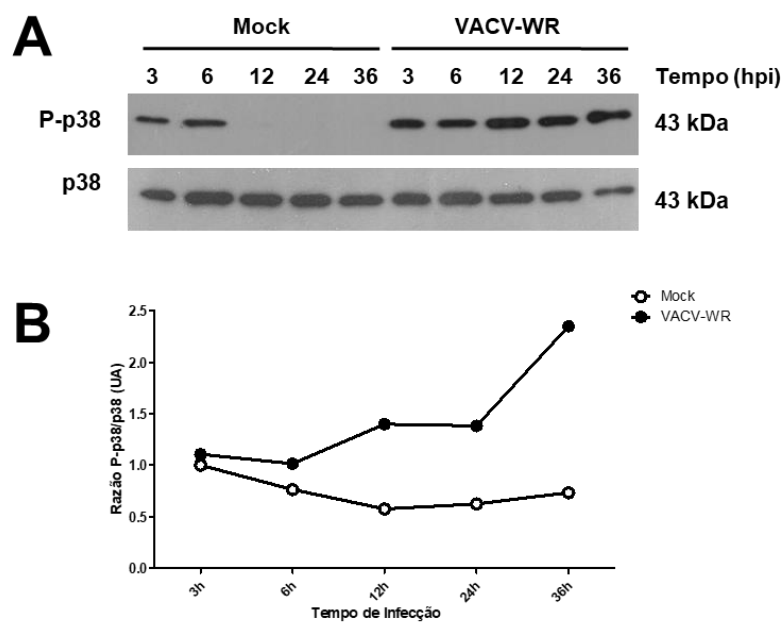


Figura 22. Ativação da via de p38 MAPK durante a infecção pelo *Vaccinia virus*.

Células A31 não carenciadas foram infectadas com VACV-WR (MOI 10) em presença de DMSO ou do inibidor SB203580 ao longo de toda a infecção. Após os diferentes tempos de infecção, extratos de proteínas totais (50µg) foram submetidos a fracionamento eletroforético seguido de transferência para membrana de PVDF. Após bloqueio de ligações inespecíficas, as membranas foram incubadas com anticorpo primário (diluição 1:1000), seguido de incubação com anticorpo secundário conjugado à peroxidase (diluição 1:3000) e revelação. As massas moleculares das proteínas são indicadas na direita da figura.

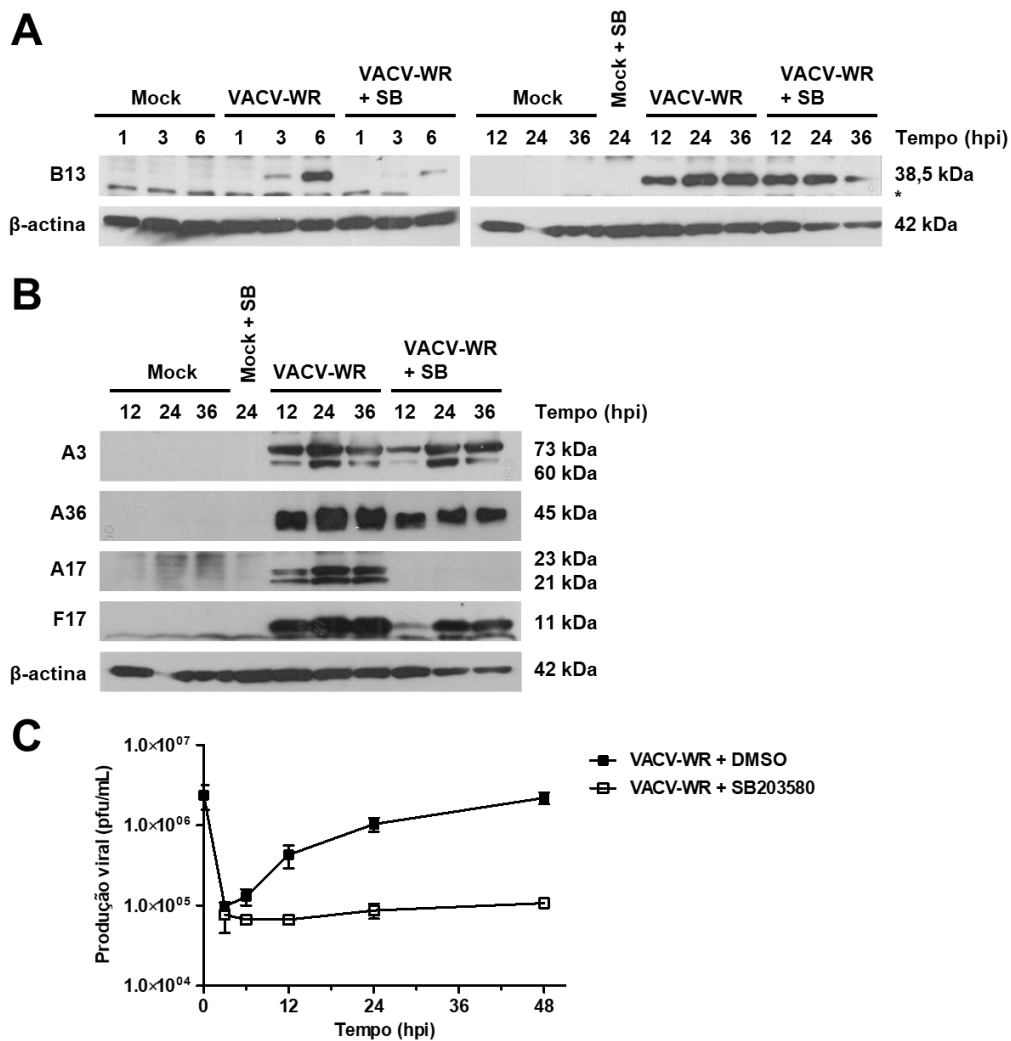


Figura 23. O acúmulo de proteínas tardias do *Vaccinia virus* é alterado pelo inibidor de p38 α / β MAPK SB203580.

Células A31 não carenciadas, pré-tratadas com DMSO 0,2% ou SB203580 20 μ M por 30 min, foram infectadas com VACV-WR (MOI 10) em presença de DMSO ou SB203580 ao longo de toda a infecção. A, Após os diferentes tempos de infecção, extratos de proteínas totais (10 a 25 μ g) foram submetidos a fracionamento eletroforético seguido de transferência para membrana de nitrocelulose. Após bloqueio de ligações inespecíficas, as membranas foram incubadas com anticorpo primário (diluição 1:1000), seguido de incubação com anticorpo secundário conjugado à peroxidase (diluição 1:3000) e revelação. O controle interno das quantidades de proteínas foi feito pelo uso do anticorpo primário anti- β -actina (diluição 1:3000). As massas moleculares das proteínas são indicadas na direita da figura. O asterisco indica banda inespecífica. B, Após 1 h de adsorção, o inóculo viral foi removido, as células foram lavadas com PBS, e foi adicionado meio contendo 8% de soro mais DMSO ou SB203580. Após os diferentes tempos de infecção, as células mais o meio de cultura foram congelados e descongelados por três vezes, e titulados em células BSC-40.

Quando a infecção foi conduzida nas células expressando shRNA de GFP ou de p38 α MAPK, observou-se que o silenciamento da expressão de p38 α MAPK não acarretou na mesma redução na progênie do VACV-WR observada na presença do SB203580 (96%) (Figura 20C). A maior redução observada na progênie do VACV-WR foi de 78%, nas células shRNA-p38 α #2 cl. 15 (Figura 20C), indicando que p38 α MAPK não desempenha a função essencial à multiplicação do VACV inibida pelo SB203580 em células A31 não carenciadas.

Durante a infecção de células A31 e células HeLa não carenciadas pelo VACV-WR, ocorreu uma redução conspícua dos níveis de ciclina D1, a partir de 12 hpi e 6 hpi, respectivamente, em comparação às células não infectadas (Figura 24A e B). Contudo, apenas nas células A31, a expressão de ciclina D1 foi recuperada, pelo menos parcialmente, nas células infectadas em presença do inibidor de p38 α / β MAPK SB203580 (Figura 24A e B). A fim de verificar a relevância da inibição de ciclina D1 dependente de p38 MAPK em células A31, foi realizada a infecção com o VACV-WR em presença do inibidor de p38 α / β MAPK (SB203580) e do inibidor de CDK (cinase dependente de ciclinas) 4/6 (PD033291) concomitantemente. A ciclina D1 se liga à CDK4/6, ativando-a durante a progressão do ciclo celular (VERMEULEN *et al.*, 2003). Em tese, o tratamento com PD033291 mimetizaria a inibição exercida por p38 MAPK sobre a ciclina D1. Entretanto, o co-tratamento com PD033291 foi incapaz de reverter a inibição do SB203580 sobre a multiplicação do VACV-WR, tanto nas células A31 como nas células HeLa (Figura 24C).

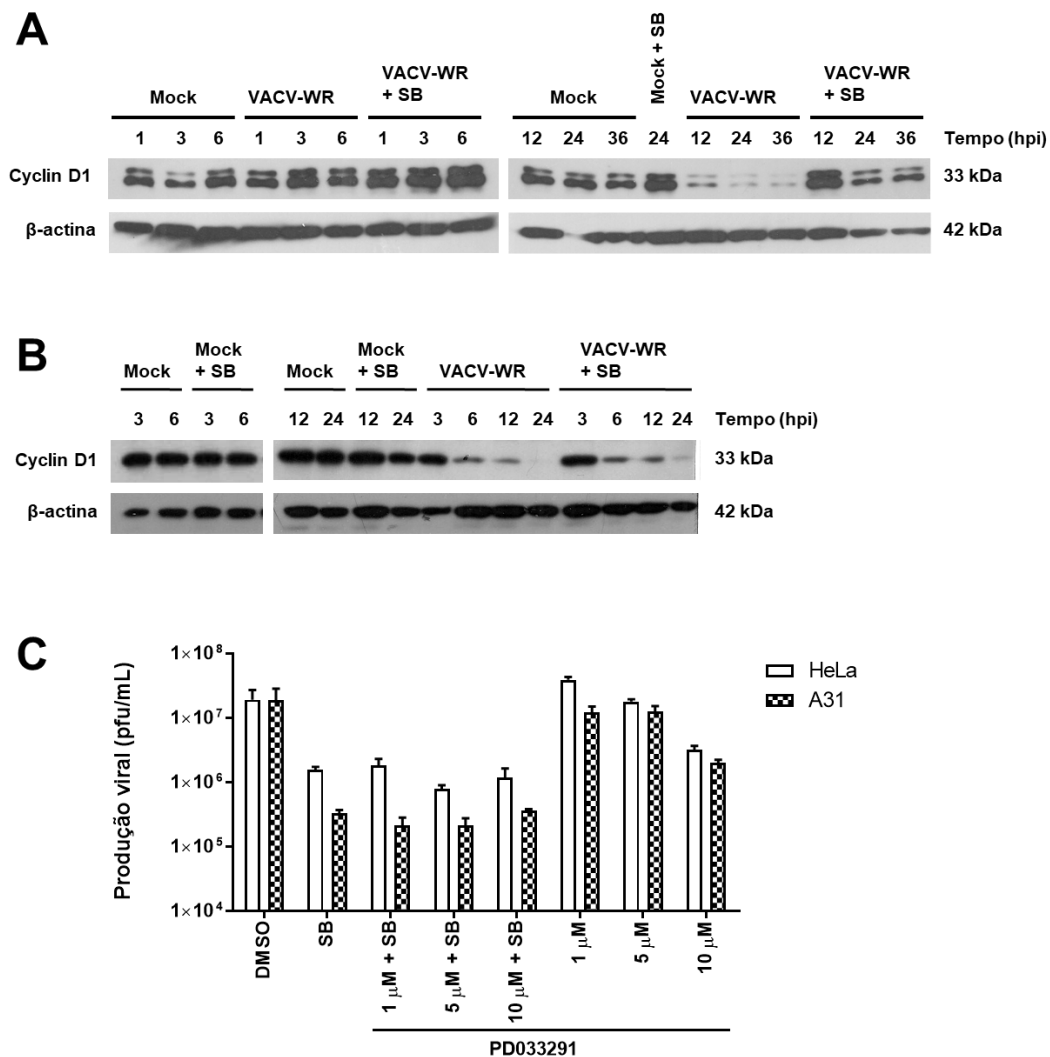


Figura 24. A infecção pelo *Vaccinia virus* inibe a ciclina D1.

Células A31 (A) ou células HeLa (B) não carenciadas, pré-tratadas com DMSO 0,2% ou SB203580 20 μ M por 30 min, foram infectadas com VACV-WR (MOI 10) em presença de DMSO ou SB203580 ao longo de toda a infecção. Após os diferentes tempos de infecção, extratos de proteínas totais (35 μ g) foram submetidos a fracionamento eletroforético seguido de transferência para membrana de nitrocelulose. Após bloqueio de ligações inespecíficas, as membranas foram incubadas com anticorpo primário (diluição 1:1000), seguido de incubação com anticorpo secundário conjugado à peroxidase (diluição 1:3000) e revelação. O controle interno das quantidades de proteínas foi feito pelo uso do anticorpo primário anti- β -actina (diluição 1:3000). As massas moleculares das proteínas são indicadas na direita da figura. C, Células A31 e células HeLa não carenciadas, pré-tratadas com DMSO 1,2%, SB203580 20 μ M, PD033291 (1, 5 e 10 μ M) ou PD033291 (1, 5 e 10 μ M) mais SB203580 20 μ M por 30 min, foram infectadas com VACV-WR (MOI 10) em presença de DMSO ou dos inibidores ao longo de toda a infecção. Após 48 hpi, as células mais o meio de cultura foram congelados e descongelados por três vezes, e titulados em células BSC-40.

DISCUSSÃO

A “conquista” da célula hospedeira pelo vírus durante a infecção é um processo dinâmico que se dá através de sofisticadas estratégias de manipulação do ambiente celular que foram aprimoradas ao longo da coevolução de vírus e hospedeiro(s). Ao longo da infecção, o embate entre as defesas imunes da célula hospedeira e as estratégias de evasão e manipulação dispostas pelo vírus desempenha um papel-chave para o sucesso reprodutivo do vírus, determinando seu tropismo e espectro de hospedeiro (MCFADDEN, 2005). O envolvimento das MAPKs ERK1/2 e JNK1/2 na infecção pelo VACV já é bem conhecido como fatores do hospedeiro co-optados pelo vírus para garantir a sua reprodução e disseminação, respectivamente (ANDRADE *et al.*, 2004; PEREIRA *et al.*, 2012a), mas pouco se sabe acerca do papel da ativação de p38 MAPK durante a infecção pelo VACV. Diante disso, o objetivo do presente trabalho foi caracterizar o envolvimento de p38 MAPK no ciclo de vida do VACV, através da comparação de duas amostras virais: VACV-WR e VBH, uma amostra brasileira.

Os experimentos iniciais apontaram para uma diferença entre VACV-WR e VBH quanto à sensibilidade da multiplicação ao inibidor farmacológico de p38 α/β MAPK, sendo o VBH consideravelmente mais sensível (Figura 8A). Entretanto, a análise da curva de multiplicação ciclo único em células A31 mostrou diferenças marcantes entre as duas amostras de VACV, independente do tratamento (Figura 10B), sugerindo que a diferença na sensibilidade ao SB203580 seja uma consequência indireta da diferença na capacidade multiplicativa do VACV-WR e do VBH em células A31. As células A31 foram consideravelmente mais permissivas à infecção pelo VBH e, por isso, a inibição da sua multiplicação pelo SB203580 foi maior que a do VACV-WR. Em concordância com essa hipótese estão os resultados obtidos em células de humanos (HeLa) e primatas não humanos (BSC-40), as quais, ao contrário das células A31, foram mais permissivas ao VACV-WR, que mostrou-se mais sensível ao SB203580 nessas células que o VBH (Figura 9C e D). Talvez o VBH esteja mais adaptado à multiplicação em células de camundongo por ter sido isolado a partir de uma infecção natural em camundongos de laboratório e tem um histórico de poucas passagens em células de primatas não humanos

(aproximadamente seis passagens em células Vero e BSC-40) (DINIZ *et al.*, 2001; TRINDADE *et al.*, 2004). Já o VACV-WR, mesmo tendo sido adaptado através da passagem em cérebros de camundongos neonatos e ser bastante neurovirulento em camundongos, possui um histórico pouco registrado de passagens em células de outros hospedeiros, incluindo as células BSC-40 e HeLa, ajudando a explicar a maior permissividade dessas linhagens à infecção pelo VACV-WR (PARKER; BRONSON, 1941). Porém, não se pode desconsiderar que essas diferenças possam estar relacionadas à origem das linhagens celulares empregadas: as células A31 são fibroblastos embrionários, e as células BSC-40 e HeLa são epiteliais.

A sensibilidade do VACV ao inibidor farmacológico de p38 α / β MAPK em células A31 também foi influenciada pela concentração de soro no meio de cultura (Figura 9B), mais uma vez indicando que a permissividade da célula à infecção é determinante para sua sensibilidade ao SB203580, pois em presença de alta concentração de soro foi observada uma maior multiplicação do VACV-WR em células A31 e uma maior inibição dessa multiplicação pelo SB203580 (Figura 9B). A favor dessa ideia está o fato de não haver diferença relevante nos títulos virais na presença de SB203580 entre as diferentes condições de infecção testadas. O favorecimento do crescimento viral em presença de alta concentração de soro deve se justificar pela presença de fatores de crescimento no soro capazes de disparar os sinais mitogênico via MEK/ERK e antiapoptótico via PI3K/Akt, dos quais o VACV-WR depende para a sua eficiente multiplicação (ANDRADE *et al.*, 2004; SOARES *et al.*, 2009).

O impacto da inibição de p38 α / β MAPK sobre o acúmulo das proteínas virais foi investigado tanto nas células A31 carenciadas e não carenciadas, como nas células HeLa não carenciadas (Figura 10A, Figura 23A e B, e Figura 11, respectivamente). Não foi observado inibição no acúmulo da proteína precoce B13 em presença de SB203580, mas as proteínas virais tardias foram diferencialmente afetadas. Curiosamente, as duas proteínas virais mais afetadas pelo SB203580 (H3 e A17) são proteínas estruturais que se localizam na membrana externa do vírion, ao passo que as proteínas também estruturais A3 e F17, que foram menos afetadas, se localizam mais internamente no vírion, no cerne e nos corpúsculos laterais, respectivamente (CONDIT *et al.*, 2006;

SCHMIDT *et al.*, 2013). Entretanto, para afirmar que a localização das proteínas estruturais no vírion ou outras características das mesmas influencia a sua susceptibilidade à ação do SB203580 requer uma análise mais ampla da síntese e do acúmulo das proteínas virais em presença desse inibidor farmacológico.

Mesmo com o defeito no acúmulo das proteínas A17 e H3, que são essenciais à multiplicação do VACV (DA FONSECA *et al.*, 2000; UNGER *et al.*, 2013), não foi observado defeito marcante na morfogênese do VACV-WR em células A31 carenciadas (Figura 12D). Houve uma tendência de redução no número de crescentes e de IVs em presença de SB203580, que pode ser associado à redução nos níveis de A17, proteína viral que se localiza na membrana das crescentes e dos IVs e medeia a sua interação com o arcabouço de D13 nas etapas iniciais da morfogênese do VACV (UNGER *et al.*, 2013; MARURI-AVIDAL *et al.*, 2013c). Já durante a infecção pelo VBH, o SB203580 acarretou em uma redução significativa (60%) na formação de MVs (Figura 12D), e essa redução pode ser associada à quase abolição do acúmulo da proteína H3, que está envolvida na geração de MVs durante a infecção (DA FONSECA *et al.*, 2000). Neste ponto, é importante salientar que uma análise mais detalhada da morfogênese do VACV em presença do SB203580 nas células A31 e HeLa não carenciadas é necessária para se construir uma hipótese mais consistente sobre a participação de p38 MAPK na morfogênese do VACV.

A extensa vacuolização no citoplasma das células A31 em presença do SB203580 observada neste estudo já havia sido descrito anteriormente (Figura 13A e C). A indução de vacúolos pelo SB203580 e por outro inibidor de p38 α / β estruturalmente relacionado, SB202190, foi demonstrada em diferentes linhagens de células humanas e de roedores, incluindo fibroblastos embrionários murinos (MEFs) (MENON *et al.*, 2011). A vacuolização do citoplasma foi associada à indução de genes pró-autofágicos e à autofagia defectiva, explicando o acúmulo dos vacúolos (MENON *et al.*, 2011). A autofagia defectiva induzida por SB203580/SB202190 se mostrou ser linhagem celular-dependente, pois algumas linhagens como HeLa e NIH3T3 não apresentaram vacúolos em presença dos inibidores, e independente de p38 α (MENON *et al.*, 2011; este estudo). Assim, é provável que a vacuolização observada nas células A31 em presença do SB203580 se deva à autofagia defectiva descrita por Menon *et al.*

(2011), e que esse fenômeno tenha participação no efeito desse inibidor de p38 MAPK sobre o VACV. Porém, essa hipótese carece de evidência experimental.

Apenas em células tratadas com SB203580 observou-se a presença de vesículas semelhantes a autofagossomos contendo MVs, tanto nas células infectadas pelo VACV-WR como pelo VBH (Figura 13B e D). Essa observação pode ser uma consequência de efeito inespecífico de SB203580 sobre a via autofágica, mas a possibilidade de que p38 MAPK esteja atuando diretamente nesse processo não pode ser descartada. Apesar de já ter sido demonstrado que p38 MAPK pode ter efeito estimulatório ou inibitório sobre a autofagia, a fosforilação da proteína ATG (gene relacionado à autofagia) 5 por p38 α MAPK acarretou em inibição da formação e maturação do autofagossomo em resposta à privação de nutrientes (HÖCKER *et al.*, 2013; KEIL *et al.*, 2013).

Outra constatação feita a partir da análise das micrografias eletrônicas das células A31 infectadas pelo VACV-WR em presença SB203580, foi um aumento no número e na proporção de MVs sendo empacotados, tanto por membranas derivadas de vesículas semelhantes a endossomos, conforme descrito por Tooze *et al.* (1993) (Figura 14A), ou cisternas derivadas da rede *trans*-Golgi, conforme descrito por Schmelz *et al.* (1994) (Figura 14B e C). Mesmo que estudos anteriores tenham sugerido que a via autofágica não esteja envolvida no ciclo de vida do VACV nem no processo de empacotamento dos MVs, a semelhança entre a vesícula que inicia o processo de empacotamento e a membrana de isolamento (também conhecida como fagóforo) que marca o início da via autofágica é evidente e merece uma apreciação mais detalhada (TOOZE *et al.*, 1993; ZHANG *et al.*, 2006; MIZUSHIMA *et al.*, 2013). O fato das membranas que empacotam o MV para formar o WV possuírem marcadores de endossomos precoces ou da rede *trans*-Golgi não exclui a possibilidade do envolvimento da autofagia no empacotamento, pois muitas são as origens da membrana de isolamento, tais como endossomos e o complexo de Golgi, dentre outras (TOOZE *et al.*, 1993; SCHMELZ *et al.*, 1994; LAMB *et al.*, 2013).

O papel da autofagia no controle da infecção por diferentes patógenos virais, tais como herpesvírus humanos e *Sindbis virus*, é bem conhecido e se dá tanto pela eliminação direta do vírion como pelo controle da resposta imune, através da modulação da inflamação e da apresentação de antígenos (DERETIC

et al., 2013; DONG; LEVINE, 2013). A possibilidade do envolvimento da via autofágica no controle da infecção pelos poxvírus é especulativa, mas não pode ser descartada, pois a interação entre os poxvírus e autofagia ainda não foi completamente esclarecida. Reforça essa possibilidade o fato de o VACV inibir a formação de autofagossomos, através de um mecanismo inédito: a conjugação entre as proteínas ATG12 e ATG3, o que leva à perturbação da formação do complexo ATG12-ATG5, que comanda as etapas iniciais da via autofágica convencional (MOLOUGHNEY *et al.*, 2011; MIZUSHIMA *et al.*, 2013). O novo complexo ATG12-ATG3 induzido pelo VACV colocaliza com as fábricas virais e induz uma extensa lipidação da proteína LC3 (adição covalente de fosfatidiletanolamina), processo que, em situações normais, está associado à formação da membrana de isolamento, mas que, em excesso, parece desregular profundamente o fluxo autofágico (MOLOUGHNEY *et al.*, 2011). Certamente, a existência de outras implicações desses eventos específicos da célula infectada com o VACV para o ciclo de vida do vírus além da inibição da via autofágica, precisa ser esclarecida. A possibilidade do envolvimento de p38 MAPK no controle da via autofágica exercido pelo VACV também é uma hipótese interessante que merece ser investigada.

Com o possível envolvimento de p38 MAPK no ciclo de vida do VACV, o próximo passo foi investigar a ativação dessa MAPK durante a infecção pelo VACV-WR e pelo VBH. Em células A31 carenciadas o perfil de fosforilação de p38 MAPK foi diferente para o VACV-WR (6 a 36 hpi) e o VBH (6 e 12 hpi) (Figura 15). Já em células A31 e HeLa não carenciadas, a fosforilação de p38 MAPK apresentou um padrão semelhante, a partir de 3 e 6 hpi, respectivamente, até os últimos tempos de infecção analisados (Figura 22 e Figura 18, respectivamente). Apesar da ativação conspícua de p38 MAPK durante a infecção pelo VACV, não foi verificado um perfil paralelo de ativação de MKK3/6, indicando que MKK3/6 podem não ser responsáveis pela fosforilação de p38 MAPK durante a infecção pelo VACV (Figura 15). Um ativador alternativo de p38 seria MKK4, MAP2K responsável pela ativação de p38 MAPK em resposta à radiação UV (BRANCHO *et al.*, 2003).

Assim como para as MAPKs ERK1/2 e JNK1/2, já foi descrita a interação entre proteínas do VACV e a ativação de p38 MAPK. A proteína viral ligadora de

dsRNA E3 inibe a fosforilação das MAPKs JNK1/2 e p38 MAPK induzidas pela ativação de PKR (ZHANG *et al.*, 2009). Já a proteína viral A52 induz a ativação de p38 MAPK pela via TRAF6-TAK1 para promover a expressão de IL10, citocina com função anti-inflamatória (MALONEY *et al.*, 2005; STACK *et al.*, 2013). É possível vislumbrar um cenário onde a interação entre diferentes fatores virais promove o ajuste fino da ativação de p38 MAPK, a fim de permitir a fosforilação dos substratos relevantes para a multiplicação viral, mas impedir a exacerbação da resposta imune contra o vírus mediada por p38 MAPK em resposta à ativação dos TLRs (ARTHUR; LEY, 2013).

A ativação das MAPKs ERK1/2 e JNK1/2 também foi observada nas células A31 mantidas em baixa concentração de soro e infectadas com VACV-WR ou VBH (Figura 15). Contudo, esses vírus diferem quanto à relevância funcional da via MEK/ERK para o ciclo de vida viral, pois o inibidor de MEK1/2 U0126 acarreta em redução da progênie do VACV-WR, mas não do VBH (ALBARNAZ, 2010). Quanto à JNK, a multiplicação de ambos os vírus não é afetada em células tratadas com o inibidor farmacológico de JNK VIII ou em células deficientes em JNK1/2, mas o aumento na liberação de EVs observado durante a infecção das células deficientes em JNK1/2 pelo VACV-WR não é verificado durante a infecção pelo VBH (ALBARNAZ, 2010; PEREIRA *et al.*, 2012a).

Esses dados ressaltam que o tropismo de duas amostras de VACV relacionadas geneticamente pode ser afetado de maneiras distintas pelos fatores do hospedeiro. Essa constatação é ainda mais intrigante quando levamos em conta que as características do VBH, no que se refere à sua multiplicação em células de camundongo ser resistente à ação do inibidor de MEK1/2 e ser mais sensível ao inibidor de p38 α/β MAPK, são compartilhadas com o CPXV, outra espécie dentro do gênero *Orthopoxvirus* cujo principal reservatório na natureza são roedores silvestres (SILVA *et al.*, 2006; ALBARNAZ, 2010; dados não mostrados). Até o momento, as sequências de apenas cerca de 5% dos genes do VBH são conhecidas, dentre as quais apenas a deleção quase que total do gene A25L/ATI e a deleção parcial do gene C22L/CrmB emergem como as principais diferenças genéticas em comparação ao VACV-WR (TRINDADE *et al.*, 2004; DRUMOND *et al.*, 2008; ALBARNAZ, 2010; ASSIS *et al.*, 2012). A

definição da sequência completa do genoma do VBH ajudará a compreender se é possível associar diferenças genéticas e o papel das vias sinalizadoras celulares no tropismo dos membros do gênero *Orthopoxvirus*.

A profunda alteração do perfil de fosforilação de p38 MAPK, ERK1/2, JNK1/2 e MKK3/6 durante a infecção pelo VACV-WR ou VBH em presença de SB203580 é sugestivo da existência de interação entre as vias das MAPKs durante a infecção pelo VACV (Figura 15). Diferentes fosfatases são capazes de terminar a transmissão do sinal pelas MAPKs através da desfosforilação dos resíduos de Thr e Tyr essenciais à sua função. Dentre as fosfatases que atuam sobre as MAPKs destacam-se as DUSPs/MKPs, que possuem diferentes especificidades sobre ERK, JNK e p38 MAPK, sendo MKP1 capaz de agir sobre as três classes de MAPKs (OWENS; KEYSE, 2009). A expressão de MKP1 pode ser regulada via p38 MAPK em resposta a alguns estímulos, tais como radiação UV, LPS e peptidoglicano, estabelecendo-se uma via de retroalimentação negativa que controla a atividade de p38 MAPK, ERK e (ou) JNK (HU *et al.*, 2007; STAPLES *et al.*, 2010). Contudo, não foi possível observar modulação da expressão de MKP1 durante a infecção pelo VACV-WR ou pelo VBH na ausência e na presença de SB203580 (dados não mostrados). A fosfatase WIP1 também pode atuar sobre p38 MAPK, estabelecendo uma via de regulação por retroalimentação negativa. Em resposta à radiação UV, a fosforilação de p53 por p38 MAPK induz a expressão de WIP1, que por sua vez inativa p38 MAPK através da desfosforilação do resíduo de Thr180 (TAKEKAWA *et al.*, 2000). A redução de WIP1 durante a infecção na presença do SB203580 poderia levar ao aumento observado na fosforilação de p38 MAPK, mas não de ERK ou JNK, pois WIP1 é incapaz de desfosforilar essas MAPKs (TAKEKAWA *et al.*, 2000). Em suma, a existência de vias de retroalimentação negativa dependentes de p38 MAPK atuando durante a infecção pelo VACV não pôde ser confirmada e precisa ser investigada.

Por outro lado, já foi descrito que SB203580 e SB202190 induzem a ativação de JNK de modo independente de p38 MAPK, através da via MLK3-MKK7 (MUNIYAPPA; DAS, 2008). Esse efeito inespecífico do SB203580 pode explicar o aumento da fosforilação de JNK, mas não o aumento na fosforilação de ERK ou p38 MAPK, pois as mesmas não são fosforiladas por MKK7. Vale

ressaltar que durante a infecção na presença de SB203580, o aumento na fosforilação de p38 MAPK pode estar associado ao aumento na ativação de MKK3/6 observado nas mesmas condições (Figura 15). Essa constatação sugere que, seja retroalimentação negativa ou efeito inespecífico do SB203580, pelo menos no caso do aumento da fosforilação de p38 MAPK, o(s) efetor(es) dessa ação do SB203580 durante a infecção pelo VACV encontram-se à jusante da via MKK3/6-p38 MAPK.

Considerando o efeito da inibição farmacológica de p38 α/β MAPK sobre a multiplicação do VACV-WR e do VBH, uma pergunta constante era: qual(is) os substrato(s) de p38 MAPK medeia(m) esse papel durante a infecção? Foi escolhida como alvo potencial MK2, cinase fosforilada e ativada por p38 MAPK e que desempenha importantes papéis na resposta inflamatória, na migração celular e no ciclo celular (GAESTEL, 2006). A fosforilação de MK2 foi detectada durante a infecção de células A31 carenciadas (Figura 15A) e de células HeLa não carenciadas (Figura 18), e foi sensível à inibição farmacológica de p38 MAPK. O sinal necessário para a ativação da via p38 MAPK-MK2 durante a infecção pelo VACV é disparado por um evento precoce dependente da infecção ativa, mas anterior à replicação do DNA viral, e localiza-se no compartimento citoplasmático das células infectadas (Figura 16 e Figura 17). Apesar disso, a translocação nuclear de MK2 e de seu ativador, p38 MAPK, é um processo muito dinâmico e bastante regulado (GAESTEL, 2006). Logo, não foi possível afirmar que p38 MAPK e MK2 fosforiladas se localizaram exclusivamente no compartimento citoplasmático ao longo de todo o ciclo de infecção.

O estudo de vias sinalizadoras utilizando-se de inibidores farmacológicos está sujeito ao viés da ação inespecífica desses inibidores sobre outros alvos na célula. Por exemplo, o inibidor de JNK1/2 SP600125 inibe a multiplicação dos *Orthopoxvirus* VACV e CPXV independentemente de JNK1/2 (PEREIRA *et al.*, 2012b). Assim, com o objetivo de confirmar a especificidade do SB203580, foram geradas células A31 expressando shRNA para silenciar a expressão de p38 α MAPK. Contudo, em nenhuma das linhagens selecionadas mantidas em baixa concentração de soro, foi observada redução da multiplicação do VACV-WR ou do VBH comparável à redução verificada em presença do SB203580 (Figura 20A e B), sugerindo que p38 α MAPK não seja a isoforma relevante no contexto da

infecção pelo VACV. Foi observada uma grande variação na multiplicação do VACV-WR e do VBH nas linhagens expressando shRNA, mesmo as expressando shRNA de GFP (controle negativo). Essa variação deve ser devido ao processo de clonagem celular, que acaba por selecionar clones com o mesmo fundo genético mas com variações estocásticas na expressão gênica. Essa é a principal desvantagem da metodologia escolhida de silenciamento gênico por shRNA através de transfecção estável, podendo levar ao enviesamento dos resultados caso os mesmos não sejam apropriadamente interpretados. Para minimizar o enviesamento, nesse estudo foram empregados três clones mais uma mistura de clones (*pool*) para cada shRNA testado (Figura 20).

Mesmo que a inibição de p38 MAPK acarrete em defeito na multiplicação do VACV, o efeito SB203580 sobre a disseminação do VACV-WR também foi investigado. Em presença do SB203580, não houve a formação da placa de lise nas células A31 carenciadas (Figura 19A) e o foco de infecção ficou restrito a um ou duas células (Figura 19B). A formação da placa de lise dos poxvírus está intimamente relacionada à disseminação dos EVs, especialmente a porção que permanece associada à célula e induz a formação de caudas de actina para propeli-los em direção às células vizinhas não infectadas (SMITH *et al.*, 2002; DOCEUL *et al.*, 2010). Esse defeito foi corroborado pela curva de multiplicação de ciclos múltiplos em células A31 (Figura 19C) e também nas células BSC-40 e HeLa que apresentaram uma redução acentuada na formação da placa de lise em presença do SB203580 (Figura 19A e B, respectivamente). Mesmo que haja uma inibição da multiplicação pelo SB203580, o seu efeito sobre a disseminação do VACV foi muito acentuado, levando a crer que p38 MAPK esteja envolvida não só na multiplicação, mas também disseminação da progênie do VACV. Porém, novamente, o efeito do SB203580 sobre a disseminação do VACV não foi reproduzido nas células A31 expressando shRNA de p38 α MAPK, sugerindo que essa isoforma não esteja envolvida no ciclo de vida do VACV (Figura 21).

Considerado que p38 α MAPK não seja o alvo da ação do SB203580 sobre a multiplicação e da disseminação do VACV e assumindo que a ação desse inibidor no contexto da infecção seja específica, pode se hipotetizar se p38 β MAPK estaria participando na multiplicação e (ou) na disseminação do VACV. Essa hipótese é razoável se for levado em consideração que, ao contrário de

p38 α MAPK, p38 β MAPK não estimula a expressão de citocinas pró-inflamatórias, como TNF α (O'KEEFE *et al.*, 2007; XING *et al.*, 2013). Assim, ao co-optar p38 β MAPK para completar o seu ciclo de vida com sucesso, o VACV evitaria a resposta do hospedeiro à infecção. Além disso, p38 α MAPK é transportada para o núcleo por alguns dos seus substratos como MK2 e PRAK, ao passo p38 β MAPK não é (LI *et al.*, 2008). Como mostrado anteriormente na Figura 16, p38 MAPK e MK2 fosforilados durante a infecção pelo VACV se localizam no compartimento citoplasmático da célula, mais uma vez sugerindo que p38 β MAPK e não p38 α MAPK esteja sendo regulada pelo VACV.

A cinase MK2 está envolvida na reorganização do citoesqueleto de actina e na migração celular, dois eventos envolvidos na disseminação do VACV (SANDERSON *et al.*, 1998; MOREAU *et al.*, 2000; SCAPLEHORN *et al.*, 2002; GAESTEL *et al.*, 2006; MÜNTER *et al.*, 2006; VALDERRAMA *et al.*, 2006; PEREIRA *et al.*, 2012a). Essas funções são mediadas pelos seus substratos HSP27, cuja fosforilação estimula a dinâmica de actina, e p16-Arc/ARPC5, um componente regulatório do complexo ARP2/3, essencial para a formação das caudas de actina do VACV (MOREAU *et al.*, 2000; SCAPLEHORN *et al.*, 2002; HUANG *et al.*, 2004). Estudo do Grupo de Transdução do Sinal demonstrou que a serina-treonina cinase celular PAK1 fosforila outro componente regulatório do complexo ARP2/3, p41-Arc/ARPC1, a fim de garantir a eficiente formação de caudas de actina durante a disseminação do VACV (ANDRADE; ALBARNAZ *et al.*, em preparação). A hipótese de que MK2 estaria fosforilando p16-Arc/ARPC5 durante a infecção pelo VACV e seu possível papel na disseminação do VACV estão em investigação.

A influência da presença de soro em alta concentração sobre a sensibilidade da multiplicação do VACV-WR em células A31 à inibição pelo SB203580 sugeriu que esse fato poderia estar relacionado à progressão do ciclo celular na presença do estímulo proliferativo das proteínas do soro. O SB203580 também afetou o crescimento do VACV-WR durante a infecção com MOI alta em presença de soro em baixa concentração, mesmo que em menor extensão. Como discutido anteriormente, essa diferença entre células não carenciadas e carenciadas pode ser apenas devido ao menor crescimento do VACV-WR na presença de soro em baixa concentração do que a uma função diferencial de

p38 α / β MAPK durante a infecção pelo VACV de células em diferentes condições de estímulo proliferativo (comparar as curvas de crescimento de ciclo único do VACV-WR apresentadas na Figura 10B e na Figura 23C).

Vários membros da família *Poxviridae* são conhecidos por regular a progressão do ciclo celular nas células infectadas, induzindo a proliferação celular associada à hiperplasia localizada na região afetada pela infecção nos hospedeiros susceptíveis. Exemplos incluem, além do VACV, MYXV, *Rabbit fibroma virus* (RFV), *Orf virus*, *Fowlpox virus*, *Yaba monkey tumor virus* e MCV (BULLER *et al.*, 1988a). A presença de genes que codificam para uma proteína análoga aos fatores de crescimento EGF e TGF β nos genomas de VACV, MYXV, RFV e MCV, é associada à ocorrência dessas lesões hiperplásicas durante a infecção (BULLER *et al.*, 1988a). No caso do VACV, o fator de crescimento do VACV (VGF) é capaz de disparar um sinal intracelular através da ligação ao receptor de EGF, estimulando a síntese de DNA e a proliferação celular (STROOBANT *et al.*, 1985; TWARDZIK *et al.*, 1985; KING *et al.*, 1986). Além disso, a infecção pelo VACV acarreta num decréscimo no número de células na fase G0/G1 do ciclo celular e um aumento no número de células nas fases S e G2/M, sugerindo que haja um estímulo da progressão do ciclo celular, seguido de um bloqueio (WALI; STRAYER, 1999; YOO *et al.*, 2008).

A p38 MAPK possui um papel central na fisiologia celular ao regular a progressão do ciclo celular em resposta a dano no DNA ou outros estresses em dois pontos de checagem distintos: G1/S e G2/M (THORNTON; RINCÓN, 2009). No ponto de checagem de G1/S, p38 atua através de diferentes mecanismos: fosforilação e consequente ativação da atividade transcricional de p53; fosforilação, seguida de ubiquitinação e degradação, da fosfatase cdc25; regulação negativa da expressão da ciclina D1, seja através de repressão transcricional ou de fosforilação seguida de ubiquitinação e degradação; fosforilação e estabilização do inibidor de CDKs (CKI) p57-Kip2 (LAVOIE *et al.*, 1996; CASANOVAS *et al.*, 2000; THORNTON; RINCÓN, 2009; JOACHIN *et al.*, 2012). No ponto de checagem de G2/M, p38 MAPK também atua através da fosforilação do fator de transcrição p53 e da fosfatase cdc25 (THORNTON; RINCÓN, 2009). Diante disso, decidiu-se investigar se durante a infecção de células pelo VACV-WR em presença de soro em alta concentração, o inibidor

SB203580 afetaria a expressão da ciclina D1, proteína central na progressão do ciclo celular através da fase S (VERMEULEN *et al.*, 2003).

Tanto nas células A31 como nas células HeLa, observou-se uma redução de ciclina D1 durante a infecção pelo VACV-WR (Figura 24A e B), que foi comparável à inibição de outras proteínas essenciais à progressão do ciclo celular durante a infecção pelo VACV, tais como ciclina A, ciclina B, CDK1, CDK2, CDK4, CDK6, e Rb superfosforilada (WALI; STRAYER, 1999; YOO *et al.*, 2008). Da mesma forma, infecção pelo VACV-WR leva à redução de reguladores negativos do ciclo celular, como p53 e p27-Kip1 (WALI; STRAYER, 1999; YOO *et al.*, 2008). Por outro lado, Yoo *et al.* (2008) observaram um aumento nos níveis do fator de transcrição E2F1 e uma diminuição em sua associação com proteína Rb, indicando que o mesmo estaria ativo durante a infecção. Contudo, apenas nas células de camundongo, a inibição de ciclina D1 foi dependente de p38 MAPK (Figura 24A e B)

Como E2F1 regula positivamente a transcrição de genes cujos produtos são requeridos para a progressão da fase S, tais como ciclina A, ciclina E e cdc25, pode se especular que, durante a infecção pelo VACV, a indução da expressão dessas proteínas, mesmo que temporária, por E2F1 seja importante para entrada da célula hospedeira na fase S em resposta ao estímulo do VGF e(ou) outros fatores de crescimento (VERMEULEN *et al.*, 2003). Recentemente, foi demonstrado em uma grande triagem por interferência de RNA (RNAi), que siRNAs de ciclina D1 favorecem a replicação de outro poxvírus, o MYXV, em células humanas tumorais (TEFERI *et al.*, 2013). De fato, a multiplicação do MYXV foi maior em presença do inibidor farmacológico de CDK4/6, às quais as ciclinas do tipo D se ligam para promover a entrada na fase G1, e esse aumento da multiplicação viral foi associado ao bloqueio da progressão do ciclo celular na fase G1 (VERMEULEN *et al.*, 2003; TEFERI *et al.*, 2013).

O estímulo da síntese de DNA durante a fase S deve ser benéfico para a replicação do genoma viral, ao aumentar a disponibilidade de precursores nucleotídicos (BULLER *et al.*, 1988b). No entanto, a progressão do ciclo celular faria a célula retornar à fase G0, de forma que a redução nos níveis de ciclinas e CDKs leva a um bloqueio no ciclo celular nas fases S e G2/M durante a infecção pelo VACV (WALI; STRAYER, 1999). Como a redução dos níveis de

ciclina D1 durante a infecção pelo VACV-WR foi sensível ao SB203580, isso sugere que p38 MAPK possa participar no bloqueio do ciclo celular durante a infecção pelo VACV, pelo menos nas células de camundongo. Para testar essa hipótese, foi realizado o co-tratamento das células infectadas pelo VACV-WR com SB203580 e PD033291 (inibidor de CDK4/6), que mimetizaria o papel de p38 MAPK na inibição de ciclina D1. Todavia, a inibição simultânea de CDK4/6 não afetou o efeito do inibidor de p38 MAPK sobre a multiplicação do VACV (Figura 24C), indicando que a modulação negativa de ciclina D1 por p38 MAPK é irrelevante para a multiplicação do VACV em células murinas e humanas, pelo menos *in vitro*.

Em conclusão, este estudo revelou, através do uso da inibição farmacológica de p38 MAPK, que essa proteína sinalizadora do hospedeiro é co-optada pelo VACV e, provavelmente, desempenha funções pleiotrópicas em diferentes etapas do seu ciclo de vida ao participar da geração e disseminação da sua progênie.

CONCLUSÕES

- A multiplicação do *Vaccinia virus* Belo Horizonte (VBH) é mais sensível que a do *Vaccinia virus* Western Reserve (VACV-WR) à inibição pelo inibidor de p38 α / β MAPK SB203580 durante a infecção de células A31 mantidas em baixa concentração de soro;
- A multiplicação do VACV-WR é abolida pelo inibidor de p38 α / β MAPK durante a infecção de células mantidas em alta concentração de soro;
- A multiplicação do VACV-WR é mais sensível que a do VBH à inibição pelo SB203580 durante a infecção de células BSC-40 e HeLa;
- A inibição da multiplicação do VACV pelo SB203580 está associada a um defeito no acúmulo de algumas proteínas virais tardias;
- A inibição da multiplicação do VBH, mas não do VACV-WR, pelo SB203580 está associada a um defeito na formação dos vírions maduros (MVs);
- A disseminação do VACV-WR é bastante inibida em presença do inibidor de p38 α / β MAPK durante a infecção de células A31, BSC-40 e HeLa;
- A infecção de células carenciadas pelo VACV leva à fosforilação de p38 MAPK em tempos tardios, e p38 MAPK fosforilada localiza-se no compartimento citoplasmático das células infectadas;
- O VACV induz a fosforilação, dependente de p38 MAPK, de MK2 em tempos tardios de infecção;
- Os níveis de ciclina D1 são reduzidos, em células A31 e HeLa infectadas pelo VACV-WR, em tempos tardios, mas de forma dependente de p38 MAPK apenas nas células A31;
- A regulação de ciclina D1 por p38 MAPK durante a infecção de células A31 pelo VACV-WR não é relevante para a multiplicação viral;
- O alvo dos efeitos do SB203580 durante a infecção de células A31 carenciadas ou não carenciadas pelo VACV não parece ser p38 α MAPK.

PERSPECTIVAS

Com o objetivo de finalizar o trabalho para prepará-lo para publicação em revistas especializadas indexadas será conduzida uma investigação mais detalhada acerca da possível participação da via p38 MAPK-MK2 na disseminação do VACV. Para cumprir tal meta, abaixo segue uma descrição resumida do que está planejado a ser realizado.

Em primeiro lugar, como o silenciamento de p38 α MAPK não reproduziu a inibição da multiplicação do VACV-WR pelo SB203580, tanto em células carenciadas como em células não carenciadas, e se levando em consideração que a localização subcelular de p38 MAPK fosforilada durante a infecção é condizente com a localização de p38 β MAPK fosforilada, serão geradas células A31 expressando shRNA de p38 β MAPK, empregando a mesma metodologia empregada para o silenciamento de p38 α MAPK. O efeito do silenciamento de p38 β MAPK sobre a multiplicação e a disseminação do VACV-WR será então investigado, bem como sobre a localização subcelular de p38 MAPK e MK2 fosforiladas durante a infecção pelo VACV-WR, em comparação às células expressando shRNA de p38 α .

Considerando que MK2 é capaz de fosforilar o resíduo de Ser77 de ARPC5/p16-Arc, que é um componente regulatório do complexo ARP2/3, que por sua vez é requerido para polimerização de actina sob os vírions e indução das caudas de actina durante a disseminação do VACV, a seguir será investigada a formação de caudas de actina durante a infecção das células shRNA-GFP, shRNA-p38 α MAPK e shRNA-p38 β MAPK pelo VACV-WR. Para avaliar se MK2 e ARPC5/p16-Arc desempenham algum papel essencial para a multiplicação e(ou) disseminação do VACV, infecções com MOI alta (10) e MOI baixa (0,001) pelo VACV-WR serão conduzidas em células HeLa transfectadas com siRNA de MK2. Em seguida, para verificar se existe conexão entre a via p38 MAPK-MK2 e ARPC5/p16-Arc, o impacto da superexpressão de mutantes não fosforilável (mutado no resíduo de Ser77 fosforilado por MK2, Ser77Ala) ou fosfo-mimético (Ser77Glu) de ARPC5/p16-Arc sobre a formação das caudas de actina durante a infecção pelo VACV-WR será investigado.

Como a relevância funcional da fosforilação de ARPC5/p16-Arc por MK2 na biologia do complexo nucleador de actina ARP2/3 ainda é desconhecida, será investigada a formação do complexo ARP2/3 e o seu recrutamento para os sítios de polimerização de actina durante a infecção pelo VACV-WR, através de ensaios de coimunoprecipitação e microscopia confocal a laser, respectivamente.

Além disso, pretende-se também conduzir uma análise detalhada da morfogênese do VACV-WR e do VBH em células A31 e em células HeLa não carenciadas, na ausência e na presença do SB203580, a fim de elucidar o possível envolvimento de p38 MAPK na morfogênese do VACV.

E, por último, será investigado o efeito de inibidores farmacológicos de p38 MAPK, tais como SB203580 e outros em fases avançadas de desenvolvimento para uso clínico em humanos, sobre a doença causada pelo VACV em modelo de infecção intranasal de camundongos BALB/c.

OUTRAS CONTRIBUIÇÕES

Paralelamente ao desenvolvimento deste trabalho, outras atividades foram executadas, e também contribuíram para minha formação. Sendo assim, abaixo estão enumeradas as mais relevantes:

- Doutorado-sanduiche na Universidade da Flórida (Gainesville, Estados Unidos), no período de setembro a dezembro de 2012. Como consequência desse estágio de curta duração, um trabalho que foi inicialmente submetido ao *Journal of Virology* encontra-se atualmente em processo de reformulação para atender as demandas levantadas pelos revisores. O manuscrito intitula-se “*Vaccinia virus* dissemination requires P-PAK1/P-p41Arc pathway activation to promote actin-based motility “ e dividirei a primeira autoria com a Dra Luciana Garcia Andrade.
- Participação no manuscrito intitulado “The MEK/ERK pathway plays a decisive role in *Yellow fever virus* replication cycle”, no qual divido a primeira autoria com a doutoranda Alice Abreu Torres e o Dr Leonardo Camilo de Oliveira. O manuscrito está em fase final de redação e deve ser submetido em março/2014 e descreve a participação da via MEK/ERK na biologia do YFV e cuja análise *in vitro* e *in vivo* serviu de protótipo para a prospecção de antivirais contra outros vírus da família *Flaviviridae* (gênero *Flavivirus*), tendo gerado a concessão do Depósito de Pedido de Patente pelo Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI) (ver abaixo).
- Depósito de Pedido de Patente sobre a utilização de inibidores farmacológicos da via MEK/ERK, intitulado “Uso de inibidor farmacológico da via MAPK (MEK/ERK) no tratamento de doenças virais“, cujo pedido foi acatado pelo INPI, sob o número DIRPA-PQ 006, em 20 de Agosto de 2013.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

Abrahão, J.S., Silva-Fernandes, A.T., Lima, L.S., Campos, R.K., Guedes, M.I., Cota, M.M., Assis, F.L., Borges, I.A., Souza-Júnior, M.F., Lobato, Z.I., Bonjardim, C.A., Ferreira, P.C., Trindade, G.S., Kroon, E.G. (2010) Vaccinia virus infection in monkeys, Brazilian Amazon. *Emerg Infect Dis* **16**(6):976-9.

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

Alvarez, D.E., Agaisse, H. (2013) The formin FHOD1 and the small GTPase Rac1 promote vaccinia virus actin-based motility. *J Virol* **202**(7), 1075-90.

Amako, Y., Igloi, Z., Mankouri, J., Kazlauskas, A., Saksela, K., Dallas, M., Peers C., Harris, M. (2013) Hepatitis C Virus NS5A Inhibits Mixed Lineage Kinase 3 to Block Apoptosis. *J Biol Chem* **288**(34), 24753-63.

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

Andrade, L.G. (2008) O envolvimento da proteína cinase PAK1 na infecção pelos *Orthopoxvirus Cowpox* e *Vaccinia*. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-

Graduação em Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

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

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

Arthur, J.S., Ley, S.C. (2013) Mitogen-activated protein kinases in innate immunity. *Nat Rev Immunol* **13**(9),679-92.

Assis, F.L., Pereira, G., Oliveira, C., Rodrigues, G.O., Cotta, M.M., Silva-Fernandes, A.T., Ferreira, P.C., Bonjardim, C.A., Trindade, G.S., Kroon, E.G., Abrahão, J.S. (2012) Serologic evidence of orthopoxvirus infection in buffaloes, Brazil. *Emerg Infect Dis.* **18**(4):698-700.

Assis, F.L., Almeida, G.M., Oliveira, D.B., Franco-Luiz, A.P., Campos, R.K., Guedes, M.I., Fonseca, F.G., Trindade, G.S., Drumond, B.P., Kroon, E.G., Abrahão, J.S. (2012) Characterization of a new Vaccinia virus isolate reveals the C23L gene as a putative genetic marker for autochthonous Group 1 Brazilian Vaccinia virus. *PLoS One* **7**(11):e50413.

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

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

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

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

Breitbach, C.J., Burke, J., Jonker, D., Stephenson, J., Haas, A.R., Chow, L.Q.M., Nieva, J., Hwang, T.H., Moon, A., Patt, R., Pelusio, A., Le Boeuf, F., Burns, J., Evgin, L., De Silva, N., Cvancic, S., Robertson, T., Je, J.E., Lee, Y.S., Parato, K., Diallo, J.S., Fenster, A., Daneshmand, M., Bell, J.C., Kirn, D.H. (2011) Intravenous delivery of a multi-mechanistic cancer-targeted oncolytic poxvirus in humans. *Nature* **477**, 99-102.

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

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

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

Buller, R.M.L., Chakrabart, S., Moss, B., Fredrickson, T. (1988) Cell Proliferative Response to Vaccinia Virus Is Mediated by VGF. *Virology* **164**, 182-92.

Buller, R.M.L., Chakrabart, S., Cooper, J.A., Twardzik, D.R., Moss, B. (1988) Deletion of the Vaccinia Virus Growth Factor Gene Reduces Virus Virulence. *J Virol* **62**(3), 866-74..

Campbell, S., Hazes, B., Kvensakul, M., Colman, P., e Barry, M. (2009) Vaccinia virus F1L interacts with Bak using highly divergent Bcl-2 homology domains and replaces the function of Mcl-1. *J Biol.Chem.* **285**(7), 4635-4708.

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

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

Casanovas, O., Miró, F., Estanyol, J.M., Itartes, E., Agell, N., Bachs, O. (2000) Osmotic Stress Regulates the Stability of Cyclin D1 in a p38SAPK2-dependent Manner *J Biol Chem* **275**(45), 35091-7.

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

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

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

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

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

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

Cooray, S., Jin, L., e Best, J.M. (2005) The involvement of survival signaling pathways in rubella virus-induced apoptosis. *Virology* **332**, 1.

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

Da Fonseca, F., Wolffe, E.J., Weisberg, A., Moss, B. (2000) Effects of Deletion or Stringent Repression of the H3L Envelope Gene on Vaccinia Virus Replication. *J Virol* **74**(16), 7518-28.

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

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

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

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

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

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

Deretic, V., Saitoh, T., Akira, S. (2013) Autophagy in infection, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* **13**, 722-37.

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

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

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

Doceul, V., Hollinshead, M., van der Linden, L., Smith, G.L. Repulsion of superinfecting virions: a mechanism for rapid virus spread. *Science* **327**(5967):873-6.

Dong, X., Levine, B. (2013) Autophagy and viruses: Adversaries or allies? *J Innate Immun* **5**, 480-93.

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

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

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

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

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

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

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

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

Gaestel, M. (2006) MAPKAP kinases – MKs – two's company, three's a crowd. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 120-30.

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

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

García, F., Bernaldo de Quirós, J.C., Gómez, C.E., Perdiguero, B., Nájera, J.L., Jiménez, V., García-Arriaza, J., Guardo, A.C., Pérez, I., Díaz-Brito, V., Conde, M.S., González, N., Alvarez, A., Alcamí, J., Jiménez, J.L., Pich, J., Arnaiz, J.A., Maleno, M.J., León, A., Muñoz-Fernández, M.A., Liljeström, P., Weber, J., Pantaleo, G., Gatell, J.M., Plana, M., Esteban, M. (2011) Safety and immunogenicity of a modified pox vector-based HIV/AIDS vaccine candidate expressing Env, Gag, Pol and Nef proteins of HIV-1 subtype B (MVA-B) in healthy HIV-1-uninfected volunteers: A phase I clinical trial (RISVAC02). *J Virol* **29**(46):8309-16

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

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

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

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

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

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

He, Y., Nakao, H., Tan, S., Polyak, S.J., Neddermann, P., Vijaysri, S., Jacobs, B.L., e Katze, M.G. (2002) Subversion of cell signaling pathways by hepatitis C virus nonstructural 5A protein via interaction with Grb2 and p85 phosphatidylinositol 3-kinase. *J Virol* **76**(18), 9207-17.

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

Höcker, R., Walker, A., Schmitz, I. (2013) Inhibition of autophagy through MAPK14-mediated phosphorylation of ATG5. *Autophagy* **9**(3):426-8.

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

Hu, JH, Chen, T, Zhuang, ZH, Kong, L, Yu, MC, Liu, Y, Zang, JW, Ge, BX. (2007) Feedback control of MKP-1 expression by p38. *Cell Signal* **19**, 393-400.

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

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

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

Joachin, M., Gubern, A., González-Nuñez, D., Ruiz, E.,J., Ferreiro, I., De Nadal, E., Nebreda, A.R., Posas, F. (2012) The p57 CDKi integrates stress signals into cell-cycle progression to promote cell survival upon stress. *EMBO J* **31**, 2952-64.

Johnsen, I.B., Bergstroem, B., Stiberg, K.A., Thommesen, L., Anthonsen, M.W. (2013) Inducible cAMP early repressor (ICER) is a novel regulator of RIG-I mediated IFN- β production. *Cell Signal* **25**(9):1804-12.

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

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

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

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

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

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

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

Keil, E., Höcker, R., Schuster, M., Essmann, F., Ueffing, N., Hoffman, B., Liebermann, D.A., Pfeffer, K., Schulze-Osthoff, K., Schmitz, I. (2013) Phosphorylation of Atg5 by the Gadd45 β -MEKK4-p38 pathway inhibits autophagy. *Cell Death Differ* **20**(2):321-32.

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

Kilcher, S., Schmidt, F.I., Schneider, C., Kopf, M., Helenius, A., Mercer, J. (2014) siRNA Screen of Early Poxvirus Genes Identifies the AAA+ ATPase D5 as the Virus Genome-Uncoating Factor. *Cell Host Microbe* **15**(1):103-12.

King, C.S., Cooper, J.A., Moss, B., Twardzik, R.D. (1986) Vaccinia Virus Growth Factor Stimulates Tyrosine Protein Kinase Activity of A431 Cell Epidermal Growth Factor Receptors. *Mol Cell Biol* **6**(1), 332-6.

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

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

Lamb, C.A., Yoshimori, T., Tooze, S.A. (2013) The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**(12):759-74.

Lavoie, J.N., L'Allemain, G., Brunet, A., Müller, R., Pouyssegur, J. (1996) Cyclin D1 Expression Is Regulated Positively by the p42/p44MAPK and Negatively by the p38/HOGMAPK Pathway. *J Biol Chem* **271**(34), 20608-16.

Law, M., Carter, G.C., Roberts, K.L., Hollinshead, M., e Smith, G.L. (2006) Ligand-induced and nonfusogenic dissolution of a viral membrane. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**(15), 5989-94.

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

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

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

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

Li Q, Zhang N, Zhang D, Wang Y, Lin T, Wang Y, Zhou H, Ye Z, Zhang F, Lin SC, Han J. (2008) Determinants that control the distinct subcellular localization of p38alpha-PRAK and p38beta-PRAK complexes. *J Biol Chem* **283**(16),11014-23.

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

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

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

Maruri-Avidal, L., Weisberg, A.S., Moss, B. (2011) Vaccinia virus L2 protein associates with the endoplasmic reticulum near the growing edge of crescent precursors of immature virions and stabilizes a subset of viral membrane proteins. *J Virol* **85**(23):12431-41.

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

Maruri-Avidal, L., Weisberg, A.S., Moss, B. (2013b) Association of the vaccinia virus A11 protein with the endoplasmic reticulum and crescent precursors of immature virions. *J Virol* **87**(18):10195-206.

Maruri-Avidal, L., Weisberg, A.S., Moss, B. (2013c) Direct formation of vaccinia virus membranes from the endoplasmic reticulum in the absence of the newly characterized L2-interacting protein A30.5. *J Virol* **87**(22):12313-26.

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

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

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

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

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

Menon, M.B., Kotlyarov, A., Gaestel, M. (2011) SB202190-Induced Cell Type-Specific Vacuole Formation and Defective Autophagy Do Not Depend on p38 MAP Kinase Inhibition. *PLoS One* **6**(8): e23054.

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

Mercer, J., Snijder, B., Sacher, R., Burkard, C., Bleck, C.K., Stahlberg, H., Pelkmans, L., Helenius, A. (2012) RNAi screening reveals proteasome- and Cullin3-dependent stages in vaccinia virus infection. *Cell Rep* **2**(4):1036-47.

Mizushima, N., Yoshimori, T., Levine, B. (2010) Methods in mammalian autophagy research. *Cell* **140**, 313-26.

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

Morton, S., Davis, R.J, Cohen, P. (2004) Signalling pathways involved in multisite phosphorylation of the transcription factor ATF-2. *FEBS Lett* **572**(1-3),177-83.

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

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

Moss, B. (2013) Poxvirus DNA Replication. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, no prelo.

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

Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

Münter, S., Way, M., e Frischknecht, F. (2006) Signaling during pathogen infection. *Sci STKE* **2006**(335), re5.

Muniyappa, H., Das, K.C. (2008) Activation of c-Jun N-terminal kinase (JNK) by widely used specific p38 MAPK inhibitors SB202190 and SB203580. A MLK-3-MKK7-dependent mechanism. *Cell Signal* **20**, 675-83.

Nagila, A., Netsawang, J., Suttitheptumrong, A., Morchang, A., Khunchai, S., Srisawat, C., Puttikhunt, C., Noisakran, S., Yenchitsomanus, P.T., Limjindaporn, T. (2013) Inhibition of p38MAPK and CD137 signaling reduce dengue virus-induced TNF- α secretion and apoptosis. *Virology* **10**:105.

Najarro, P., Traktman, P., e Lewis, J.A. (2001) Vaccinia virus blocks gamma interferon signal transduction: viral VH1 phosphatase reverses Stat1 activation. *J Virol* **75**(7), 3185-3196.

Naranatt, P.P., Akula, S.M., Zien, C.A., Krishnan, H.H., Chandram, B., Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus induces de phosphatidylinositol 3-kinase-PKC- ζ -MEK-ERK signaling pathway in target cells early during infection: Implication for infectivity. *J. Virol.* **77**(2), 1524-2539.

Newsome, T.P., Scaplehorn, N., e Way, M. (2004) Src mediates a switch from microtubule- to actin-based motility of Vaccinia virus. *Science* **306**(5693), 124-129.

Newsome, T.P., Weisswange, I., Frischknecht, F., e Way, M. (2006) Abl collaborates with Src family kinases to stimulate actin-based motility of vaccinia virus. *Cell. Microbiol.* **8**(2), 233-241.

O'Keefe SJ, Mudgett JS, Cupo S, Parsons JN, Chartrain NA, Fitzgerald C, Chen SL, Lowitz K, Rasa C, Visco D, Luell S, Carballo-Jane E, Owens K, Zaller DM. (2007) Chemical genetics define the roles of p38alpha and p38beta in acute and chronic inflammation. *J Biol Chem* **282**(48), 34663-71.

Oliveira, L.C. (2013) Papel exercido pelos reguladores transcricionais Egr-1 e c-Fos sobre a disseminação do *Vaccinia virus*. Tese de doutorado. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.

Owens, DM, Keyse, SM. (2007) Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases. *Oncogene* **26**, 3203-13.

Pan, H., Xie, J., Ye, F., Gao, S.J. (2000) Modulation of Kaposi's sarcoma associated herpesvirus infection and replication by MK/ERK, JNK, e p38 multiple mitogen-activated kinase pathways during primary infection. *J. Virol.* **80**(11), 5371-5382.

Parrish, S. e Moss, B. (2006) Characterization of a *Vaccinia virus* mutant with a deletion of the D10L gene encoding a putative negative regulator of gene expression. *J Virol* **80**(2), 553-61.

Parrish, S. e Moss, B. (2007) Characterization of a second *Vaccinia virus* mRNA-decapping enzyme conserved in poxviruses. *J Virol* **81**(23), 12973-8.

Pereira AC, Leite FG, Brasil BS, Soares-Martins JA, Torres AA, Pimenta PF, Souto-Padrón T, Traktman P, Ferreira PC, Kroon EG, Bonjardim CA. (2012a) A vaccinia virus-driven interplay between the MKK4/7-JNK1/2 pathway and cytoskeleton reorganization. *J Virol* **86**(1), 172-84.

Pereira, A.C., Soares-Martins, J.A., Leite, F.G., Da Cruz, A.F., Torres, A.A., Souto-Padrón, T., Kroon, E.G., Ferreira, P.C., Bonjardim C.A. (2012b) SP600125

inhibits Orthopoxviruses replication in a JNK1/2 -independent manner: Implication as a potential antipoxviral. *Antiviral Res* **93**(1):69-77.

Perfettini, J.L., Castedo, m., Nardacci, r., Ciccocanti, F., Boya, P., Roumier, T., Larochette, N., Piacentini, M., e Kroemer, G. (2005) Essential role of p53 phosphorylation by p38 MAPK in apoptosis induction by the HIV-1 envelope. *J. Exp. Med.* **201**, 279-289.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Schmelz, M., Sodeik, B., Ericsson, M., Wolffe, E.J., Shida, H., Hiller, G., Griffiths, G. (1994) Assembly of vaccinia virus: the second wrapping cisterna is derived from the trans Golgi network. *J Virol* **68**(1):130-47.

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

Schmidt, F.I., Bleck, C.K.E., Reh, L., Novy, K., Wollscheid, B., Helenius, A., Stahlberg, H., Mercer, J. (2013) Vaccinia Virus Entry Is Followed by Core Activation and Proteasome-Mediated Release of the Immunomodulatory Effector VH1 from Lateral Bodies. *Cell Rep* **4**, 1-13.

Schweneker M, Lukassen S, Späth M, Wolferstätter M, Babel E, Brinkmann K, Wielert U, Chaplin P, Suter M, Hausmann J. (2012) The vaccinia virus O1 protein is required for sustained activation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 and promotes viral virulence. *J Virol* **86**(4), 2323-36.

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

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

Shchelkunov, S.N. (2013) An increasing danger of zoonotic orthopoxvirus infections. *PLoS Pathog* **9**(12):e1003756.

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

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

Silva, P.N.G., Soares, J.A.P., Brasil, B.S.A.F., Nogueira, S.V., Andrade, A.A., de Magalhães, J.C., Bonjardim, M.B., Ferreira, P.C.P., Kroon, E.G., Bruña-Romero, O., e Bonjardim, C.A. (2006) Differential role played by the MEK/ERK/EGR-1 pathway in orthopoxviruses vaccinia and cowpox biology. *Biochem J* **398**(1), 83-95.

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

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

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

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

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

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

Stack, J., Hurst, T.P., Flannery, S.M., Brennan, K., Rupp, S., Oda, S., Khan, A.R., Bowie, A.G. (2013) Poxviral protein A52 stimulates p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) activation by causing tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF6) self-association leading to transforming growth factor β -activated kinase 1 (TAK1) recruitment. *J Biol Chem* **288**(47):33642-53.

Staples, CJ, Owens, DM, Maier, JV, Cato, ACB, Keyse, SM. (2010) Cross-talk between the p38alpha and JNK MAPK Pathways Mediated by MAP Kinase Phosphatase-1 Determines Cellular Sensitivity to UV Radiation. *J Biol Chem* **285**(34), 25928-40.

Stroobat, P., Rice, A.P., Gullick, W.J., Cheng, D.J., Kerr, I.M., Waterfield, M.D. (1985) Purification and characterization of vaccinia virus growth factor. *Cell* **42**, 383-93.

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

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

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

Takekawa, M., Adachi, M., Hakahata, A., Nakayama, I., Itoh, F., Tsukuda, H., Taya, Y., Imai, K. (2000) p53-inducible Wip1 phosphatase mediates a negative feedback regulation of p38 MAPK-p53 signaling in response to UV radiation. *EMBO J* **19**(23), 6517-26.

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

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

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

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

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

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

Tooze, J., Hollinshead, M., Reis, B., Radsak, K., Kern, H. (1993) Progeny vaccinia and human cytomegalovirus particles utilize early endosomal cisternae for their envelopes. *Eur J Cell Biol* **60**(1):163-78.

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

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

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

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

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

Twardzik, D.R., Brown, J.P., Ranchalis, J.E., Todaro, G.J., Moss, B. (1985) Vaccinia virus-infected cells release a novel polypeptide functionally related to transforming and epidermal growth factors. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**, 5300-4.

Unger, B., Mercer, J., Boyle, K.A., Traktman, P. (2013) Biogenesis of the vaccinia virus membrane: genetic and ultrastructural analysis of the contributions of the A14 and A17 proteins. *J Virol* **87**(2):1083-97.

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

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

Vermeulen, K., Van Bockstaele, D.R., Berneman, Z.N. (2003) The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif* **36**, 131-149.

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

Wali, A., Strayer, D.S. (1999) Infection with Vaccinia Virus Alters Regulation of Cell Cycle Progression. *DNA Cell Biol* **18**(11), 837-43.

Walsh, D., Arias, C., Perez, C., Halladin, D., Escandon, M., Ueda, T., Watanabe-Fukunaga, R., Fukunaga, R., e Mohr, I. (2008) Eukaryotic translation initiation

factor 4F architectural alterations accompany translation initiation factor redistribution in poxvirus-infected cells. *Mol. Cell. Biol.* **28**(8), 2648-2658.

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

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

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

Wang, H., Xu, Q., Xiao, F., Jiang, Y., Wu, Z. (2008) Involvement of the p38 Mitogen-activated Protein Kinase alpha, beta and gamma Isoforms in Myogenic Differentiation. *Mol Biol Cell* **19**, 1519-28.

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

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

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

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

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

Teferi, W.M., Dodd, K., Maranchuk, R., Favis, N., Evans, D.H. (2013) A Whole-Genome RNA Interference Screen for Human Cell Factors Affecting Myxoma Virus Replication. *J Virol* **87**(8), 4623-41.

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

Xing, B., Bachstetter, A.D., Van Eldik, L.J. (2013) Deficiency in p38b MAPK Fails to Inhibit Cytokine Production or Protect Neurons against Inflammatory Insult in In Vitro and In Vivo Mouse Models. *PLoS ONE* **8**(2), e56852.

Yoo, NK, Pyo, C.W., Kim, Y., Ahn, B.W., Choi, SY. (2008) Vaccinia virus-mediated cell cycle alteration involves inactivation of tumour suppressors associated with Brf1 and TBP. *Cell Microbiol* **10**(3), 583-92.

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

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

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

Zhang, H., Monken, C.E., Zhang, Y., Lenard, J., Mizushima, N., Lattime, E.C., Jin, S. (2006) Cellular autophagy machinery is not required for vaccinia virus replication and maturation. *Autophagy* **2**(2):91-5.

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