

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Mariana Araújo Costa

**CONSTRUÇÃO DE UM *VACCINIA VIRUS* RECOMBINANTE  
EXPRESSANDO A PROTEÍNA TIROSINA FOSFATASE 1B (PTP1B)**

Belo Horizonte

2017

Mariana Araújo Costa

**CONSTRUÇÃO DE UM *VACCINIA VIRUS* RECOMBINANTE  
EXPRESSANDO A PROTEÍNA TIROSINA FOSFATASE 1B (PTP1B)**

Dissertação de mestrado apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Microbiologia do Instituto de Ciências  
Biológicas da Universidade Federal de  
Minas Gerais

Orientador: Prof. Cláudio Antônio  
Bonjardim

Co-orientador: Dr. Leonardo Camilo de  
Oliveira

Belo Horizonte

2017

## AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Maria do Socorro Araújo Costa, que está sempre presente comigo, acompanhando ativamente todas as etapas de minha vida, sempre me dando um grande incentivo.

Ao meu pai, Pedro Vicente Costa Sobrinho (*in memoriam*), que foi de grande importância para minha carreira acadêmica e sempre me ajudou da maneira que pôde.

Aos meus irmãos Tatiana e Helio, que amo muito.

Ao meu orientador Prof. Cláudio, obrigada pela oportunidade, pelos conselhos, paciência e pela solicitude.

Aos professores do Laboratório de vírus da UFMG, Paulo César Peregrino, Erna Geissien Kroon, Giliane Trindade, Jonatas Abrahão, e Betania Drumond, pelos ensinamentos e exemplo de competência.

A todos os meus colegas GTS, Luisinho, Hugo, Camila, Jonas, Alice, Jônatas, Aluísio, Nídia, Diogo e Claudiney.

Aos meus colegas de laboratório Grazi e Maurício, pela amizade, carinho, paciência e ajuda nas horas de “aperreio”. A Livia e Izabela pela companhia nos fins de semana nas capelas de vírus e pela contribuição no meu trabalho. Ao Luisinho, meu “irmão de mestrado” e companheiro nos “western-blot”. Ao Jonas pelos conselhos e a paciência de discutir todos os artigos GTS comigo, isto foi muito importante para minha formação. À Camileche seus conhecimentos em genética forma muito importantes para mim. À Deinha, minha amiga, que eu sempre perturbava nas horas de sequenciamento. Ao Luis Adan e Thiago Leão, por sua contribuição e ajuda constante durante o mestrado.

Ao Hugo companheiro de todos os momentos, meu revisor e orientador. Obrigada por todas as noites sem dormir, me ajudando nas apresentações e por aguentar tanto choro quando os “western-blot” davam errado.

Ao Paulo e Diogo meus companheiros de barzinho. Os momentos descontraídos foram muito importantes.

À Jaque, minha ex companheira de republica. Obrigada por tudo, todas as vezes que eu te fiz vim no final de semana, só para olhar como as “minhas células” estavam.

A todos do Laboratório de Vírus, que contribuíram para minha formação, sempre foram muito solícitos quando eu estava com dúvidas ou precisava de ajuda. Paulinha, Lorena, Ana Claudia, Poli, Felipe, Carol, Fábio, Danilo, Lêê e Galis.

Ao meu co-orientador Léo, pois sua orientação foi vital para meu trabalho. Mesmo estando longe, e não me conhecendo direito, você foi de grande ajuda. Muito obrigada por todos os protocolos, pelas discussões, conselhos e orientações. Você para mim é um grande exemplo de pesquisador.

À CAPES, CNPq e FAPEMIG, pelo auxílio financeiro, que permitiu a execução desse projeto.

**ÍNDICE GERAL:**

LISTA DE FIGURAS .....	VIII
LISTA DE TABELAS .....	IX
LISTA DE ABREVIATURAS .....	X
RESUMO .....	XIV
<i>ABSTRACT</i> .....	XV
1 - INTRODUÇÃO .....	1
1.1 - OS POXVÍRUS .....	1
1.1.1 - ASPECTOS HISTÓRICOS .....	1
1.1.2 - A FAMÍLIA <i>Poxviridae</i> .....	2
1.1.3 - MORFOLOGIA VIRAL .....	2
1.1.4 - GENOMA DOS POXVÍRUS .....	4
1.1.5 - CICLO DE MULTIPLICAÇÃO DOS POXVÍRUS .....	5
1.2 - AS PROTEÍNAS CINASES ATIVADAS POR MITÓGENOS (MAPK).....	10
1.3 - POXVÍRUS: INTERAÇÃO VÍRUS-HOSPEDEIRO .....	12
1.4 - O GENE DE RESPOSTA PRECOCE AO CRESCIMENTO ( <i>egr-1</i> ) .....	15
1.5 - A PROTEÍNA TIROSINA FOSFATASE 1B (PTP1B).....	16
2 - JUSTIFICATIVA .....	21
3 - OBJETIVOS .....	23
3.1 - OBJETIVO GERAL: .....	23
3.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS: .....	23
4 – FLUXOGRAMA DE TRABALHO .....	24
5 - MATERIAIS E MÉTODOS .....	25
5.1 - CÉLULAS .....	25
5.1.1 - MEF WT E MEF <i>egr-1</i> <sup>-/-</sup> .....	25

5.1.2 - BSC-40 .....	25
5.2 - VÍRUS .....	25
5.3 - CONSTRUÇÃO DO GENE SINTÉTICO <i>ptpn1</i> E CLONAGEM NO VETOR DE EXPRESSÃO pVOTE.1.....	26
5.4 - CONFIRMAÇÃO DO INSERTO <i>ptpn1</i> NO PLASMÍDEO pVOTE.1.....	26
5.5 - GERAÇÃO DO VÍRUS RECOMBINANTE .....	27
5.6 - SELEÇÃO DO VÍRUS RECOMBINANTE.....	28
5.7- TITULAÇÃO VIRAL .....	30
5.8 - DETECÇÃO DO GENE <i>ptpn1</i> NO VÍRUS RECOMBINANTE.....	30
5.9 - SEQUENCIAMENTO.....	31
5.10 - REAÇÃO DE PCR QUANTITATIVO.....	33
5.11 - TRANSFERÊNCIA DE <i>WESTERN BLOT</i> .....	34
4.12 - PRODUÇÃO DO ESTOQUE VIRAL .....	35
5.13 - PURIFICAÇÃO VIRAL.....	35
5.14 - FENÓTIPO DA PLACA DE LISE .....	36
5.15 - MICROSCOPIA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA .....	36
5.16 - ANTICORPOS .....	36
5.17 - ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	37
6 - RESULTADOS .....	38
6.1 - CONSTRUÇÃO E CONFIRMAÇÃO DA PRESENÇA DO INSERTO NO PLASMÍDEO PVOTE.1 .....	38
6.2 - GERAÇÃO DO VÍRUS RECOMBINANTE .....	43
6.3 - DETECÇÃO DA REGIÃO DO MARCADOR FLAG NO GENE SINTÉTICO DE PTP1B E SEQUENCIAMENTO DO VÍRUS RECOMBINANTE .....	44
6.4 - DETECÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA TIROSINA FOSFATASE PTP1B POR WESTERN BLOT EM CÉLULAS BSC-40.....	47
6.5 - DETECÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA PTP1B E DE SEU RNA MENSAGEIRO EM MEF.....	48

6.6 - AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE MULTIPLICAÇÃO E DISSEMINAÇÃO DO VÍRUS RECOMBINANTE.....	52
6.7 - EXPRESSÃO DE PTP1B EM MEF WT OU NOCAUTES PARA <i>egr-1</i> INFECTADOS COM O VÍRUS RECOMBINANTE.....	55
V - DISCUSSÃO .....	59
VI - CONCLUSÃO.....	63
VII - PERSPECTIVAS .....	64
VIII - BIBLIOGRAFIA .....	65

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA PARTÍCULA DO <i>VACCINIA VIRUS</i> . .....	4
FIGURA 2. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO GENOMA DOS POXVÍRUS. ....	5
FIGURA 3. CICLO DE MULTIPLICAÇÃO DOS POXVÍRUS. ....	9
FIGURA 4. TRANSPORTE VIA MICROTÚBULOS. ....	9
FIGURA 5. REPRESENTAÇÃO DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS MAPK. ....	11
FIGURA 6. VIAS DE SINALIZAÇÃO MODULADAS PELO VACV. ....	14
FIGURA 7. ESTRUTURA ESQUEMÁTICA DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO EGR-1. ....	16
FIGURA 8. DOMÍNIOS ESTRUTURAIS E SÍTIOS DE FOSFORILAÇÃO DA PTP1B. ....	18
FIGURA 9. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA AÇÃO CATALÍTICA DE PTP1B. ....	19
FIGURA 10. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ATUAÇÃO DE PTP1B SOBRE A DISSEMINAÇÃO DO VACV. ....	20
FIGURA 11. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PVOTE.1. ....	27
FIGURA 12. VIA DE SÍNTESE DE BASES PURINA E SITIO DE INIBIÇÃO DO ÁCIDO MICOFENÓLICO. ....	29
FIGURA 13. INICIADORES UTILIZADOS PARA O SEQUENCIAMENTO DO INSERTO <i>ptpn1</i> . ....	32
FIGURA 14. CONSTRUÇÃO E CONFIRMAÇÃO DO INSERTO DE <i>ptpn1</i> NO PVOTE.1. ....	42
FIGURA 15. ESQUEMA DA RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA ENTRE O PLASMÍDEO PVOTE.1 E SEQUENCIA CODIFICADORA DA HEMAGLUTININA DO VACV VT7LACOI. ....	43
FIGURA 16. AMPLIFICAÇÃO DE <i>ptpn1</i> NO VÍRUS RECOMBINANTE. ....	46
FIGURA 17. EXPRESSÃO DA PROTEÍNA PTP1B EM BSC-40. ....	47
FIGURA 18. DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DA PROTEÍNA E EXPRESSÃO DO RNA MENSAGEIRO DE PTP1B EM CÉLULAS MEF. ....	51
FIGURA 19. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE MULTIPLICAÇÃO VIRAL. ....	54
FIGURA 20. EXPRESSÃO DA PROTEÍNA PTP1B EM MEF WT E <i>egr-1<sup>-/-</sup></i> . ....	58



**LISTA DE TABELAS**

TABELA 1. SEQUÊNCIA DE INICIADORES UTILIZADOS PARA AMPLIFICAR O GENE DE <i>ptpn1</i> (DADOS DO LABORATÓRIO DE VÍRUS) .....	31
TABELA 2. SEQUÊNCIAS DOS INICIADORES UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE PCR EM TEMPO REAL (DADOS DO LABORATÓRIO DE VÍRUS).....	34

## LISTA DE ABREVIATURAS

μL- microlitro

5-LO-5-lipoxigenase

AMP- Adenosina monofosfato

AMPS- Adenil succinato

ARAV- Araçatuba vírus

ARP 2/3- Proteína relacionada à actina 2/3

ATCC- “American Type Culture Collection”

AKT- Proteína cinase B

CDC- Centro de controle de doença dos Estados Unidos

CPXV- *Cowpox virus*

CRE- Elemento de resposta ao AMP cíclico

CTGV- Cantagalo vírus

CO<sub>2</sub>- Dióxido de carbono

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

DTT- Ditioneitol

EBS- Sítio de ligação à *egr-1*

EEV- Vírus envelopado extracelular

EFC - Complexo de fusão-penetração

EGFR- Receptor do fator de crescimento epidérmico

*egr-1*- Gene de resposta precoce ao crescimento

ELK-1- Fator de transcrição ETS

EV- Vírião extracelular

ERK – cinase regulada por sinal extracelular

GAG- Glicosaminoglicanos

Gb2- Proteína do receptor do fator de crescimento 2

GMP- Guanosina monofosfato

GP1V- Guarani P1 vírus

GP2V- Guarani P2 vírus

GTS- Grupo de Transdução de Sinal

HA- Hemaglutinina

h.p.i- horas pós-infecção

ICAM-1- Molécula de adesão intracelular-1

ICTV- Comitê Internacional de taxonomia de vírus

IFN- Interferon

IGF1-R- Receptor do fator de crescimento de insulina-símile 1

IGF-II- Fator de crescimento insulina-símile tipo 2

IL-2- Interleucina-2

IMV- Vírus maduro intracelular

IMP- Inosina monofosfato

ITR- repetições terminais invertidas

IR- Receptor de insulina

IRS-1/2- Substrato 1/2 do receptor de insulina

JAK2- Cinase Janus 2

JNK- Proteína Quinase c-Jun amino-terminal

LB- Luria Bertani

MAP-1B- Proteína associada à microtúbulos -1B

MAPK- Proteínas cinases ativadas por mitógenos

MAPKK- MAPK cinase

MAPKKK- MAPKK cinase

MARV- Mariana vírus

M-CSF- Fator estimulante de colônias de macrófagos

MEF- Fibroblastos embrionários murinos

MOI- Multiplicidade de infecção

MSK- Cinase ativada por stress e mitógenos

MNK- MAPK- cinase de interação

IIMV- Vírião maduros

NFAT- Fator nuclear de células T ativadas

NLS- Sequência de localização nuclear

OMS- Organização mundial da saúde

OPXV- *Orthopoxvirus*

PAK-1- Proteína serina/ treonina cinase 1

PCI- Fenol: Clorofórmio: Álcool Isoamílico

PDGFR- Receptor do fator de crescimento derivado de plaqueta

PERK- Proteína cinase tipo PKR residente no retículo endoplasmático

PI3K - fosfatidilinositol 3-cinase

PKR- Proteína cinase ativada por RNA

PMSF- Fenilmetilsulfonilfluoreto

PRPP- 5-fosforibosil 1-pirofosfato

PSTV- Passatempo vírus

PTB- Fosfotirosina-ligantes

PTP- Proteína tirosina fosfatase

PTP1B- Proteína tirosina fosfatase 1B

RelA- Subunidade do fator nuclear  $\kappa$ B

RSK- Cinasesribosomal S6

RTK- Receptor de tirosina cinase

Sf-1- Fator esterodogênico1

SFB- Soro fetal bovino

SH2- Domínio homólogo a Src2

SLO- Operador lac

SOS- Filhos de sevenless

SRE- Elemento de resposta ao soro

STAM2- Molécula adaptadora de transdução de sinal humano2

TYK2- Tirosina-Cinase2

VARV- *Variola virus*

VACV- *Vaccinia virus*

WASP- Proteína da Síndrome Wiskott–Aldrich

WIP- Proteína de interação a N-WASP

XMP- Xantosina monofosfato

## RESUMO

Os poxvírus são uma família de vírus de DNA que se multiplicam inteiramente no citoplasma das células, estes vírus apresentam um amplo espectro de hospedeiro podendo infectar tanto seres vertebrados e invertebrados, para isto estes vírus co-optam vias sinalização celular do hospedeiro, criando um ambiente propício para o estabelecimento da infecção. Em estudos anteriores do nosso grupo, foi possível verificar que o *Vaccinia virus* (VACV) ativa a via MEK/ERK, induzindo o acúmulo dos fatores de transcrição, tais como Egr-1, ATF-2, c-Fos e c-Jun. A estimulação da expressão de Egr-1 mostrou-se importante para a multiplicação do VACV, e para a disseminação célula-a-célula de partículas virais envelopadas (EV) do VACV e do *Cowpox virus* (CPXV). Uma das hipóteses investigadas pelo nosso grupo é a de que o efeito de Egr-1 na disseminação de partículas EV se dá através da regulação da expressão de outro fator do hospedeiro, a Proteína Tirosina Fosfatase 1B (PTP1B). Dessa forma, a ativação de Egr-1 induzida por poxvírus levaria à repressão da expressão de PTP1B, o que permitiria a ativação de cinases fundamentais para o processo de formação de caudas de actina que propõem formas EV para células vizinhas não infectadas. De forma a corroborar a hipótese acima, o objetivo deste estudo foi criar um VACV recombinante no qual a expressão de PTP1B pode ser controlada por IPTG, para avaliar se o papel facilitador de Egr-1 na disseminação do VACV se deve à regulação da expressão da fosfatase PTP1B. A introdução do gene *ptp1b* se deu por recombinação homóloga no locus do gene A56R (hemaglutinina, HA) da amostra de VACV vT7lacOI utilizando o vetor de transferência pVOTE.1/PTP1B. Após a recombinação foi realizada a seleção do vírus recombinante (vT7lacOI/PTP1B) em células BSC-40 e MEF, a confirmação e validação da expressão exógena de PTP1B por “Transferência de Western” (WB), sequenciamento, imunofluorescência (IF) e RT-PCR. Os resultados obtidos demonstram que a expressão de PTP1B regulada por IPTG ocorreu satisfatoriamente. Em seguida, para corroborar que a expressão de PTP1B é regulada por Egr-1, MEF WT e knockouts para *egr-1* foram infectados com o vT7lacOI/PTP1B e a expressão de PTP1B avaliada por WB. Nossos dados demonstram um acúmulo de PTP1B na ausência de Egr-1 durante a infecção pelo VACV, e evidenciam o aumento nos níveis de PTP1B após o tratamento das células infectadas com IPTG. Em conjunto, construiu-se uma ferramenta útil para análise do papel do acúmulo de PTP1B na biologia viral do VACV. Isso possibilitará a investigação mais detalhada do papel de PTP1B na liberação de partículas EV dos poxvírus.

Palavras-chaves: *Vaccinia virus*, PTP1B, *egr-1*, vírus recombinante, expressão de proteína.

## ***ABSTRACT***

Poxviruses are family of DNA viruses that multiply in the cytoplasm of the cells, these viruses have a broad spectrum of hosts that can infect both vertebrate and invertebrate, for which these viruses co-opt host cell signaling to creating an adequate environment for infection and multiplication. In previous studies, our group verified that *Vaccinia virus* (VACV) activates the MEK / ERK pathway, inducing accumulation of the transcription factors, such as Egr-1, ATF-2, c-JUN, c-FOS. The stimulation of Egr-1 expression showed to be important for VACV multiplication, and for cell-to-cell spread of enveloped viral particles (EV) of VACV and *Cowpox virus* (CPXV). One of the hypotheses investigated by our group is the effect of Egr-1 on the spread of EV particles occurs through the regulation of the expression of Protein Tyrosine Phosphatase 1B (PTP1B), another host factor. In this way, the activation of poxvirus-induced Egr-1 leads to the suppression of PTP1B expression, which allows the activation of kinases that are important to polymerize actin tails that transport EV to neighboring uninfected cells. Thus, in order to corroborate this hypothesis, the objective of this study was to create a recombinant VACV in which the expression of PTP1B can be controlled by IPTG. To, evaluate if the assisting role of Egr-1 in the dissemination of VACV is due to the regulation of the expression of phosphatase PTP1B. Insertion of *ptp1b* gene was done by homologous recombination at the locus of the A56R (hemagglutinin, HA) from VACV strain vT7lacOI, using the transport vector pVOTE.1/PTP1B. After this, recombinant virus selection was performed on BSC-40 and MEF cells ; confirmation and validation of exogenous PTP1B expression was done with Western blotting (WB), sequencing, evaluation of viral fitness, immunofluorescence (IF) and qPCR. The results obtained demonstrate that the expression of IPTG-regulated PTP1B has occurred satisfactorily. Moreover, to corroborate that the expression of PTP1B is regulated by Egr-1, MEF WT and knockouts to *egr-1* were infected with vT7lacOI/PTP1B and evaluated for PTP1B expression with WB. Our data demonstrate an accumulation of PTP1B in the absence of Egr-1 during VACV infection, and indicate the increase in PTP1B levels after treatment of IPTG-infected cells.

Altogether, a very useful tool was developed to analyze the role of PTP1B accumulation in VACV viral biology. This will enable more detailed investigation of the role of PTP1B in the release of poxvirus EV particles.

Key words: *Vaccinia virus*, PTP1B, *egr-1*, recombinant virus, protein expression.

# 1 - INTRODUÇÃO

## 1.1 - OS POXVÍRUS

### 1.1.1 - ASPECTOS HISTÓRICOS

O *Variola virus* (VARV), um membro do gênero *Orthopoxvirus* (OPXV), é o agente causador da varíola, doença que se disseminou mundialmente, causando morte e mutilação. No século 18, estima-se que somente na Europa, quatrocentas mil pessoas morreram a cada ano (RIEDEL, 2005; GOLDEN e HOPPER, 2011). Com o intuito de combater essa doença infecciosa, o pesquisador Edward Jenner introduziu a técnica de vacinação. Ao observar que ordenhadoras que entravam em contato com vacas infectadas com a varíola bovina (ocasionada pelo *Cowpox virus* outro OPXV), desenvolviam uma proteção contra a varíola humana, Jenner inoculou material biológico proveniente de uma ordenhadora infectada, em um garoto, e subsequentemente o desafiou com o VARV, demonstrando que o menino era resistente a varíola (SMITH e MCFADDEN, 2002; GOLDEN e HOPPER, 2011).

No ano de 1967, Organização Mundial da Saúde (OMS) intensificou o programa de erradicação da varíola, que envolveu a vacinação em massa da população mundial, utilizando diferentes amostras de VACV. Em 1980, a OMS declarou oficialmente a erradicação da varíola e autorizou a manutenção de estoques do vírus em dois laboratórios de referência: o Centro de Controle de Doença (CDC) em Atlanta nos Estados Unidos e o Instituto para Preparações Virais em Moscow na Rússia (SMITH e MCFADDEN, 2002; MCFADDEN, 2010; GOLDEN e HOPPER, 2011; MISHRA, 2012; THÈVES, CRUBÉZY e BIAGINI, 2016).

Com a erradicação da varíola, a vacinação foi interrompida, e continuada somente em trabalhadores de laboratório, militares e pessoas que trabalham com VACV e outros OPXVs (SINGH, et al., 2012). Portanto, grande parte da população mundial não tem imunidade contra o vírus da varíola e outras infecções causadas por OPXVs, o que permite a contínua circulação dos vírus deste gênero na população humana, sendo relatado na literatura, de aumento do número de casos de infecções zoonóticas, havendo a necessidade de um contínuo estudo acerca destes vírus (TRINDADE et al., 2007; PAULI G., et al., 2010; SHCHELKUNOV, 2013). Além da importância em saúde pública, os poxvírus têm sido estudados como vetor de expressão, agente oncolítico e como vetores vacinais, abrindo portas, para novas estratégias terapêuticas (MCFADDEN, 2005; MOSS, 2013)



### 1.1.2 - A FAMÍLIA *Poxviridae*

Os vírus da família *Poxviridae* possuem genoma composto por DNA dupla fita linear que varia de 130-300 Kbp, cujas extremidades são unidas covalentemente formando uma alça. Esses vírus possuem um sistema enzimático complexo capaz de sintetizar e modificar RNAm, e diferente da maioria dos outros vírus de DNA, se replicam no citoplasma da célula hospedeira (MOSS, 2013).

De acordo com o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (ICTV), os poxvírus são agrupados em duas subfamílias, *Chordopoxvirinae* e *Entomopoxvirinae*, a primeira subfamília compreende vírus que infectam vertebrados e a segunda de vírus que infectam invertebrados. A subfamília *Chordopoxvirinae* compreende 10 gêneros, que apresentam uma característica singular, devido a uma grande variação no espectro de hospedeiro dos vírus, mesmo entre espécies de vírus estritamente relacionados de um único gênero, pode haver enorme diferença quanto à variedade de hospedeiros susceptíveis à infecção. Por exemplo, o vírus da varíola é estritamente específico para seres humanos, porém, vírus do mesmo gênero OPXV como o *CPXV* e o *Monkeypox virus* (MPXV) infectam uma grande variedade de espécies de mamíferos (HALLER et al., 2014).

Dentro da subfamília *Chordopoxvirinae*, o gênero *Orthopoxvirus* é o mais extensivamente estudado, sendo que os genomas de muitas espécies e amostras deste gênero já foram completamente sequenciados. Os membros pertencentes a este gênero são: *Variola virus*, *Vaccinia virus*, *Camelpox virus*, *Cowpox virus*, *Ectromelia virus*, *Monkeypox virus*, *Raccoonpox virus*, *Skunkpox virus*, *Taterapox virus* e *Volepox virus*. O VACV é o protótipo do gênero (JACOBS, et al., 2009; HALLER et al., 2014, ICTV, 2014).

### 1.1.3 - MORFOLOGIA VIRAL

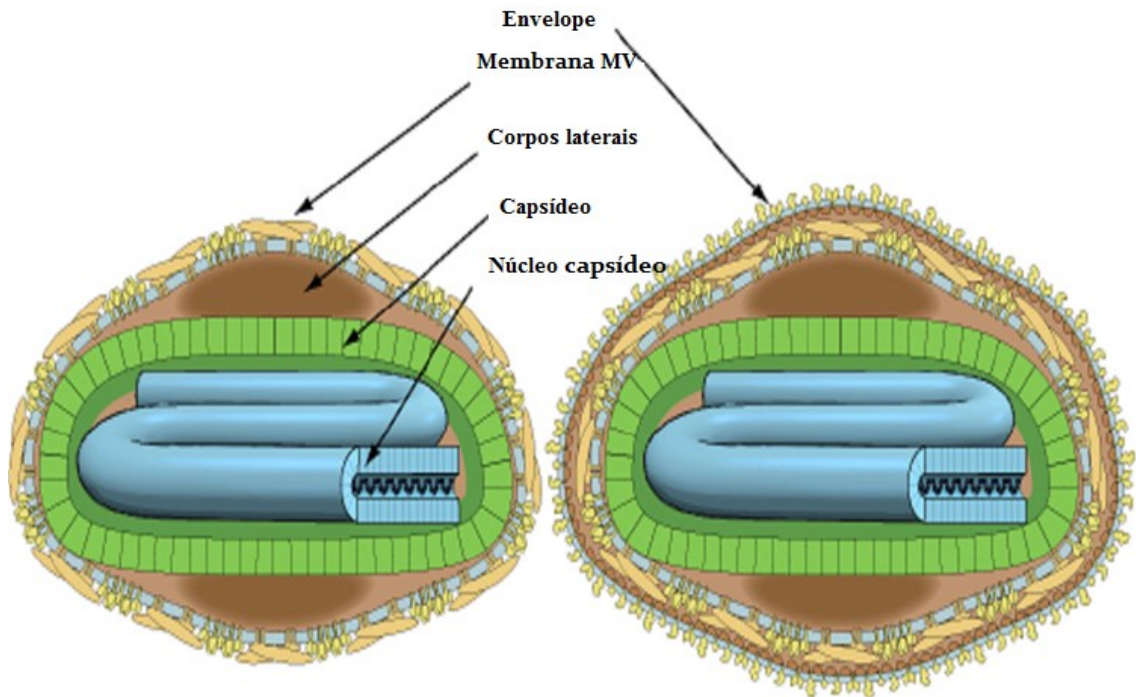
Os membros da família *Poxviridae* apresentam uma morfologia similar, as principais proteínas que os compõe são, em sua maioria, conservadas tanto em termos de estrutura como de função (MCFADDEN, 2005). Os aspectos morfológicos abordados serão embasados no VACV, o protótipo da família.

A morfologia destes vírus é complexa, apresentando duas formas infecciosas distintas. A primeira a ser formada é denominada vírus maduro intracelular (IIMV) ou vírions maduros

(IIMV); essa partícula possui uma única membrana composta por bicamada lipídica e permanece no interior da célula, até a lise celular, quando é liberada. A segunda forma é o vírus envelopado extracelular (EEV) e apresenta uma membrana adicional. Quando liberado na superfície da célula é denominado vírus envelopado associado célula (CEV), que será disseminado célula a célula através da formação de caudas de actina. Tanto EEV como CEV podem ser chamados de vírions extracelulares (EV) (ROBERTS e SMITH, 2008; MOSS, 2013; CZERNY, 2015) (FIGURA 1).

O IIMV apresenta um formato de tijolo, com dimensões de 360x270x250 nm. Apresentam uma membrana externa, de natureza lipídica, de 5-6 nm de espessura. A sua estrutura interna é complexa, constituída por um cerne com formato de haltere e corpos laterais entre as concavidades e a membrana externa, que são compostos principalmente por fosfoproteína F17, além da fosfatase de dupla especificidade VH1 e a glutaredoxina G4. A parede do cerne parece ser composta por duas camadas com espessura total de 18 a 19 nm. A camada interna parece ser constituída por uma membrana lipídica quase que contínua, com um pequeno número de canais. A camada externa tem uma estrutura em paliçada com picos em formato de T, que estão ancoradas à camada interna. A ultraestrutura do núcleo não foi totalmente elucidada, mas parece conter duas fases, a fase mais densa tem uma morfologia semelhante à fibra sugerindo ser constituída por nucleoproteínas (CONDIT et al., 2006; MOSS, 2013; SCHMIDT, et al., 2013).

Os EEV e CEV são formados a partir do transporte do IIMV por microtúbulos, que adquirem duas membranas através de endosomos ou pelas cisternas *trans*-Golgi e posteriormente são levados para superfície celular. Este envelope adicional contém várias proteínas glicosiladas tais como A33, A34, A56, B5, K2, F13 (SMITH, et al., 2002; MOSS, 2013).



**FIGURA 1. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA PARTÍCULA DO *VACCINIA VIRUS*.**

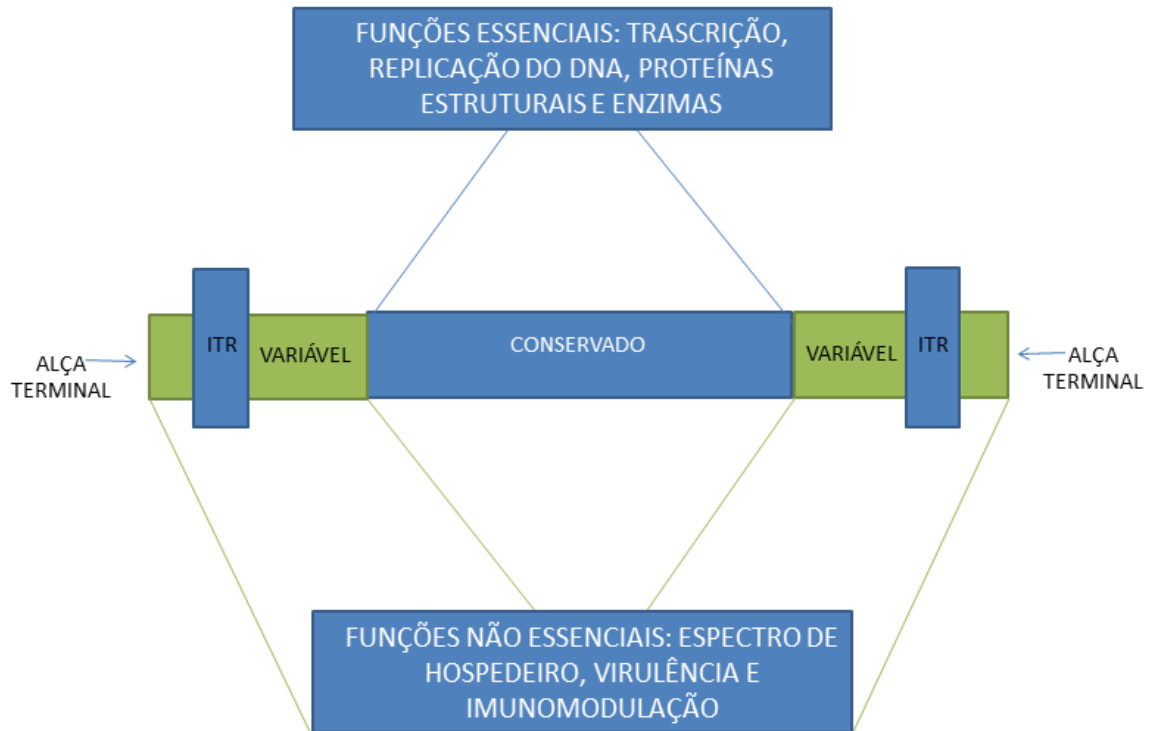
A figura mostra à esquerda a forma de vírion maduro e a direita a partícula viral na forma de vírion extracelular. Disponível em: [http://viralzone.expasy.org/all\\_by\\_species/174.html](http://viralzone.expasy.org/all_by_species/174.html) data de acesso: 12/08/2015.

#### 1.1.4 - GENOMA DOS POXVÍRUS

O genoma dos poxvírus contém uma única molécula linear de DNA dupla fita (dsDNA), variando em tamanho de cerca de 133.000-134.000 bp para os membros do gênero *Parapoxvirus* e *Yatapoxvirus*, a quase 360.000 bp para o vírus *Canarypox*, um membro do gênero *Avipoxvirus*. Os dois telômeros das extremidades do dsDNA formam uma estrutura de “grampo”, covalentemente fechada nos terminais. Próximo às extremidades do genoma viral se localizam as repetições terminais invertidas (ITR), que são sequências idênticas com orientação oposta. Há uma variação de tamanho da ITR nas diferentes espécies, devido a deleções, repetições e transposições (HENDRICKSON, et al., 2010; MOSS, 2013).

O genoma pode ser dividido em duas partes, a região central e as regiões terminais. Os genes da região central codificam funções essenciais ao vírus envolvidas na transcrição, replicação de DNA, morfogênese do vírus e liberação, sendo uma região altamente

conservada entre as espécies e representando aproximadamente 75% do genoma. Os genes presentes nas regiões terminais são mais variáveis entre as espécies e em grande parte estão envolvidos com atividades relacionadas ao espectro de hospedeiro, imunomodulação e



virulência (HENDRICKSON, et al., 2010; MOSS, 2013) (FIGURA 2).

## FIGURA 2. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO GENOMA DOS POXVÍRUS.

O genoma possui duas regiões: Uma região central que codifica proteínas com funções essenciais à multiplicação do vírus e as regiões variáveis que codificam funções não essenciais à multiplicação do vírus em cultura de célula. Fonte: Adaptado de SMITH; McFADDEN, 2002.

### 1.1.5 - CICLO DE MULTIPLICAÇÃO DOS POXVÍRUS

A primeira etapa do ciclo de multiplicação é a adsorção, na qual o vírus interage com receptores celulares. No caso do VACV ainda não se sabe quais dos receptores celulares específicos estão envolvidos nesta interação (MOSS, 2006; MOOS, 2013). No entanto, existem estudos que propõem que há interação entre proteínas de superfície virais dos vírions

maduros A26, A27, D8 e H3 e componentes da superfície extracelular, como glicosaminoglicanos (GAGs) sendo que esta ligação se dá de forma célula-específica e não é essencial para a penetração do vírus (CARTER et al., 2005; SCHMIDT, et al., 2012; MOSS 2013). Com relação, as proteínas de adsorção do EV ainda não foram identificadas (MOSS, 2013).

Após a adsorção ocorre a penetração do vírus na célula hospedeira, por diferentes mecanismos. No caso do IMV esta etapa, pode ocorrer por fusão direta ou por internalização por via endossômica (MOSS, 2013). O mecanismo de fusão direta acredita-se estar envolvido com grande complexo de macromoléculas formadas por proteínas virais do IMV, denominado complexo de fusão-penetração (EFC). Este complexo consiste de nove proteínas transmembrana: A16, A21, A28, G3, G9, H2, J5, L5 e O3, e duas proteínas virais de membrana F9 e L1, que foram denominadas EFC-associadas (LIU et al., 2014). Estas proteínas são necessárias somente para a penetração viral, mas não para o processo de morfogênese, pois sua deleção gera vírus de aspecto normal, porém não infecciosos (MOSS, 2013). A segunda via de internalização do IMV é a internalização por via endossômica mediante macropinocitose, que traz vantagens ao vírus se comparada à fusão direta, pois evita uma série de barreiras celulares como o citoesqueleto celular e o reconhecimento do sistema imune (SCHMIDT et al., 2012) (FIGURA 3).

Durante a etapa de penetração, ocorre o desnudamento primário dos vírus, liberando o cerne viral no citoplasma que posteriormente é transportado através de microtúbulos aos locais de transcrição. O processo transcricional inicia-se logo após o desnudamento do vírus, sendo a síntese de RNAm já detectada 20 min após a penetração. Este processo ocorre em forma de cascata, com três classes de genes: precoce, intermediário e tardio (MOSS, 2013). Os fatores transcricionais necessários para a expressão dos genes intermediários são expressos como proteínas precoces, os fatores transcricionais para a expressão dos genes tardios são produtos dos genes intermediários e os necessários para a transcrição dos genes precoces são produtos dos genes tardios, sendo esses empacotados juntamente com o vírus em formação para atuar no próximo ciclo de infecção (BROYLES, 2003).

Os genes precoces que são expressos logo após a etapa de penetração, constituem a maior parte de genes expressos no VACV, correspondendo à metade dos genes codificados pelo vírus. Estes genes são responsáveis por codificar uma variedade de proteínas, incluindo os fatores de crescimento, moléculas de modulação das vias imunológica, enzimas e fatores

para a replicação e transcrição dos genes intermediários. Após a expressão dos genes precoces inicia-se replicação do DNA viral e a expressão dos genes intermediários a partir do DNA viral. Os genes intermediários serão responsáveis por transcrever fatores de transcrição para genes tardios que irão traduzir proteínas estruturais, enzimas e fatores transcricionais necessários para expressão de genes precoces que serão utilizados durante a nova infecção (BROYLES, 2003; MOSS, 2013).

O processo de morfogênese inicia-se com os crescentes virais, que são constituídas por duas fases distintas, sendo que a fase interior lisa tem a aparência de uma bicamada trilamelar lipoproteica e a fase externa tem uma estrutura em favo de mel. Os crescentes virais são derivados do retículo endoplasmático, e seu processo de formação ocorre por uma ruptura da membrana celular por proteínas virais, gerando uma membrana aberta, que é estabilizada pela proteína de arcabouço D13. Para a formação do vírus imaturo (IV), os crescentes virais aumentam o seu comprimento mantendo a mesma curvatura até tornarem-se esferas fechadas em três dimensões (LIU et al., 2014).

A próxima etapa da morfogênese é a formação do IMV que derivam dos vírus imaturos (IV), estas partículas podem permanecer no citoplasma até ocorrer a lise celular ou serem transportadas por microtúbulos até cisternas *trans*-Golgi ou endossômicas, onde adquirem duas membranas e serão incorporadas a proteínas A33, A34, A36, A56, B5, E2, F12, F13 e K2. Sendo que destas proteínas, a A27, B5 e F13 já se sabe que são necessárias para o processo de envelopamento e geração subsequente do IEV (vírus envelopado intracelular) (LIU et al., 2014).

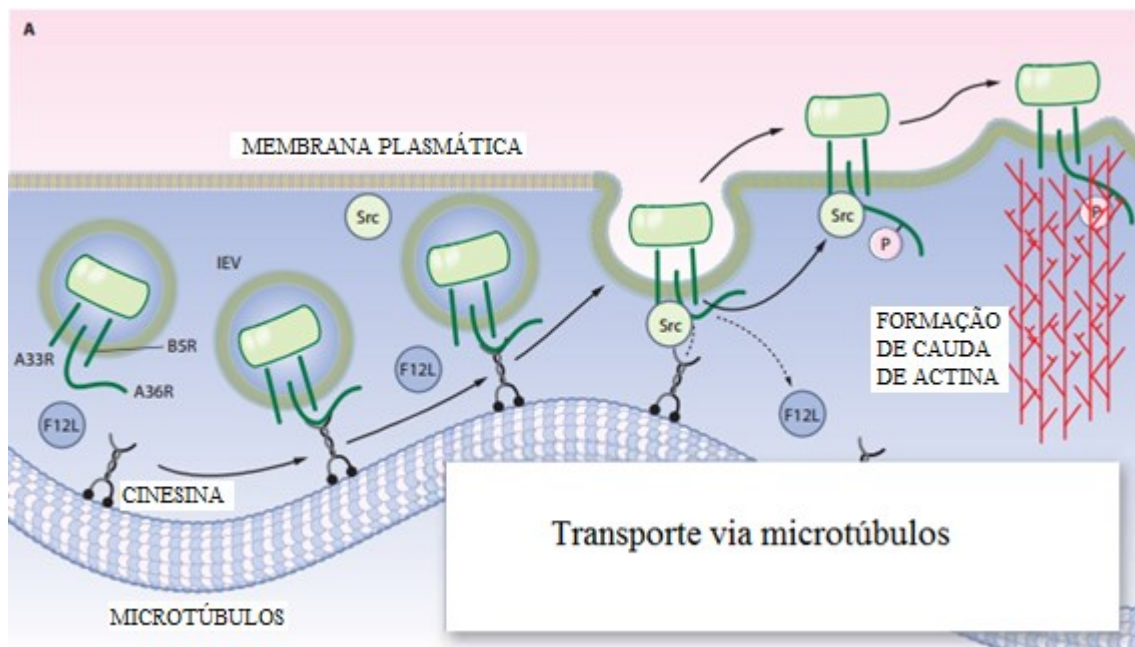
O IEV é transportado via microtúbulos até a membrana plasmática, onde a membrana exterior do IEV funde-se com a membrana plasmática perdendo sua membrana mais externa e são liberados originando os EEV, que serão liberadas ou permanecerão associadas à membrana celular gerando os chamados CEV, que são propelidas para as células vizinhas através de cauda de actina (MOSS, 2013).

O transporte via microtúbulos do IEV requer a interação direta entre a proteína A36R com a cinesina-1. Quando o vírus se encontra na periferia da célula, ocorre a fusão do envelope externo do EV com a membrana plasmática, a proteína A36R do envelope do vírus, é fosforilada pelas proteínas da família de Src nos resíduos Tyr<sup>112</sup> e Tyr<sup>132</sup>, acarretando sua dissociação da cinesina celular e criando sítios de ancoragem para as proteínas Nck e Grb2. Nck recruta um complexo de proteínas formado por WIP (proteína de interação a WASP) e



### FIGURA 3. CICLO DE MULTIPLICAÇÃO DOS POXVÍRUS.

O vírus interage com a célula ocorrendo a adsorção, seguida da penetração e desnudamento primário. Ainda no cerne, ocorre a transcrição de genes precoces e transcrição de DNA polimerase, fatores de transcrição intermediários e RNA polimerase. Após a síntese de proteínas precoces, ocorre o desnudamento secundário e consequente liberação do DNA no citoplasma. A partir do DNA viral são transcritos os genes intermediários como fatores de transcrição para genes tardios que irão transcrever proteínas estruturais, enzimas e fatores transcripcionais para genes precoces. A montagem do vírus ocorre com a formação de estruturas de crescentes virais e a formação do vírus imaturo que através de reações proteolíticas origina o vírion maduro. Este, pode permanecer no citoplasma até ocorrer à lise celular, ou ser transportado por microtúbulos até cisternas *trans*-Golgi ou endossômicas onde adquire duas membranas, formando um intermediário viral IEV. O IEV é transportado via microtúbulos até a superfície da célula, onde o envelope externo da partícula viral se funde à membrana plasmática, liberando uma parte dos vírions no meio extracelular como EEV, enquanto a outra parte permanece associada à célula hospedeira como CEV. Fonte: Adptado Mcfadden, 2005.



### FIGURA 4. TRANSPORTE VIA MICROTÚBULOS.

O transporte via microtúbulos do IEV requer a interação direta entre as proteínas A36R com a cinesina celular sendo a proteína F12L também importante para o transporte. Quando



os vírions encontram-se na periferia da célula, ocorre a fusão com a membrana plasmática. A proteína A36R é fosforilada pela cinases da família de Src. Ocorrendo a dissociação da cinesina celular e o recrutamento do complexo de polimerização havendo a formação da cauda de actina. Fonte: Adaptado de MUNTER et al., 2006.

## 1.2 - AS PROTEÍNAS CINASES ATIVADAS POR MITÓGENOS (MAPK)

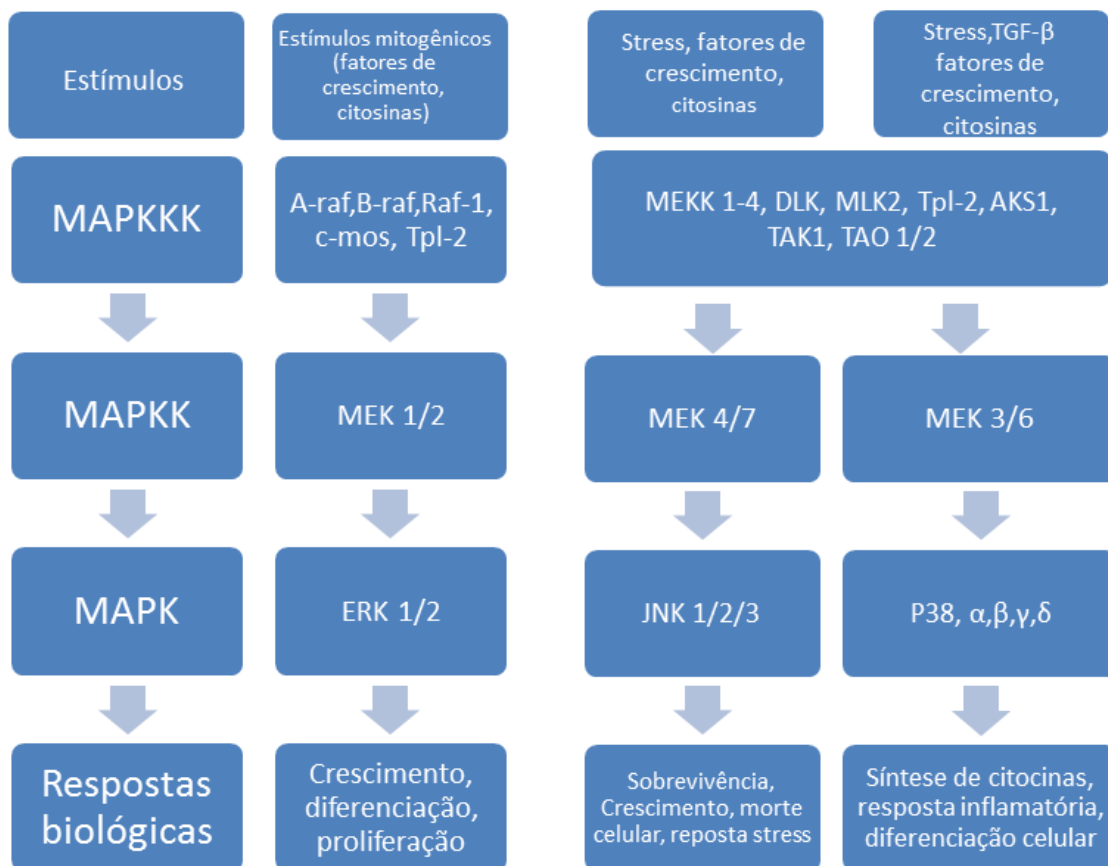
As proteínas cinases ativadas por mitógenos (MAPK) são proteínas serina/treonina cinases (Ser / Thr) que convertem estímulos extracelulares em resposta celular, permitindo que as células respondam de forma coordenada a diversos estímulos como expressão de genes, controle do ciclo celular, metabolismo celular, motilidade, sobrevivência, apoptose e diferenciação, entre outros (KRISHNA et al., 2008; CARGNELLO e ROUX, 2011; BONJARDIM, 2017, no prelo).

Atualmente, foram descritos quatro grupos distintos de MAPK (convencionais) em células de mamíferos: cinase regulada por sinal extracelulare (ERK1/2), cinase de junN-terminal (JNK1/2/3), p38 (p38  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) e ERK 5. Cada grupo de MAPKs é composto por três cinases, que atuam sequencialmente: uma MAPK, uma MAPK cinase (MAPKK), e um MAPKK cinase (MAPKKK) (CARGNELLO e ROUX, 2011) (FIGURA 5).

A ativação das MAP3K ocorre por fosforilação e/ou pelo resultado de interação com pequenas GTPases da família Ras/Rho em resposta a estímulos celulares. As MAPKKK ativadas fosforilam e ativam MAPKK, que por ter dupla especificidade, fosforilam as MAPK nos resíduos, treonina e tirosina em motivo Thr-Xaa-Tyr. Por sua vez, as MAPK ativadas fosforilam seus substratos em resíduos de serina ou treonina, somente quando estes são seguidos por resíduos de prolina. Os substratos das MAPK podem ser MK (proteínas cinases ativadas por MAPK), proteínas do citoesqueleto ou fatores de transcrição (KRISHNA e NARANG, 2008; CARGNELLO e ROUX, 2011).

Dentre estas vias de ativação das MAPK, as mais extensivamente estudadas são as de ERK1/2, JNK e p38. A via de ERK 1/2 é ativada principalmente através de receptores de superfície celular, como o receptor de tirosina-cinase (RTK), que quando se liga a indutores extracelulares, estes ligantes promovem a dimerização do receptor e autofosforilação de resíduos de Tyr no domínio intracelular. Os resíduos fosforilados servem de sitio de ligação específica para proteínas que contenham domínios homólogos a Src2 (SH2) ou fosfotirosina-ligantes (PTB), como Grb2 (proteína ligada ao receptor do fator de crescimento 2). A

interação de Grb2 pode levar a ativação via Ras, que ocorre através de SOS (filhos de sevenless) que estimula a troca de GDP por GTP em Ras ativando-a. Ras em sua conformação ativa interage com os seus efetores alvos, um dos quais é Raf, que integra esse sinal à via MEK/ERK, através de fosforilação de MEK, que por sua vez ativa ERK e fosforila inúmeros substratos, membros das MAPKAKPK, incluindo RSK (cinases ribossomais S6), MSK (cinase ativada por stress e mitógenos) e MNK (MAPK- cinase de interação) (CARGNELLO e ROUX, 2011; BONJARDIM, 2017, no prelo).



**FIGURA 5. REPRESENTAÇÃO DAS VIAS DE SINALIZAÇÃO DAS PROTEÍNAS MAPK.**

As MAPK são compostas por três cinases, que atuam sequencialmente: uma MAPKK cinase (MAPKKK), uma MAPK cinase (MAPKK), e uma MAPK que ativa diversos substratos levando a uma resposta biológica, como demonstrado no quadro da esquerda na figura. A direita da figura está representada três vias ERK, JNK, p38. Fonte: Adaptado de KRISHNA e NARANG 2008.

### 1.3 - POXVÍRUS: INTERAÇÃO VÍRUS-HOSPEDEIRO

As células são constantemente expostas a inúmeros estímulos, sendo essencial para o organismo que elas respondam corretamente. Para que isto ocorra, os sinais iniciais precisam ser decodificados pelas cascatas sinalizadoras para a montagem apropriada de uma resposta biológica, tais como o controle da divisão celular, motilidade celular, reorganização do citoesqueleto, regulação de genes e processos metabólicos, entre outros processos. Dado este envolvimento das vias de sinalização para o controle global da célula, não é surpreendente que os vírus se adaptem para manipular estas rotas de sinalização, para o estabelecimento da infecção mais eficiente (GREBER, 2002; MÜNTER et al., 2006; HALLER et al., 2014).

Neste contexto, é extremamente necessário que os vírus controlem as respostas do sistema imune do hospedeiro. Os denominados genes virais de espectro de hospedeiro têm sido relacionados à antagonização da resposta imune, principalmente no que diz respeito à resposta imune inata. Esta antagonização pode ser feita de inúmeras maneiras tais como, inibição de PKR (Proteína cinase ativada por RNA), inibição de serina proteases, inibição da ativação de NF- $\kappa$ B, inibição da apoptose, inibição do sistema complemento e antagonização dos interferons tipo I ( $\alpha$  e  $\beta$ ), entre outras que ainda devem ser esclarecidas (HALLER et al., 2014).

Além da resposta imune, os vírus ativam inúmeras outras vias de sinalização para estabelecimento da infecção. Várias vias sinalizadoras são reguladas por membros da família *Poxviridae*, e nosso grupo tem tido como alvo de estudo a interação entre fatores virais e componentes da sinalização celular. Trabalhos anteriores, demonstraram que o VACV, ativa a via MEK/ERK que leva a expressão de *egr-1*. A expressão deste gene é importante para a biologia viral, dado que a redução da expressão de Egr-1 através de RNA interferente ou nocaute gênico leva à drástica redução tanto na multiplicação do vírus, quanto no tamanho da placa de lise (de MAGALHÃES et al., 2001; ANDRADE et al., 2004; SILVA et al., 2006; BONJARDIM, 2017, no prelo). A capacidade de indução desta via é compartilhada tanto pelo VACV quanto pelo CPXV. No entanto, para o CPXV a inibição da via MEK/ERK não exerce efeito na multiplicação viral (SILVA et al., 2006; BRASIL, 2010).

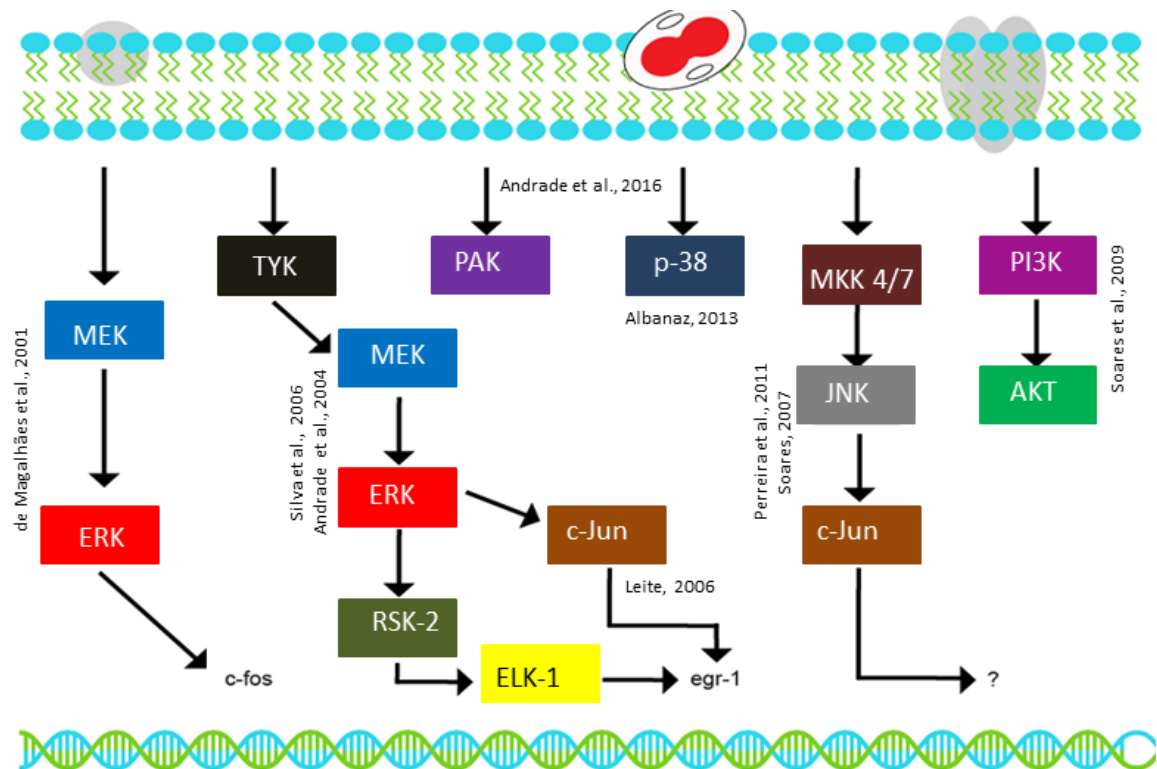
A via PI3K/AKT também é ativada tanto pelo VACV quanto pelo CPXV, sendo a ativação da via relevante para o ciclo de multiplicação de ambos os vírus, visto que inibição farmacológica ou genética da via resulta em queda na produção viral e indução de apoptose das células infectadas (SOARES et al., 2009).

A via de MKK4/7-JNK1/2 está envolvida na regulação da liberação da progênie viral do VACV, através da reorganização do citoesqueleto das células infectadas. As células JNK1/2<sup>-/-</sup> infectadas apresentaram uma acentuada desregulação com relação à organização de rede actina e microtúbulos, bem como do transporte viral à periferia celular, morfologia e migração celular acarretando em aumento do acúmulo de CEV na periferia da célula e da liberação de EEV (PERREIRA et al., 2012).

Estudo realizado por SALGADO e colaboradores (2013), demonstrou que o VACV coopta Rac1, uma RhoGTPase, pertencente a superfamília das pequenas GTPases que participam de inúmeros processos celulares quando ativadas, tais como a dinâmica de actina, adesão celular, reorganização do citoesqueleto, crescimento celular, apoptose, polarização celular, transcrição de genes, migração, tráfico de vesículas e citosinas. Rac1 desempenha um papel importante para o ciclo de multiplicação do VACV e pode estar envolvida na ativação de AKT, o que não ocorreu com CPXV, visto que o rendimento viral do CPXV não foi reduzido em células dominante-negativo Rac1-N17.

O trabalho de ANDRADE e colaboradores (2016), relata que a proteína-treonina cinase PAK1 que anteriormente foi relacionada às etapas de penetração do VACV, também se envolve com etapas posteriores do ciclo de multiplicação viral. O estudo, utilizou células deficientes em PAK<sup>1</sup>, infectadas com VACV, e descreveu a redução da disseminação viral por meio de ensaios de multiplicação, fenótipo de placa e microscopia de fluorescência. Este achado foi correlacionado com ausência de fosforilação de uma subunidade regulatória do complexo ARP 2/3, ARPC1 (Thr21), nas células nocautes, sendo ARP 2/3 importante para a formação das caudas de actina e disseminação do vírus.

Em suma, estes dados demonstram que os poxvírus necessitam manipular várias vias celulares para que ocorra seu ciclo de multiplicação de modo eficiente (FIGURA 6).



**FIGURA 6. VIAS DE SINALIZAÇÃO MODULADAS PELO VACV.**

A infecção pelo VACV leva ativação das vias sinalizadoras MEK-ERK, MKK-JNK, PI3K-Akt, PAK1, p38. A via de MEK/ERK, culmina com a expressão/ativação de ELK-1, c-Jun, *c-fos* e *egr-1*. A via de MKK/JNK, leva a transcrição de *c-jun* importante para a regulação da disseminação viral assim como PAK-1. Sendo também visto ativação da via PI3K/AKT necessária para a inibição do apoptose durante a infecção e multiplicação viral e a via de p38 também importante para multiplicação do VACV. (de MAGALHÃES et al., 2001; ANDRADE et al., 2004; SILVA et al., 2006; SOARES, et al., 2009; PERREIRA et al., 2012; SALGADO et al., 2013; ANDRADE, 2012; ALBANAZ, 2014)

#### 1.4 - O GENE DE RESPOSTA PRECOCE AO CRESCIMENTO (*EGR-1*)

O gene *egr-1* pertence à família de genes imediatamente precoces, que é composta também por *egr-2*, *egr-3* e *egr-4*. É rapidamente e transitoriamente induzido pela resposta a diversos estímulos incluindo, sinais mitogênicos, injúria tecidual, radiação, excitação neuronal e diferenciação, participando a montante e a jusante de muitas vias de transdução de sinais associadas principalmente ao crescimento e proliferação celular (GOSSLAR et al., 1999; PAGEL e DEINDL, 2010).

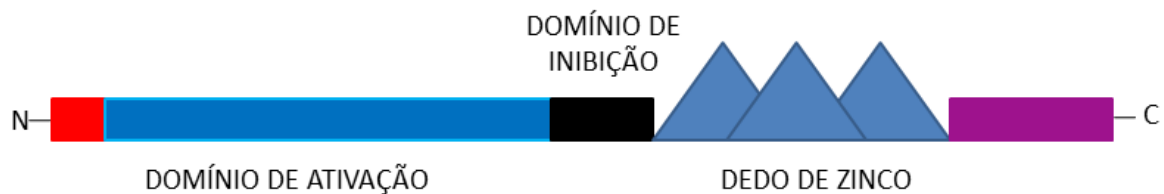
Este gene codifica o fator de transcrição Egr-1, de 533 aa (80-82 kDa), constituído por domínios funcionalmente independentes. A região N-terminal é rica em serina e treonina e o C-terminal contém adicionalmente prolina. O domínio de ligação ao DNA (DBD) é constituído por três motivos de dedo de zinco, que se ligam a sequências promotoras ricas em GC (GCG (T/G) GCG), denominada EBS. Esta proteína também contém, uma sequência de localização nuclear bipartida (NLS), que apresenta uma porção, flanqueando a região N-terminal DBD e outra porção localizada na região da DBD. (PAGEL e DEINDL, 2010).

Além disso, na proteína Egr-1, foi identificado um forte domínio ativador e inibitório. O domínio ativador de EGR-1 está contido em uma extensa região entre os aminoácidos 3-281 e não é bem caracterizado (THIEL e CIBELLI, 2002). Proteínas como a proteína ligadora a região CREB (CBP) e p300 podem interagir com EGR-1 atuando como co-ativadores, maximizando sua capacidade transcritiva. Outras proteínas como Sf-1 (fator esterogênico 1), RelA (subunidade do fator nuclear  $\kappa$ B), NFAT (fator nuclear de células T ativadas), Sp1, e proteínas virais como, Tat (HIV), Tax (HTLV), Hbx (HBV) e IE2 (CMV) também são capazes de interagir positivamente com EGR-1 (SILVERMAN e COLLINS, 1999; DECKER et al., 2003). O domínio inibitório está entre o sítio de ativação e o domínio de ligação ao DNA, funcionando como um sítio de ligação para os co-fatores transcricionais NGFI-A 1 e 2 (NAB1 e NAB2). Ambos NAB1 e NAB2 regulam negativamente a atividade de transcrição de EGR-1. (THIEL e CIBELLI, 2002; PAGEL e DEINDL, 2010) (FIGURA 7).

Após sua expressão, Egr-1 pode envolver-se com várias vias transdutoras de sinais, alterando a transcrição de diversos genes, tais como PDGF-A, PDGF-B, apolipoproteína A1, fator estimulante de colônias de macrófagos (M-CSF), TNF- $\alpha$ , fator tecidual, ativador de plasminogênio tipo-urocinase, interleucina-2 (IL-2), molécula de adesão intracelular (ICAM-1), p53, 5-lipoxigenase (5-LO), SOD1, CD44, fator de crescimento insulina-simile (IGF-II) e o fator de crescimento e transformação 1 beta (TGF- $\beta$ 1) (SILVERMAN e COLLINS, 1999;

PAGEL e DEINDL, 2010). Estando envolvida também, na regulação de diversas proteínas sinalizadoras, como PTEN e PTP1B, além de citocinas como TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  (VIROLLE et al., 2001; FUKADA e TONKS, 2001; SHI et al., 2002; FU et al., 2003; THIEL e CIBELLI, 2002)

A participação do gene *erg-1* em infecções virais já foi descrita para os vírus *Human herpesvirus 1* (BEDADALA et al., 2011), *Human herpesvirus 4* (CHANG et al., 2006), *JC polyomavirus* (ROMAGNOLI et al., 2008), *Human immunodeficiency virus 1* (FAN et al., 2011), *Human herpesvirus 8* (DYSON et al., 2010), *Human herpesvirus 5* (YOO et al., 1996), *Vaccinia virus* e *Cowpox virus* (SILVA et al., 2006).



**FIGURA 7. ESTRUTURA ESQUEMÁTICA DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO EGR-1.**

A proteína Egr-1 apresenta um domínio de ativação, um domínio de inibição e um domínio de ligação ao DNA, que consiste em três motivos de dedo de zinco. Fonte: Adaptado de THIEL e CIBELLI, 2002.

### 1.5 - A PROTEÍNA TIROSINA FOSFATASE 1B (PTP1B)

A proteína tirosina fosfatase 1B é uma proteína traduzida do RNAm do gene *ptpn1*, composta por 435 aa, com uma sequência C-terminal hidrofóbica importante para a localização de PTP1B no retículo endoplasmático. Apresenta em sua estrutura um domínio catalítico conservado [I/V] HCXXGXXR[S/T] (I: Isoleucina; V: Valina; H: Histidina; C: Cisteína; G: Glicina; R: Arginina; S: Serina; T: Threonina; X é qualquer aminoácido) que contém uma cisteína essencial, a qual promove o ataque nucleofílico do átomo de fósforo presente nos resíduos de tirosina fosforilados durante as reações catalíticas (DENU e DIXON, 1998; BAKKE e HAJ, 2015) (FIGURA 8) (FIGURA 9).

PTP1B juntamente com SHP2, TCPTP, RPTPe, e PTEN pertencem à sub-família das PTP (proteínas tirosina fosfatases). São moduladores altamente específicos e estritamente regulados de vias de sinalização que envolvem vários substratos receptores e não-receptores e atuam desfosforilando resíduos de fosfo-tirosina (TSOU e BENCE,2013; BAKKE e HAJ, 2015). Dentre as PTP, a PTP1B é a melhor caracterizada e está envolvida como reguladora de numerosas cascatas de sinalização. PTP1B está diretamente associada à regulação de receptores de insulina e leptina, sendo associada à diabetes do tipo 2 e obesidade. Além disso, estudos tem demonstrado que PTP1B pode estar envolvida no câncer de mama e próstata, e também na modulação de vias de sinalização imune (FELDHAMMER et al., 2013; BAKKE e HAJ, 2015).

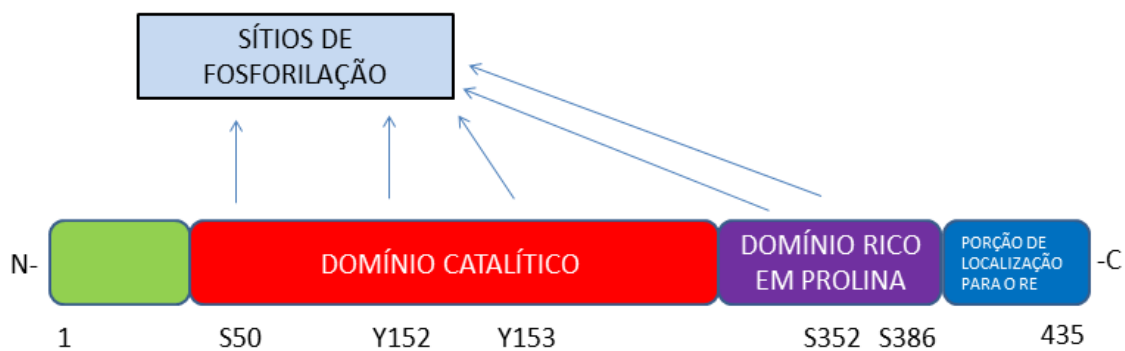
Sendo assim, é importante que haja uma regulação desta proteína para que não ocorra uma sinalização celular aberrante. A regulação de PTP1B seja por modificações pós-traducionais, ou em nível transcricional, tem sido exaustivamente estudada. Observou-se que a expressão de PTP1B é regulada por Egr-1, proteínas da família de Sp, YB-1 e NF- $\kappa$ B. Além desta regulação em nível transcricional, PTP1B pode sofrer modificações pós-traducionais, que incluem fosforilação, oxidação, nitrosilação, sumoilação e clivagem proteolítica, que podem aumentar ou inibir a atividade enzimática de PTP1B (FELDHAMMER et al.,2013; BAKKE e HAJ, 2015).

Através de regulação em seus domínios catalíticos e não-catalíticos PTP1B interage com seus substratos. Até o momento foram identificados inúmeros substratos de PTP1B, tais como EGFR (receptor do fator de crescimento epidérmico), PDGFR (receptor do fator de crescimento derivado de plaqueta), IRS-1/2 (substrato 1 do receptor de insulina), IR (receptor de insulina), IGF1-R (receptor do fator de crescimento insulina-símile 1), JAK2 (cinase Janus 2), TYK2 (tirosina-cinase 2), p62DOK, p210Bcr-Abl, STAT5a/b, Src, p130<sup>cas</sup>, STAM2 (molécula 2 adaptadora de transdução de sinal humano) e PERK (proteína cinase tipo PKR residente no retículo endoplasmático). Sendo importante a identificação destes substratos para entender as funções biológicas de PTP1B. (BOURDEAU et al., 2005; FELDHAMMER et al., 2013; BAKKE e HAJ, 2015).

Estudos realizados por Brasil (2010), demonstraram que PTP1B pode estar sendo regulada por infecções causadas por *Orthopoxvirus*, de maneira dependente de *egr-1*. Verificou-se que a expressão da proteína PTP1B é inibida durante períodos tardios de infecção para os *Orthopoxvirus* (VACV e CPXV), sendo dependente deste fator de

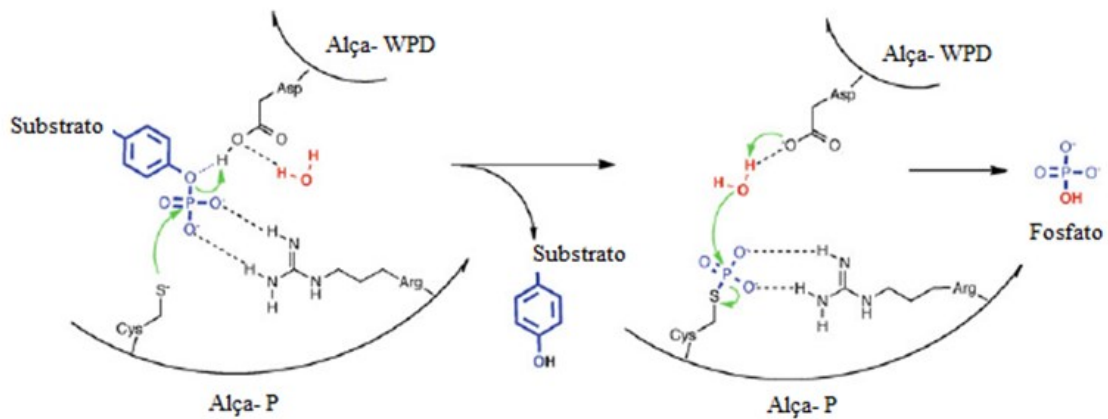


transcrição (*egr-1*) e a inibição farmacológica de PTP1B reverte o fenótipo do processo de liberação das partículas envelopadas (EEV e CEV) em MEF nocautes para *egr-1*, fazendo com que apresentem níveis similares aos observados em MEF WT. Posteriormente, Oliveira (2013) observou este mesmo fato, utilizando a expressão de dominância negativa, contra *egr-1*, confirmando, assim, os achados de Brasil (2010) para o VACV. Hipotetizou-se que a atividade de PTP1B, regulada pelo *egr-1*, permitiria, em um primeiro momento, a ativação da tirosina-cinase Src, importante proteína na formação das caudas de actina, e posteriormente, sua inibição favoreceria a ativação da tirosina-cinase Abl, a qual promove a liberação das formas envelopadas para a membrana plasmática (FIGURA 10).



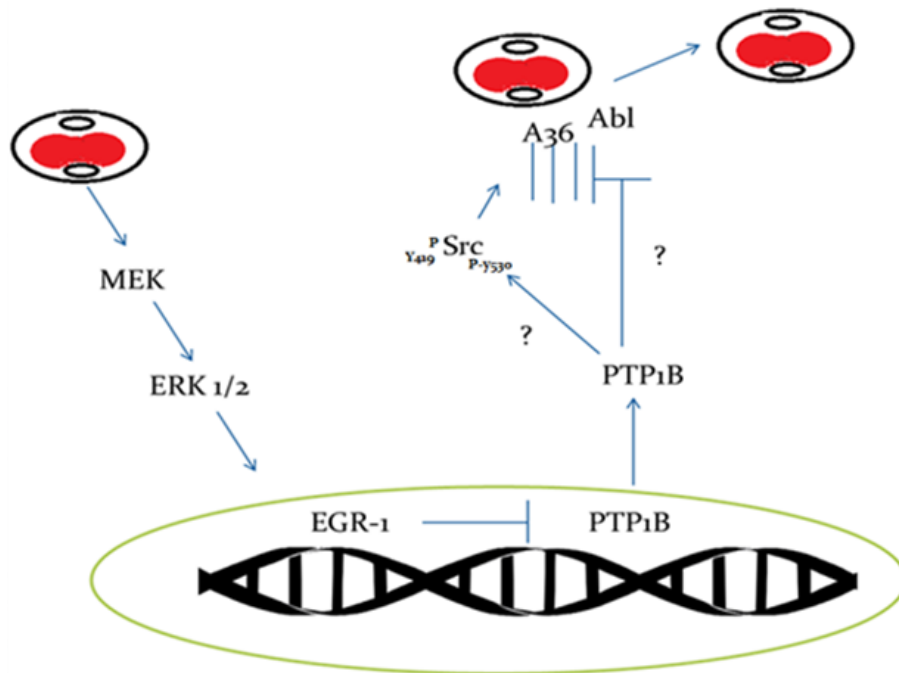
**FIGURA 8. DOMÍNIOS ESTRUTURAIS E SÍTIOS DE FOSFORILAÇÃO DA PTP1B.**

O domínio catalítico da proteína, localizado na porção N-terminal está representado em vermelho, a porção C-terminal, que contém a região rica em prolina (roxo) e a porção que direciona a proteína para o retículo endoplasmático, em azul. As setas estão indicando os sítios de fosforilação de PTP1B. Fonte: Adaptado de YIP, SAHA e CHERNOFF, 2010.



**FIGURA 9. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA AÇÃO CATALÍTICA DE PTP1B**

O mecanismo catalítico de PTP-1B está representado na figura, no qual uma cisteína catalítica nucleofílica forma um intermediário tiofosfato. Em uma primeira etapa da reação, a cisteína inicia a quebra da ligação fosforo-oxigênio, por um ataque nucleofílico, no átomo de fosforo, enquanto o aspartato catalítico, doa um próton para o grupo OH-livre, formando um intermediário fosfo-citeína e havendo a liberação do substrato desfosforilado. Em seguida, uma segunda etapa da reação ocorre na qual o aspartato catalítico irá atuar como base para sequestrar um próton de uma molécula de água, facilitando assim a hidrólise da ligação fosforo-enxofre e produzindo por fim, um grupo fosfato livre.



**FIGURA 10. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA ATUAÇÃO DE PTP1B SOBRE A DISSEMINAÇÃO DO VACV.**

Após a penetração o VACV induz a ativação da via MEK/ERK que culmina com a expressão do gene *egr-1*. A proteína EGR-1 acumula-se no núcleo da célula onde regularia negativamente a expressão do gene codificador de PTP1B. PTP1B é uma proteína tirosina fosfatase capaz de atua sobre a proteína de Src, provavelmente em seu resíduo Y530, Src permitindo que esta tirosina cinase seja ativada por autofosforilação em resíduo Y419. Src fosforilada atua sobre a proteína A36, promovendo sua dissociação da cinesina celular atuando, em seguida, sobre a formação de caudas de actina. PTP1B também poderia atuar sobre Abl, inativando-a. Após 12h.p.i, os níveis de PTP1B seriam reduzidos ocorrendo à redução da atividade de Src e, possivelmente, aumentando a atividade de Abl que, por sua vez, atuaria sobre a liberação das partículas envelopadas da membrana plasmática. Fonte: Adaptado de OLIVEIRA, 2013.

## 2 - JUSTIFICATIVA

A suspensão da vacinação contra a varíola, fez com que atualmente uma grande parte da população mundial não apresente imunidade contra a doença, e nem a qualquer outro *Orthopoxvirus*, o que permite a circulação destes vírus nos seres humanos, havendo relatos de emergência e re-emergências dos OPXV no Brasil, no Egito, Indonésia, Índia e seus países vizinhos, como, Nepal e Paquistão. No Brasil, o VACV, provoca zoonoses ocupacionais e é responsável por surtos em quase metade do território. Diferentes amostras de VACV, tais como Guarani P1 virus (GP1V) e Guarani P2 virus (GP2V), Passatempo (PSTV), Araçatuba (ARAV), Cantagalo virus (CTGV) e Mariana virus (MARV) foram isoladas a partir de infecções zoonóticas em bovinos e em seres humanos.

Os vírus são seres intracelulares obrigatórios, dependentes das funções celulares do hospedeiro para realizar seu ciclo de multiplicação. Sendo essencial para os vírus subverter as vias de sinalização celular em seu benefício, como vias metabólicas, imunológicas, de crescimento, sobrevivência da célula, etc.

Os vírus são patógenos intracelulares obrigatórios, dependentes das funções celulares do hospedeiro para realizar seu ciclo de multiplicação. Sendo essencial para os vírus subverter as vias de sinalização celular em seu benefício, como vias metabólicas, imunológicas, de crescimento, sobrevivência da célula, etc.

Estudos prévios de nosso grupo identificaram que o VACV, desde momentos iniciais da infecção ativa a via MEK/ERK1/2, que facilita a multiplicação do VACV, visto que sua inibição acarreta uma redução significativa do título viral. Sendo a ativação desta via dependente, parcialmente da proteína viral VGF e sua ativação leva a expressão de EGR-1. Brasil, 2010, observou que o fator de transcrição EGR-1 em células quiescentes infectadas exercia um papel facilitador da multiplicação do VACV, no entanto, em células com alta concentração de soro fetal bovino (SFB), o VACV multiplicava-se normalmente na ausência de EGR-1. Todavia, foi visto que em células nocautes para *egr-1*, a disseminação de formas envelopadas do VACV encontrava-se significativamente reduzida. Também, foi observado em MEF *egr-1*<sup>-/-</sup> um ligeiro aumento dos níveis de PTP1B se comparado as células selvagens e que quando às células são tratadas com um inibidor farmacológico de PTP1B os níveis de EV são restaurados a títulos próximos daqueles encontrados em células selvagem.

Oliveira 2013, confirmou o papel facilitador de disseminação de formas envelopadas do VACV pelo fator de transcrição EGR-1, por técnica de dominância negativa para EGR-1. Postulou-se que, possivelmente, EGR-1, promoveria a liberação das formas envelopadas virais devido à regulação da expressão da fosfatase PTP1B, que permitiria a ativação da tirosina-cinase Src, que fosforila a proteína viral A36, promovendo a sua dissociação da cinase celular e formação da projeção de actina. PTP1-B poderia também atuar em Abl inativando-a. Posteriormente, a inibição de PTP1B favoreceria a ativação da tirosina-cinase Abl necessária para a liberação das partículas (FIGURA 10). Visto a atividade exercida das vias de sinalização para o ciclo de multiplicação dos vírus, o estudo destas vias revelam potenciais alvos terapêuticos, permitindo o desenvolvimento de terapias eficazes para tratar e prevenir doenças. Além disso, o desenvolvimento de pesquisas sobre estas vias facilita a compreensão das bases moleculares da interação vírus-hospedeiro.

No presente estudo, buscou-se construir um VACV-recombinante, inserindo-se a orf de *ptn1* por recombinação homóloga no gene viral A56R (*ha*) do VACV vT7lacOI, por meio do vetor de transferência pVOTE.1/PTP1B e o VACV recombinante, permite a expressão regulada de PTP-1B mediante tratamento com IPTG. Este vírus recombinante expressando apropriadamente a proteína PTP1B poderá ser utilizado em estudos de interação com o hospedeiro e de disseminação de partículas envelopadas do VACV.

### **3 - OBJETIVOS**

#### **3.1 - OBJETIVO GERAL:**

Construir um *Vaccinia virus* recombinante expressando de forma regulável por IPTG a proteína PTP1B de camundongo, utilizando-se para tanto a amostra vT7lacOI do VACV e o vetor de transferência pVOTE.1.

#### **3.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

3.2.1 – Gerar um cassete (gene sintético) contendo o gene murino que codifica para PTP1B, os sítios de restrição específicos para inserção no vetor de transporte pVOTE.1 e um marcador FLAG para detecção específica do gene quando expresso ectopicamente

3.2.2 – Inserir o gene sintético no VACV vT7lacOI por recombinação homóloga e resgatar vírus recombinantes (vT7lacOI /PTP1B), validar a inserção do gene sintético por sequenciamento de DNA

3.2.3 – Avaliar a eficiência da transcrição do gene *ptpn1* em células infectadas com o vT7lacOI/PTP1B, após adição de IPTG, por PCR quantitativo.

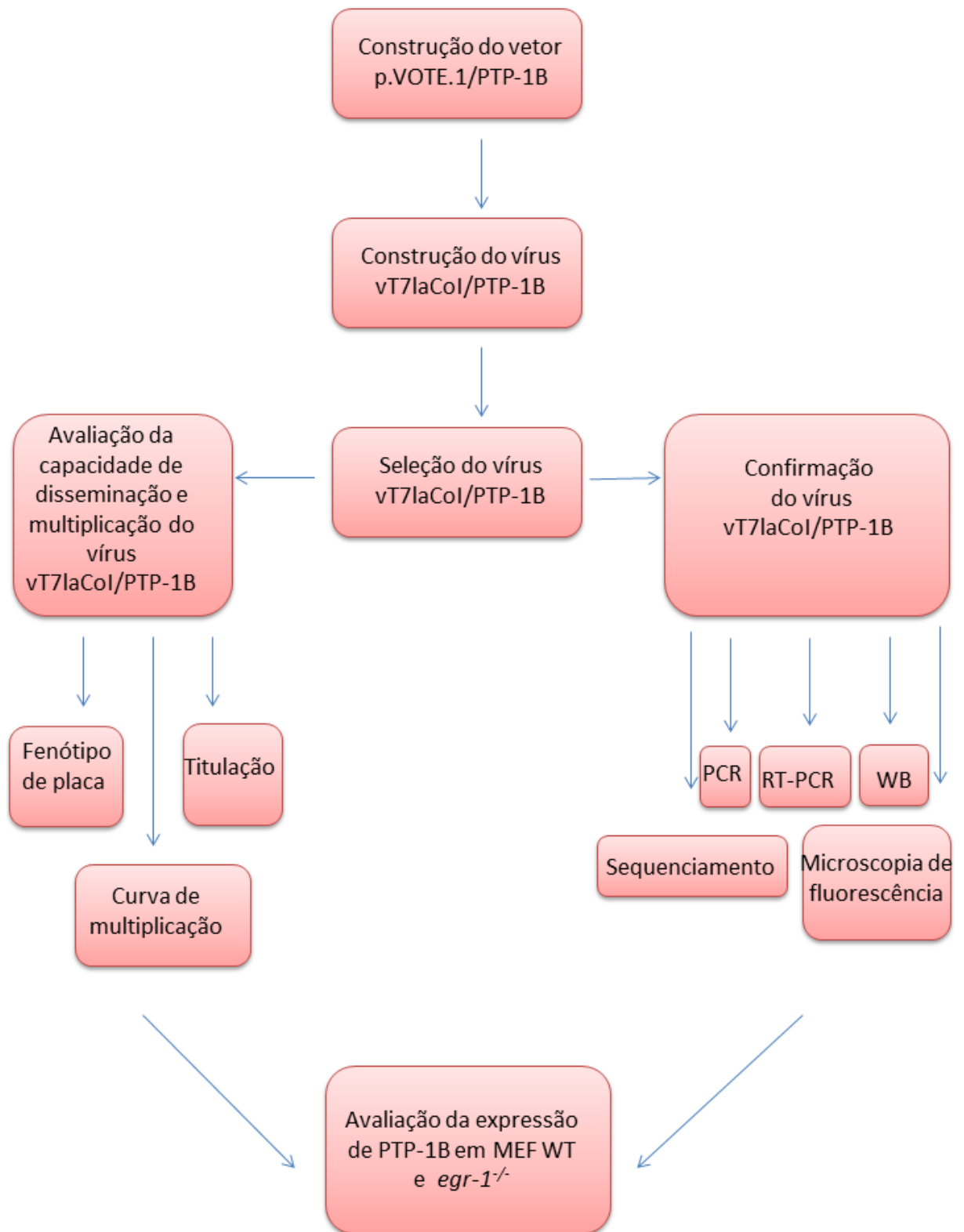
3.2.4 – Avaliar a expressão ectópica da proteína PTP1B por Western Blot em células BSC-40 e MEF infectados com o vT7lacOI /PTP1B.

3.2.5 – Verificar a distribuição celular da proteína PTP1B por microscopia confocal em células infectadas com o vT7lacOI /PTP1B.

3.2.6 – Avaliar a capacidade de multiplicação do vírus vT7lacOI /PTP1B.

3.2.7 – Verificar se o vT7lacOI /PTP1B induz a expressão de PTP1B endógena e reproduzir o acúmulo de PTP1B em células deficientes em Egr-1.

#### 4 – FLUXOGRAMA DE TRABALHO



## 5 - MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 - CÉLULAS

#### 5.1.1 - MEF WT E MEF *egr-1*<sup>-/-</sup>

Os fibroblastos embrionários murinos (MEF) provenientes de camundongos C57Bl/6 selvagens (WT) ou nocaute (*egr-1*<sup>-/-</sup>) para o gene *egr-1*, foram cedidos gentilmente pela Dra. Eileen D. Adamson (The Burnham Institute, La Jolla, California, EUA). Os MEF foram cultivados em meio DMEM, suplementado com 7% de SFB e antibiótico (estreptomicina 1mg/mL e penicilina 100U/mL), a 37 °C e sob atmosfera de CO<sub>2</sub> a 5%.

#### 5.1.2 - BSC-40

As células BSC-40 são células epiteliais de linhagem contínua provenientes de rim de macaco verde (*Cercopithecus aethiops*) obtidas originalmente da ATCC (numero: CRL-2761), Maryland, EUA. Estas células foram mantidas em meio mínimo Eagle MEM suplementado com 5% de SFB e antibióticos (estreptomicina 1mg/mL, e penicilina a 200U/mL) e antifúngico (fungizona a 2 µg/mL).

### 5.2 - VÍRUS

O vírus Vaccinia Western Reserve (WR) foi gentilmente cedido pelo Dr. B. Moss (National Institute of Allergy and Infectious Diseases, Bethesda, Maryland, Estados Unidos), e faz parte da coleção de vírus do Laboratório de Vírus, ICB/UFMG.

O vírus vT7lacOI foi gentilmente cedido pelo Prof. Flávio Guimarães da Fonseca (colaborador do projeto), que obteve esta amostra a partir do Dr. B. Moss (Bethesda – USA). O vírus vT7lacOI codifica a enzima polimerase RNA T7 de bacteriófago, sobre o controle de elementos reguladores do operón lac, fundindo ao promotor precoce / tardio viral, havendo a expressão constitutiva deste gene regulatório. Esta amostra viral é utilizada para a recombinação homologa no *locus* do HA juntamente com o vetor pVOTE.1, devido a formação de um sistema, no qual a enzima T7 RNA polimerase codificada pelo vírus vT7lacOI, se liga a sua região promotora contida no vetor pVOTE.1 é assim inicia-se a síntese do gene alvo (no caso, do estudo o gene codificado de PTP1B). Além disso, a amostra viral contém o gene *lacI* que codifica moléculas repressoras que impediram a síntese da enzima T7 RNA polimerase, com isto há a regulação da codificação do gene de PTP1B, quando há a



adição de IPTG ao sistema há a inativação do repressor e síntese do gene de interesse, com isto ocorre a regulação da expressão de PTP1B (ALEXANDER, MOSS, FUERST, 1992; WARD et al., 1995).

### **5.3 - CONSTRUÇÃO DO GENE SINTÉTICO *PTPNI* E CLONAGEM NO VETOR DE EXPRESSÃO pVOTE.1**

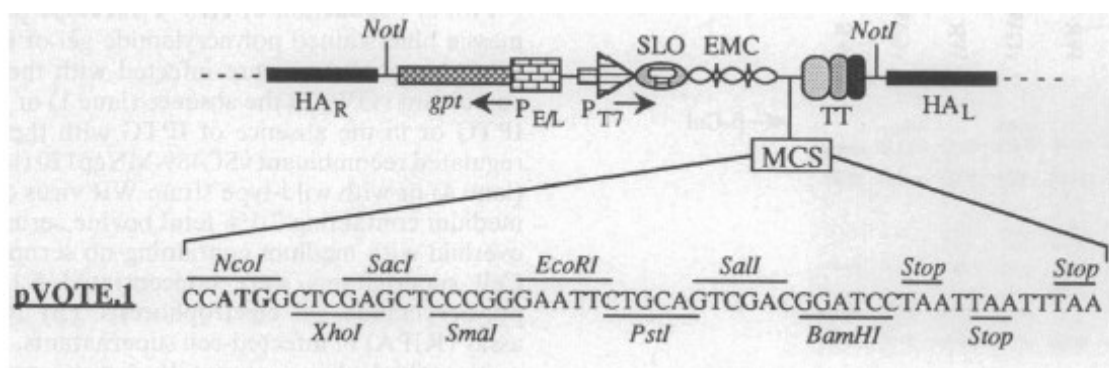
O cassete de DNA contendo a sequência codificadora (CDS) do gene *ptpn1* murino (Sequência de Referência NCBI: NM\_011201.3 ) juntamente com a sequência que codifica para o marcador FLAG (5'- GAC TAC AAG GAC GAC GAT GAC AAA - 3' – DYKDDDDK) e os sítios de restrição para as enzimas NcoI e EcoRI, foi adquirido juntamente à empresa BIOMATIK, EUA, gerando o plasmídeo pUC19/PTP1B. Estas sequências foram obtidas junto ao GenBanK, Gene ID: 19246, CCDS17107.1.

Posteriormente o plasmídeo pUC19/PTP1B foi clivado com as enzimas de restrição NcoI e EcoRI, fracionado em gel de agarose 1% TAE 1X, corado com *SYBER Safe®*, visualizado em transiluminador ultravioleta, e a banda corresponde ao inserto, foi purificada a partir do gel de agarose.

O inserto foi clonado no plasmídeo pVOTE.1, previamente digerido com EcoRI e NcoI, utilizando os reagentes de ligação do kit T4 DNA Ligase (Promega), seguindo as recomendações do fabricante. Em seguida o produto da ligação foi utilizado para a transformação de bactérias DH5 $\alpha$  quimiocompetentes.

### **5.4 - CONFIRMAÇÃO DO INSERTO *PTPNI* NO PLASMÍDEO pVOTE.1**

As bactérias DH5 $\alpha$  transformadas contendo o plasmídeo pVOTE.1 /PTP1B foram crescidas em meio LB (Bacto tripton a 1% p/v; extrato de levedura a 0,5% p/v; 171 mM NaCl), para obter o DNA plasmidial em pequena escala utilizando o kit PureYield™ Plasmid MiniprepSystem (Promega). Posteriormente, esse DNA plasmidial foi submetido a digestão enzimática com as enzimas NcoI e EcoRI de acordo com as especificações do fabricante. Os produtos da reação enzimática foram resolvidos em gel de agarose 1% , juntamente com o controle da enzima EcoRI, NcoI e marcador de massa molecular de 1kb da Promega. O material da miniprep, posteriormente, foi utilizado para o sequenciamento do inserto pelo método de Sanger e geração do vírus recombinante (FIGURA 11).



**FIGURA 11. REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PVOTE.1.**

Está representado no esquema acima, a região da hemaglutinina (HA) na qual foi realizada, por recombinação homóloga, a clonagem de PTP1B no sítio múltiplo de clonagem (MCS). No esquema, o promotor T7 é seguido de SLO (operador lac), posteriormente, localiza-se a sequencia líder não traduzida derivada do *Enccephalomyocarditis virus* (EMC), que aumenta a estabilidade e tradução do inserto, o sítio múltiplo de clonagem e três terminadores de transcrição. Também está esquematizado o *gpt*, gene que confere resistência ao ácido micofenólico, substância utilizada para a seleção dos vírus recombinantes. Fonte: Adaptado de WARD, et al., 1995.

### 5.5 - GERAÇÃO DO VÍRUS RECOMBINANTE

Para geração do vírus recombinante foram realizadas as seguintes etapas, infecção das células BSC-40, em placa de seis poços, com o VACV vT7lacOI a MOI de 1,0, transfecção com o pVOTE.1 (*Vaccina virus/ lacoperon/T7 RNA polimerase/EMC*) inserido com PTP1B no locus HA (hemaglutinina) e posteriormente uma seleção das placas dos vírus recombinantes.

A primeira etapa que foi realizada é a infecção com o VACV vT7lacOI em placa de seis cavidades, uma das cavidades foi reservada para o controle de células, onde somente havia meio suplementado com 10 % de soro. A adsorção foi feita a 37°C, em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e com homogeneização constante durante uma hora. Após a adsorção, as monocamadas de células foram lavadas, duas vezes, com meio Opti-MEM<sup>®</sup> I(GIBCO) e em seguida, a transfecção com o plasmídeo pVOTE.1 (*Vaccina virus/ lacoperon/T7 RNA polimerase/EMC*) contendo PTP1B foi realizada(FIGURA 11).

Para a transfecção, inicialmente foram preparadas duas soluções, a solução A (composta pelo 2µg plasmídeo pVOTE.1-PTP1B) e 50µl Opti-MEM<sup>®</sup> (meio reduzido de soro), e a

solução B (composta de 5µl lipofectamina e 50µl Opti-MEM<sup>®</sup>). A solução B foi incubada por 5 min à temperatura ambiente. Após o período de incubação, a solução B foi adicionada a A e incubada por 30 min, sendo, posteriormente adicionado Opti-MEM<sup>®</sup> até completar 1mL a solução (A+B). Após o preparo da solução (A+B), a monocamada de célula foi lavada duas vezes com Opti-MEM<sup>®</sup> e adicionado a solução (A+B), seguido de incubação por 5 h à temperatura ambiente. O meio de cultura celular foi trocado por 2mL de DMEM 2,5% SFB, e incubado por 37°C por 24 a 48 h, permitindo que houvesse a recombinação homóloga entre o genoma viral e o plasmídeo de transferência. Ao término deste período de tempo, as monocamadas de células foram raspadas, com auxílio de raspadores de silicone, e as soluções resultantes foram centrifugadas por 2 min a 587 x g.

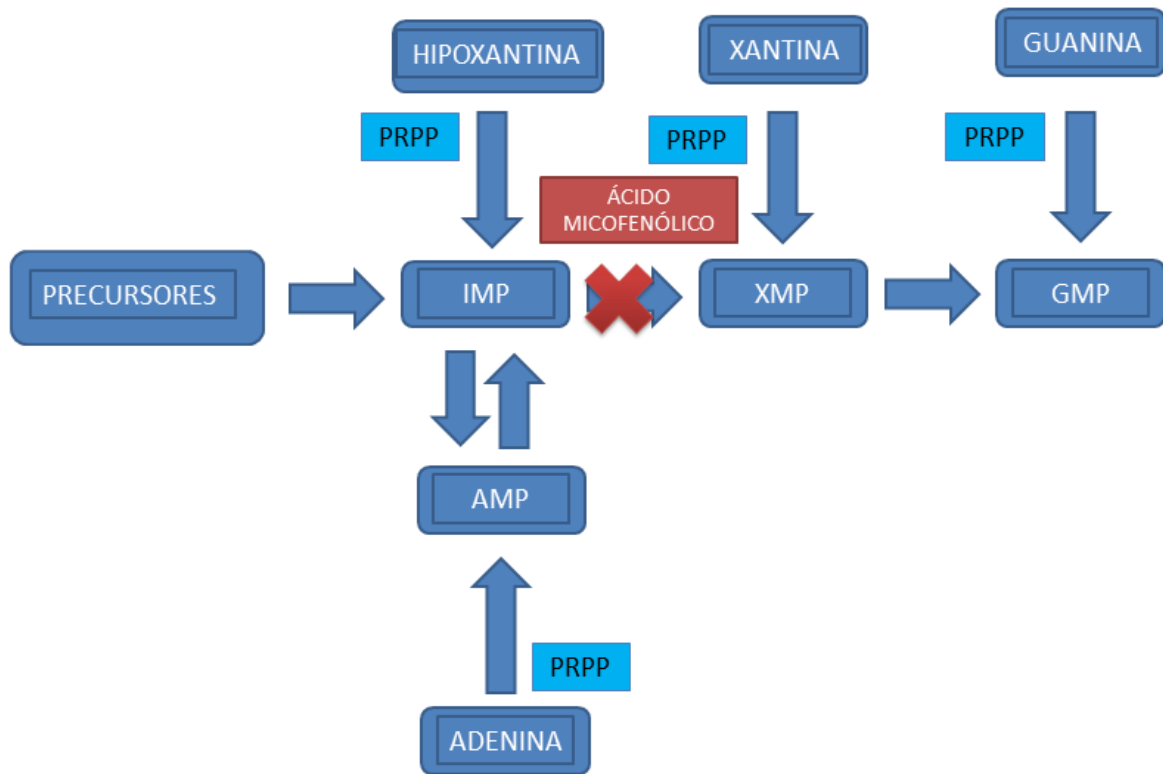
Os sedimentos foram suspensos com 500µL de meio DMEM suplementado com 2,5% de SFB e essa suspensão foi congelada e descongelada em refrigerador -70°C por três vezes, para lise das células infectadas e armazenada a -70°C para posterior seleção e detecção do gene de PTP1B no vírus recombinante.

## 5.6 - SELEÇÃO DO VÍRUS RECOMBINANTE

Foram utilizadas células BSC-40 tratadas, 24 h antes da infecção, com 0,0025 mg/mL de ácido micofenólico, 0,015mg/mL de hipoxantina e 0,25mg/mL de xantina, para a seleção do vírus recombinante. Para a infecção, o vírus foi sonificado três vezes, em ciclos de 30 seg, acompanhados por imersão por 30 seg em banho de gelo. Posteriormente, foram realizadas diluições seriadas em base 10, de  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$ , das suspensões das células transfectadas. Em cinco poços da placa, foram realizadas infecções com 500 µL de cada diluição ( $10^{-1}$  a  $10^{-4}$ ), mantendo um poço para o controle de célula, na qual a monocada foi falsamente infectada. Foi realizada a adsorção a 37°C, em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e com homogeneização constante durante 1 h. Após a adsorção, o meio das placas foi descartado, a monocamada foi lavada com PBS1X e adicionado meio de seleção 2X ( DMEM 2X, SFB 10 %, 0,005mg/mL de ácido micofenólico, 0,03 mg/mL de hipoxantina, 0,5mg/mL de xantina) acrescido de agarose low-melt 2% (na proporção 1:1), a cada poço, após solidificação do meio, as placas foram incubadas em estufa 37°C e CO<sub>2</sub> 5 % por 24 – 48 h (FIGURA 12).

Após esse período, as células foram monitoradas por meio de microscopia invertida . As placas de lise celular isoladas foram coletadas com auxílio de uma ponteira e micropipeta

apenas no ponto de lise. E foram transferidos para microtubos contendo 500  $\mu$ L de meio D-MEM com 5% de SFB e congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Após três ciclos de seleção, realizadas nas condições descritas acima, o vírus foi titulado, multiplicado e purificado.



**FIGURA 12. VIA DE SÍNTESE DE BASES PURINA E SÍTIO DE INIBIÇÃO DO ÁCIDO MICOFENÓLICO.**

O metabolismo das purinas envolve a síntese de bases nitrogenadas de guanina e adenina. Para ser obter a base adenina, o IMP (inosina monofosfato) é catalisado pela enzima adenilossuccinato sintase em AMPS (adenil succinato), que é convertido em AMP pela adenilossuccinato liase. Para a síntese de bases de guanina, o IMP é catalisado em XMP (Xantosina monofosfato), pela enzima IMP desidrogenase, e posteriormente é convertido em guanina monofosfato (GMP) pela GMP sintetase, como mostrado no esquema. O ácido micofenólico atua nesta via, especificamente na conversão de IMP em XMP, pela inibição da enzima IMP desidrogenase. Logo, a síntese de base de guanina é bloqueada e somente as células infectadas com o vírus recombinante produzem XGPRT (5-phospho-a-D-ribose-1-diphosphate: xanthine phosphoribosyltransferase) que sintetiza GMP a partir de XMP, pelo

gene *gpt*, contido na construção do plasmídeo pVOTE.1. Fonte: Adaptado de MULLIGAN e BERG 1981.

### 5.7- TITULAÇÃO VIRAL

A titulação foi realizada de acordo com o método descrito por CAMPOS E KROON (1993). Resumidamente, as células BSC-40 foram cultivadas 10 a 16 horas, até atingirem 90-100% de confluência. 200 µL de uma série de diferentes diluições, na base 10, da suspensão contendo o vírus a ser titulado, foram inoculadas na monocamada de células, concomitantemente foi realizado um controle celular. Após 1 h de adsorção, ao meio de inóculo, foi adicionado meio contendo 1 % de SFB. A revelação foi realizada após 48 h da infecção, através da fixação das culturas com formaldeído a 3,7% e coloração com solução de crista violeta 1%. 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).

### 5.8 - DETECÇÃO DO GENE *PTPNI* NO VÍRUS RECOMBINANTE

Para confirmar a expressão do gene que codifica a proteína PTP1B no vírus recombinante, inicialmente, foi realizada a extração de DNA pelo método de PCI (Fenol: Clorofórmio: Álcool Isoamílico). Primeiramente, a amostra do vírus recombinante foi centrifugada 376 x g por 5 min, o sobrenadante foi descartado e adicionados 500µl de PBS e 500 µl de PCI (Fenol: Clorofórmio: Álcool Isoamílico 25:24:1) à amostra. Em seguida foi realizado uma homogeneização por aproximadamente 10 segundos, centrifugação a temperatura ambiente, a 12000 g, por 1 minuto e coletado o sobrenadante. Depois foi adicionado 10% do volume do sobrenadante de acetato de sódio (Ph 5,5- 3 M) e também 2,5X do volume do sobrenadante de etano (96%) gelado. Em seguida, foi realizada uma homogeneização por inversão e centrifugação a 12000 x g por 5 min a 4°C. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado por inversão e o microtubo foi mantido aberto a 37°C para evaporação do etanol residual. O sedimento gerado foi ressuscitado em água de injeção.

Depois da extração de DNA, foi realizado a técnica de PCR afim de detectar a região do marcador de FLAG, a amplificação foi realizada sob as seguintes condições químicas: 2 µL solução tampão 10X (tris 0,1M pH8.3 + KCl 0,5M + 0,1% de Triton x100), foi acrescido de 0,4µL de dNTP (10mM), 1,2 µL de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 10 pmol de cada iniciador 4F (5'-

GAATTCTTAGCCGCCCCCTT-3') e 4R (5'- CTCCTACCTGGCTGTCATCG-3'), 0,2 µL de Taq DNA polimerase (2U/ µl), 2 µL de DNA para uma reação de volume final de 20 µL. As condições do ciclo de amplificação da PCR foram constituídas por um ciclo de 95°C por 3 min, 30 ciclos de 95°C por 30 seg, 55°C por 30 seg, 72°C por 1 min e 40 seg. E um ciclo de 72°C por 5 segundos.

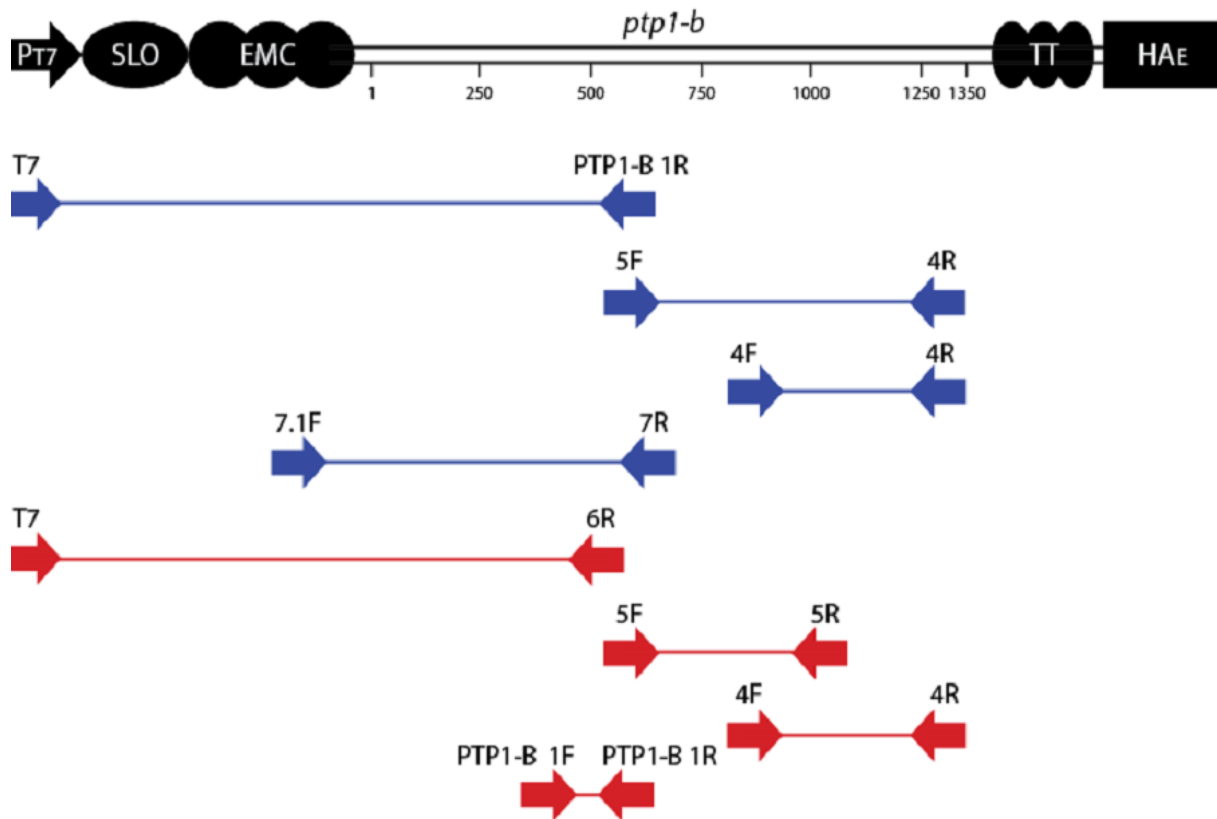
Após a reação de PCR, o DNA obtido foi quantificado por espectrofotometria (espectrofotômetro ND-1000, NanoDrop, EUA) e submetido em gel de agarose 1% em TAE 1X, corado com SYBR® Safe, e corridos a um potencial elétrico constante de 80 V. O gel foi visualizado em transiluminador ultravioleta e fotografado.

## 5.9 - SEQUENCIAMENTO

O sequenciamento do cDNA PTP1B no plasmídeo e no vírus recombinante, foi realizado em sequenciador automático capilar “ABI 3730 DNA Analyzer” (Applied Biosystems), usando o kit “BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems), de acordo com as condições de reação e leitura indicadas pelo fabricante. Os iniciadores utilizados na reação, estão na tabela 1 (FIGURA 13). Todos os dados foram analisados utilizando o programa Mega6, SeqTrace e Seq Scanner 2.

TABELA 1- SEQUÊNCIA DE INICIADORES UTILIZADOS PARA AMPLIFICAR O GENE DE *ptpn1* (DADOS DO LABORATÓRIO DE VÍRUS)

Iniciadores	Sequência	Amplificado
6R	GAGGAAAGAAGCCGGTGACT	-----
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	
5F	CCACATGGCCTGACTTTGGA	568 pb
5R	TCTGGACTCATGCTGCTCAC	
4F	CTCCTACCTGGCTGTCATCG	544pb
4R	GAATTCTTAGCCGCCCCCTT	
PTP1B 1F	GGAGAAAGGCTCGTTAAAATGTG	302pb
PTP1B 1R	GTGGACCACAATGGGGC	
7.1F	ATGCCCAGAAGGTACCCCAT	687pb
7R	GTCAGCCAGACAGAAGGTCC	
5F	CCACATGGCCTGACTTTGGA	820pb
4R	GAATTCTTAGCCGCCCCCTT	



**FIGURA 13. INICIADORES UTILIZADOS PARA O SEQUENCIAMENTO DO INSERTO *ptpn1*.**

Acima, está representada uma porção, da região flanqueada da sequencias do HA. Abaixo, os conjuntos de setas em azul representam os iniciadores que foram utilizados para sequenciar o inserto no vírus recombinante (vT7lacOI/PTP1B) e em vermelho o conjunto de iniciadores utilizados para sequenciar *ptpn1*, no plasmídeo pVOTE.1 . Fonte: Adaptado de WARD, et al., 1995.

## 5.10 - REAÇÃO DE PCR QUANTITATIVO

Para confirmação da transcrição do gene *ptpn1*, foram implantadas células MEF WT, infectadas com vírus recombinante. Após adsorção foram adicionados 100µM IPTG. A extração do material foi realizada de acordo com protocolo do reagente, no qual foi utilizado 200µL de Trizol por amostra e incubada à temperatura ambiente por 5 min. Para a separação das fases, foram adicionados a mistura 40µL de clorofórmio, com posterior incubação à temperatura ambiente por 10 min. Na sequência, as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 15 min à 4°C. A fase aquosa, que continha o RNA foi transferida para um novo tubo. Para a precipitação do RNA foram adicionados 100µL de isopropanol e incubados à temperatura ambiente por 10 min. Novamente as amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 15 min à 4°C. E depois, foi feita a remoção do sobrenadante e lavagem do precipitado com 200 µL de etanol a 75%, seguida de uma centrifugação a 7.500 x g por 5 min à 4°C. O sobrenadante foi removido. Para que o precipitado secasse o tubo permaneceu vertido a temperatura ambiente por 5 a 10 min. Para a suspensão do ácido nucléico foram adicionados 20µL de água livre de DEPEC (dietil pirocarbonato) seguida de uma incubação em banho-maria por 10 min à 56°C.

Após a extração, o material foi usado para produção do DNA complementar (cDNA). Para isso, o material extraído foi incubado com iniciadores aleatórios (hexameros- Thermo Fisher Scientific) a 70°C por 5 min. Em seguida foi realizado uma incubação no gelo por 5 min, e adicionados 5,0µL de tampão de RT-PCR 5X (Tris a 250mM pH 8.3, MgCl<sub>2</sub> a 3mM, KCl a 75mM, DTT a 10mM), 1,25 µL de dinucleotídeos trifosfatados (dNTPs) (10mM) e 1,0µL (200U) de enzima M-MLV RT (200U/µL) (Promega Corporation-EUA). Essa mistura foi incubada por 1 hora a 37°C. O cDNA produzido foi utilizado como molde nas reações de PCR em tempo real. Estas foram realizadas em placas de 48 poços, em duplicata, utilizando 0,2µL oligonucleotídeos específicos para PTP1B (10µM), 5 µL SYBR Green Master Mix (2X) (Applied Biosystem, EUA), 4µL de cDNA e água em q.s.p. 10 µL. As reações foram feitas no aparelho StepOne (Applied Biosystem, EUA). Os resultados foram obtidos a partir de valores arbitrários dados a curva padrão e corrigidos utilizando normalização com os níveis do gene constitutivo GAPDH (Tabela 2).

Os resultados foram analisados com base no valor de Cycle Threshold (CT) ou ciclo limiar, sendo este o ponto correspondente ao número de ciclos onde a amplificação atinge dado limiar, o que permite a análise quantitativa da expressão do fator em avaliação. Os valores de C<sub>T</sub> obtidos nesses experimentos foram utilizados para o cálculo da expressão



relativa de mRNA de *PTP1B* em relação à GAPDH. Essa relação é denominada pelo Delta Ct ( $\Delta Ct$ ) e é calculada pela fórmula:

$$\Delta Ct = (Ct \text{ controle endógeno} - Ct \text{ gene-alvo})$$

Em função da característica logarítmica dessa variável, foi utilizado o parâmetro  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  para a análise dos dados conforme recomendado na literatura (LIVAK e SCHMITTEN, 2001).

Tabela 2. SEQUÊNCIAS DOS INICIADORES UTILIZADOS NAS REAÇÕES DE PCR EM TEMPO REAL (DADOS DO LABORATÓRIO DE VÍRUS)

Oligonucleotídeo	Sequência <i>Foward</i>	Sequência <i>Reverse</i>
PTP1B	GGAAGTGGGCGGCTATTTACC	CAAAAGGGCTGACATCTCGGT
GAPDH	CGCCAATACGGCCAAA	CCAGCCTCG TCCCCTAGA

### 5.11 - TRANSFERÊNCIA DE *WESTERN BLOT*

Para a confirmação da produção da proteína PTP1B e os ensaios relacionados a possível regulação de PTP1B por EGR-1, foram crescidas as células BSC-40, MEF WT, *egr1*<sup>-/-</sup>, em placas de seis poços e infectadas com diferentes MOI e tempos de infecção, lavadas duas vezes com PBS 1X. Posteriormente, foram adicionados 150 $\mu$ L/poço de solução de lise Triton X-100 1%; Tris-HCl 100mM pH 8,0; EDTA 0,2mM; glicerol 20% (v/v); NaCl 200mM; NaVO<sub>3</sub> (ortovanadato de sódio) 1mM; NaF (fluoreto de sódio) 50mM; PMSF (fenilmetilsulfonilfluoreto) 1mM; aprotinina 5 $\mu$ g/mL; leupeptina 2,5 $\mu$ g/mL; DTT (ditiotreitól) 1mM, todo este procedimento foi realizado sobre refrigeração, mantendo as células no gelo, após adição dos reagentes para extrair as proteínas. O lisado celular, foi centrifugado a 17949 x g, por 20 min a 4°C. O sobrenadante foi coletado e a concentração de proteínas totais foi determinada por espectrofotometria, utilizando o kit Bio-RadAssay (Bio-RadLaboratories). Após isto, as proteínas foram aliqüotadas e mantidas a -20°C.

Nas aliqüotas de proteínas foram adicionados tampão LB (“Laemmli buffer”) 5X, que serão posteriormente, desnaturadas por 5 min a 99°C. As amostras foram submetidas a fracionamento por eletroforese em gel de poliacrilamida/dodecil sulfato de sódio (SDS-

PAGE). Posteriormente, as proteínas submetidas ao fracionamento foram transferidas para a membrana de nitrocelulose Hybond ECL (GE Healthcare), coradas com Ponceau 1%, para comprovar a eficácia do procedimento, lavadas com TBST (TBS 10X diluído em água ultrapura, 1 mL Tween 20) para retirada do corante, bloqueada com a solução de leite em pó 5% (p/v) em TBST por 1 h a temperatura ambiente, para bloquear as ligações inespecíficas entre os anticorpos primários e/ou secundários. Após, a membrana foi lavada três vezes com TBST, sendo posteriormente, incubada com anticorpo primário anti-FLAG e/ou anti-PTP1B, diluído (1:1000) em solução TBST contendo 5% de BSA (albumina sérica bovina) na proporção recomendada pelo fabricante (Millipore), por 24 h. Em seguida, a membrana foi novamente lavada três vezes com TBST, incubada com anticorpo secundário conjugado a peroxidase diluído (1:5000) em solução de TBST contendo 5% de leite em pó e lavado novamente como descrito anteriormente. Após as lavagens, a membrana foi incubada com solução reveladora contendo revelador e fixador (Kodak), de acordo com as instruções do fabricante.

#### **4.12 - PRODUÇÃO DO ESTOQUE VIRAL**

Após os ensaios realizados para a confirmação do inserto de PTP1B e a expressão apropriada da proteína, o vírus recombinante vT7lacOI /PTP1B foi multiplicado em células BSC-40, utilizando a MOI de 0,01. Após 48h da infecção o sobrenadante foi desprezado e a monocamada infectada lavada com PBS. Em seguida, foram realizados três ciclos de congelamento/descongelamento. Após este procedimento, adicionou-se 10 mL de PBS e a monocamada foi ressuspensa várias vezes. Ao final, a suspensão contendo o vírus vT7lacOI/PTP1B foi coletada, centrifugada à 376 x g por 5 min para remoção de debris celulares, aliquoteado e estocado em freezer -70°C para posterior protocolo de purificação viral.

#### **5.13 - PURIFICAÇÃO VIRAL**

A purificação viral foi realizada conforme o método descrito por CAMPOS (1993) modificado. As células infectadas foram coletadas e lisadas mecanicamente em “douncer”, em tampão de lise hipotônico (1mM de MgCl<sub>2</sub>; 10mM de Tris-HCl pH 7,0; 10mM de KCl), e centrifugadas a 2500 rpm por 15 min (rotor A384, centrífuga Sorvall RT6000B). O sobrenadante contendo fragmentos celulares e suspensão viral foi coletado e centrifugado em colchão de sacarose a 36% a 14000 rpm por duas horas a 4°C (rotor AH-629, ultracentrífuga Sorvall Combi). O sedimento foi ressuspensa em tampão Tris-Hcl10mM, pH 8,0, e

submetido a sonicação por 2 ciclos de 30 segundos (Sonic Desmembrator-50, Fisher Scientific). Depois, a suspensão viral foi centrifugada novamente em colchão de sacarose à 36% e 14.000 rpm por duas horas adicionais à 4°C. O pellet da centrifugação, que corresponde aos vírus, foi coletado e centrifugada em tampão Tris-HCL 10mM, pH 8,0 a 20,000 rpm por uma hora a 4°C. O sedimento foi coletado, ressuspensão no mesmo tampão, aliquoteado e congelados a -70°C.

#### **5.14 - FENÓTIPO DA PLACA DE LISE**

O ensaio foi realizado utilizando 400.000 células BSC-40 implantadas em placas de 6 poços, infectadas com 20 PFU do vírus parental ou o vT7lacOI/PTP1B. Após a infecção a monocamada foi lavada duas vezes com PBS, adicionando-se meio DMEM 2X (2% SFB) e agarose 1%, na proporção (1:1). Após 48 horas de infecção a monocamada celular foi fixada com formalina à 10% e coradas com solução 1% (p/v) de cristal violeta.

#### **5.15 - MICROSCOPIA DE IMUNOFLUORESCÊNCIA**

Células MEF WT, foram crescidas em lamínulas de 13 mm de diâmetro. Em seguida as células foram pré-tratadas com IPTG durante 30 min e infectadas com o VACV recombinante a uma MOI de 10. Após o período de 18 horas, as células foram lavadas 2 vezes com PBS 1X, fixadas com paraformaldeído 4% por 10 min. As células foram então permeabilizadas com Triton X-100 a 0,2% em PBS 1X, 3% BSA por 5 min. As células foram então bloqueadas com SFB à 2%, em PBS/BSA 3%, durante 30 min. Em seguida, lavadas três vezes com PBS 1X e incubadas por 30 min com anticorpo primário ANTI-PTP1B. Após 50 min de incubação no escuro à temperatura ambiente, as lamínulas foram lavadas 3 vezes com PBS e as células foram incubadas com o anticorpo secundário conjugado ao fluoróforo durante 30 min, seguido de mais 3 etapas de lavagem com PBS. Posteriormente, as células foram incubadas com DAPI (100mg/mL 4', 6-diamino-2-phenylindole), por 10 min à temperatura ambiente. Após este processo foram realizadas mais três lavagens com PBS e as lamínulas foram montadas sobre lâminas de vidro utilizando-se uma gota de Prolong Gold Antifade (Life Technology).

#### **5.16 - ANTICORPOS**

O anticorpo monoclonal anti-FLAG, anti  $\beta$ -actina, anti IgG de cabra conjugado a FITC foram adquiridos junto à Sigma-Aldrich. O anticorpo policlonal anti-PTP1B foi adquirido junto à Santa Cruz. O anticorpo secundário anti-IgG de camundongo e anti-IgG de coelho

conjugado à peroxidase foi adquirido junto à Cell Signaling Technology. O anticorpo secundário antiIgG de coelho conjugado a ALEXA 488 foi adquirido junto à Molecular Probes- Invitrogen, EUA. Os anticorpos foram utilizados em ensaios de transferência de “Western” e imunofluorescência, nas diluições recomendadas pelo fabricante.

### **5.17 - ANÁLISES ESTATÍSTICAS**

Os resultados obtidos referentes ao qPCR tiveram sua significância avaliada pelo teste one-away ANOVA usando como pós teste o método de múltiplas comparações de Tukey. Os resultados obtidos referentes à avaliação da capacidade de multiplicação do vírus recombinante vT7lacOI/PTP1B, foram avaliados utilizando o testes t student, pareado e não pareado e o teste one-way ANOVA. Valores de  $P \leq 0,05$  foram considerados estatisticamente diferentes. O *software* GraphPad Prism versão 6.0. foi utilizado para a análise e elaboração dos gráficos.

## **6 - RESULTADOS**

### **6.1 - CONSTRUÇÃO E CONFIRMAÇÃO DA PRESENÇA DO INSERTO NO PLASMÍDEO pVOTE.1**

O cassete de DNA contendo a sequência de interesse de PTP1B (FIGURA 14A), tal como descrito na seção 4.3, foi adquirido do vetor de clonagem pUC19/PTP1B. Este plasmídeo foi submetido a uma digestão enzimática com as enzimas NcoI e EcoRI (FIGURA 14B), para a liberação do inserto e posteriormente ligação ao vetor de transporte p.VOTE1, que também foi submetido a uma reação de digestão com as mesmas enzimas de restrição (FIGURA 14C). Posteriormente, o produto da ligação gerado, o plasmídeo p.VOTE1/PTP1B foi inserido em bactérias DH5 $\alpha$  e para confirmar a presença do inserto foi realizada a digestão com as enzimas NcoI e EcoRI (FIGURA 14D).

Após este ensaio, foi sequenciado o fragmento de PTP1B contido no pVOTE.1/PTP1B utilizando os iniciadores descritos na tabela 1. O resultado do sequenciamento, mostrou que o fragmento de PTP1B no vetor pVOTE.1 tem 99,99% de identidade com a sequência desenhada. Contudo, uma mutação pontual foi identificada pelo sequenciamento. Essa mutação, todavia, é silenciosa e não modifica a estrutura de PTP1B, como indicado na figura 14F em vermelho (FIGURA 14 E-F).

## 14 A

GGGGGGCCATGAGATGGAGAAGGAGTTCGAGGAGATCGACAAGGCTGGGAACTGGGCGGCTATTTACCAGGACATTCGACATGAAGCCAGCGACTTCCCAT  
 GCAAGTCGCGAAGCTTCTTAAGAACAACCCGGAACAGGTACCGAGATGTCAGCCCTTTTGACCACAGTCGGATTAATTCACCAGGAAGATAATGACT  
 ATATCAATGCCAGCTTGATAAAAAATGGAAGAAGCCAGAGGAGCTATATTCTCACCAGGGCCCTTTACCAACACATGTGGGCACCTTCTGGGAGATGGTGT  
 GGGAGCAGAAGAGCAGGGGCGTGGTCATGCTCAACCCGATCATGGAGAAAGGCTCGTTAAAAATGTCGCCAGTATTGGCCACAGCAAGAAGAAAAGGAGATGG  
 TCTTTGATGACACAGGTTTGAAGTTGACACTAACTCTGAAGATGTCAAGTCATATTACACAGTACGACAGTTGGAGTTGAAAACCTGACTACCAAGGAGA  
 CTCGAGAGATCTGCAITTCACACTACACCACATGGCCCTGACTTTGGAGTCCCGGAGTCACCGGCTTCTTCTCAATTCCTTTTCAAAGTCCGAGAGTCAG  
 GCTCACTCAGCCTGGAGCATGGCCCCATTGTGGTCCACTGCAGCGCCGGCATCGGGAGGTCAGGGACCTTCTGICTGGCTGACACCTGCCCTTACTGATGG  
 ACAAGAGGAAAGACCCATCTTCCGTGGACATCAAGAAAGTACTGCTGGAGATGCGCAGGTTCCGCATGGGGCTCATCCAGACTGCCAGCAGCTGCGCTTCT  
 CCTACCTGGCTGTCATCGAGGGGCCAAGTTTCATCATGGGCGACTCGTCAGTGCAGGATCAGTGAAGGAGCTCTCCCGGGAGGATCTAGACCTTCCACCCG  
 AGCAGGTGCCCCACCTCCCGGCCACCCAAACGCACACTGGAGCTCACAACGGGAAGTGAAGGAGCTTTCTCCAGCCACCAGTGGGTGAGCGAGGAGA  
 CCTGTGGGGATGAAGACAGCCTGGCCAGAGAGGAAGGCAGAGCCAGTCAAGTGCCATGCACAGCGTGAGCAGCATGAGTCCAGACACTGAAGTTAGGAGAC  
 GGATGGTGGGTGGAGGTCTTCAAAGTCTCAGGCGTCTGTCGCCACCGAGGAAGAGCTGTCCTCCACTGAGGAGGAACACAAGGCACATTGGCCAAGTCACT  
 GGAAGCCCTTCCTGGTCAATGTGTGCAITGGCCACGCTCCTGGCCACCGGCGCTACTTGTGCTACCGGGTGTGTTTTACGGGGCGGGGGC**SACTACAAG**  
**ACGACGATGACAA**GGGGGCGGC**TAA****GAATTC**TGCAGTCGACGG

**Vermelho:** Sítio de restrição da enzima NcoI

**AVI:** Códon de início **TAA:** Códon de termino

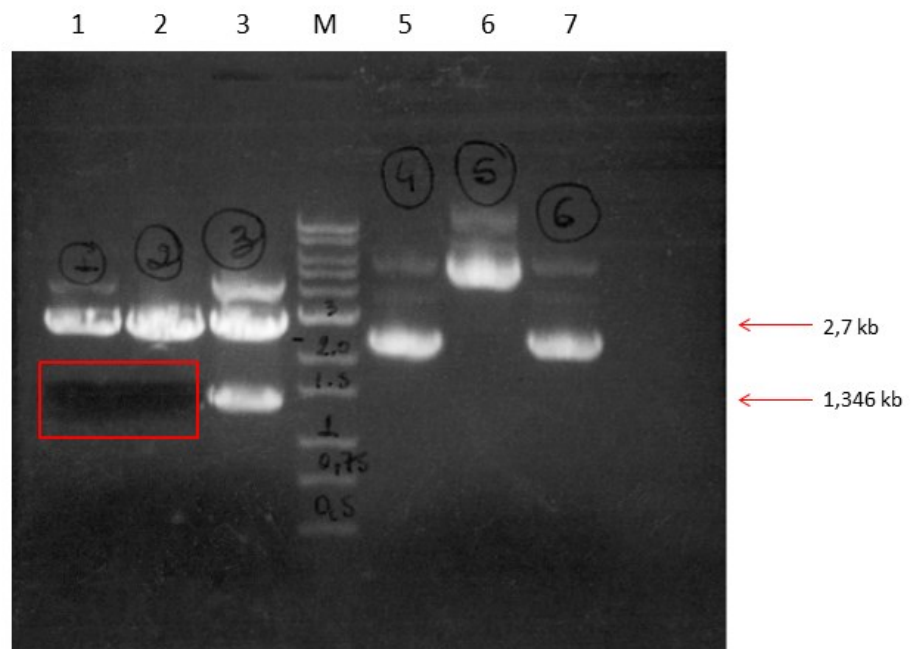
Sequencia do marcador de FLAG: **SAC IAC AAG GAC GAC** **SAT GAC AAA**

**Azul:** Sítio de restrição da enzima EcoRI

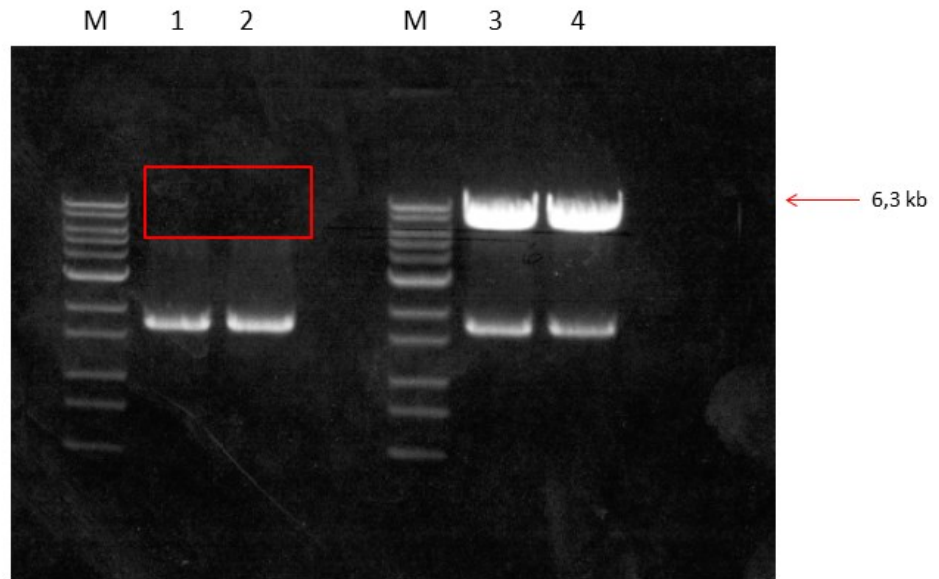
## 14B

## LEGENDA

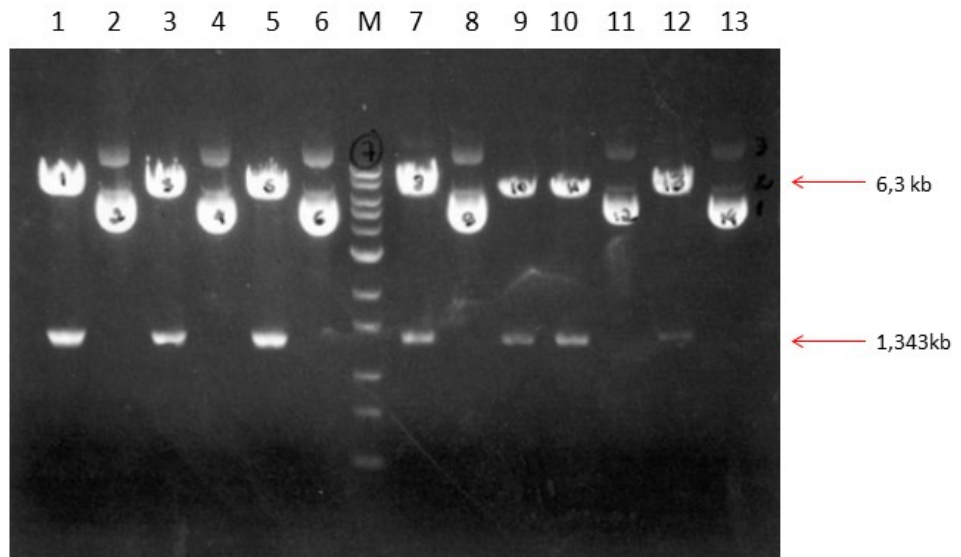
- 1-pUC19/PTP1B (digerido)
- 2-pUC19/PTP1B (digerido)
- 3-pUC19/PTP1B (digerido)
- M- Marcado de peso molecular
- 5-pUC19/PTP1B (não digerido)
- 6-pVOTE.1/PAK (não digerido)
- 7-pUC19/PTP1B (não digerido)



14C

**LEGENDA**1-pVOTE.1/PAK  
(digerido)2-pVOTE.1/PAK  
(digerido)M- Marcado de  
peso molecular3-pVOTE.1/PAK  
(digerido)4-pVOTE.1/PAK  
(digerido)

14D

**LEGENDA**1,3,5,7,9,10-  
pVOTE.1/PTP1B  
(digerido)2,4,6,8,13,14-  
pVOTE.1/PTP1B  
(não digerido)

## 14E

```

ptplb      ATG GAG ATG GAG AAG GAG TTC GAG GAG ATC GAC AAG GCT GGG AAC TGG GCG GCT ATT TAC CAG GAC ATT CGA CAT GAA GCC AGC GAC TTC CCA TGC AAA
Seq.ptpl-b .....

ptplb      GTC GCG AAG CTT CCT AAG AAC AAA AAC CGG AAC AGG TAC CGA GAT GTC AGC CCT TTT GAC CAC AGT CGG ATT AAA TTG CAC CAG GAA GAT AAT GAC TAT
Seq.ptpl-b .....

ptplb      ATC AAT GCC AGC TTG ATA AAA ATG GAA GAA GCC CAG AGG AGC TAT ATT CTC ACC CAG GGC CCT TTA CCA AAC ACA TGT GGG CAC TTC TGG GAG ATG GTG
Seq.ptpl-b .....

ptplb      TGG GAG CAG AAG AGC AGG GGC GTG GTC ATG CTC AAC CCG ATC ATG GAG AAA GGC TCG TTA AAA TGT GCC CAG TAT TGG CCA CAG CAA GAA GAA AAG GAG
Seq.ptpl-b .....

ptplb      ATG GTC TTT GAT GAC ACA GGT TTG AAG TTG ACA CTA ATC TCT GAA GAT GTC AAG TCA TAT TAC ACA GTA CGA CAG TTG GAG TTG GAA AAC CTG ACT ACC
Seq.ptpl-b .....

ptplb      AAG GAG ACT CGA GAG ATC CTG CAT TTC CAC TAC ACC ACA TGG CCT GAC TTT GGA GTC CCC GAG TCA CCG GCT TCT TTC CTC AAT TTC CTT TTC AAA GTC
Seq.ptpl-b .....

ptplb      CGA GAG TCA GGC TCA CTC AGC CTG GAG CAT GGC CCC ATT GTG GTC CAC TGC AGC GCC GGC ATC GGG AGG TCA GGG ACC TTC TGT CTG GCT GAC ACC TGC
Seq.ptpl-b .....

ptplb      CTC TTA CTG ATG GAC AAG AGG AAA GAC CCA TCT TCC GTG GAC ATC AAG AAA GTA CTG CTG GAG ATG CCG AGG TTC CGC ATG GGG CTC ATC CAG ACT GCC
Seq.ptpl-b .....

ptplb      GAC CAG CTG CCG TTC TCC TAC CTG GCT GTC ATC GAG GGC GCC AAG TTC ATC ATG GGC GAC TCG TCA GTG CAG GAT CAG TGG AAG GAG CTC TCC CGG GAG
Seq.ptpl-b .....

ptplb      GAT CTA GAC CTT CCA CCC GAG CAC GTG CCC CCA CCT CCC CGG CCA CCC AAA CGC ACA CTG GAG CCT CAC AAC GGG AAG TGC AAG GAG CTC TTC TCC AGC
Seq.ptpl-b .....

ptplb      CAC CAG TGG GTG AGC GAG GAG ACC TGT GGG GAT GAA GAC AGC CTG GCC AGA GAG GAA GGC AGA GCC CAG TCA AGT GCC ATG CAC AGC GTG AGC AGC ATG
Seq.ptpl-b .....

ptplb      AGT CCA GAC ACT GAA GTT AGG AGA CCG ATG GTG GGT GGA GGT CTT CAA AGT GCT CAG CCG TCT GTC CCC ACC GAG GAA GAG CTG TCC TCC ACT GAG GAG
Seq.ptpl-b .....

ptplb      GAA CAC AAG GCA CAT TGG CCA AGT CAC TGG AAG CCC TTC CTG GTC AAT GTG TGC ATG GCC ACG CTC CTG GCC ACC GGC GCG TAC TTG TGC TAC CCG GTG
Seq.ptpl-b .....

ptplb      TGT TTT CAC GGG GGC GGG GGC GAC TAC AAG GAC GAC GAT GAC AAA GGG GGC GGC TAA GAA TTC TGC AGT CGA CCG
Seq.ptpl-b .....

```

## 14 F

```

ptplb      MEMEREPEEI DWAGNWAAYI QDIRHEASDF PCWVAKLPKN KNRNRYRVS PFDHSRIKLH QEINDYINAS LHMEEAQRS YILTQGLEPN TCGHFWEMVW
Seq.ptpl-b .....

ptplb      EQKSRGVNML NRIMEKGLK CAQVNPQGE REMVFDITGL KLTLISEDVK SYTVRQLEL ENLTKETRE ILHFVYIWP DFGVPESPAS FLNPLEKURE
Seq.ptpl-b .....

ptplb      SGLSLEHGP IVVHCSAGIG RSGTFCIADT CLLMDKRDK PSFVDIKKVL LEMRRFRMGL IQTADQLRFS YLAVIEGAKP IMGDSFUQDQ WNELSREDLD
Seq.ptpl-b .....

ptplb      LPPEHVFPFP RPKKRTLEPH NGKCKELFSS HQWSEETCG DEDSLAREEG RAQSSAMHSV SMSPPDTEVR RRMVGGGLQS AQASVFTEEE LSTEEEHKA
Seq.ptpl-b .....

ptplb      HNP SHWKPEL VNVCMATLLA TGAYLCYRVC FHGGGGDYKD DDDGGGG*EF CSRR
Seq.ptpl-b .....

```



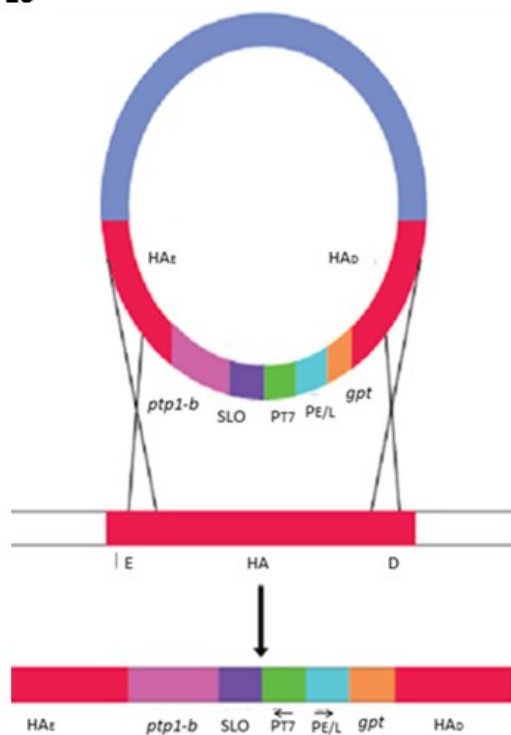
**FIGURA 14. CONSTRUÇÃO E CONFIRMAÇÃO DO INSERTO DE *ptpn1* NO PVOTE.1.**

(A) Sequência codificadora de PTP1B, com as modificações (epitopo de FLAG) e sítios de restrição de enzima EcoRI e NcoI (B) O vetor de clonagem pUC19/PTP1B digerido com as enzimas NcoI e EcoRI. Canaletas: (1, 2 e 3) pUC19/PTP1B digerido pelas enzimas NcoI e EcoRI; (M) marcador de tamanho molecular relativo de 1kb; (5) um clone não digerido do pUC19/PTP1B integro; (6) pVOTE.1 não digerido; (7) um clone pUC19/PTP1B não digerido. Em realce, o quadrante vermelho, demarcando o inserto *PTP1B* que foi coletado para posterior purificação. (C) O plasmídeo pVOTE.1 digerido NcoI e EcoRI. Canaletas (1,2,3 e 4) Digestão com as enzimas NcoI e EcoRI; (M) padrão de tamanho molecular relativo de 1kb. O quadrante vermelho, demarca o vetor linearizado pVOTE.1 que foi coletado para posterior ligação do inserto de *ptp1b* (D) O vetor de transporte pVOTE.1/PTP1B digerido com NcoI e EcoRI. Canaletas (1,3,5,7,9 e 10) plasmídeo digerido com as enzima NcoI e EcoRI; (2,4,6,8,12,13 e 14) plasmídeo não digerido. Os produtos de PCR foram fracionados por eletroforese em gel de agarose 1% com SYBR® Safe (A-D). (E) Alinhamento da sequência codificadora de PTP1B (GENBANK)- superior- com a sequencia gerada pelo sequenciamento do plasmídeo pVOTE.1/PTP1B- inferior-. Em vermelho está assinalado a substituição de um nucleotídeo G/A (F) Alinhamento das sequencias de proteína PTP1B (GENBANK)-superior, inferior- a sequencia gerada pelo sequenciamento.

## 6.2 - GERAÇÃO DO VÍRUS RECOMBINANTE

O vírus recombinante vT7lacOI/PTP1B foi gerado por meio de recombinação homóloga em células BSC-40 infectadas com o vírus vT7lacOI e transfectadas com o plasmídeo pVOTE.1/PTP1B (FIGURA 15). Em seguida, os vírus recombinantes foram selecionados após 3 ciclos de purificação de placa. Ao final do processo, os vírus foram amplificados também em células BSC-40 e purificados em colchão de sacarose, tal como descrito em materiais e métodos (item 4.12/4.13).

15



**FIGURA 15. ESQUEMA DA RECOMBINAÇÃO HOMÓLOGA ENTRE O PLASMÍDEO pVOTE.1 E SEQUENCIA CODIFICADORA DA HEMAGLUTININA DO VACV VT7LACOI.**

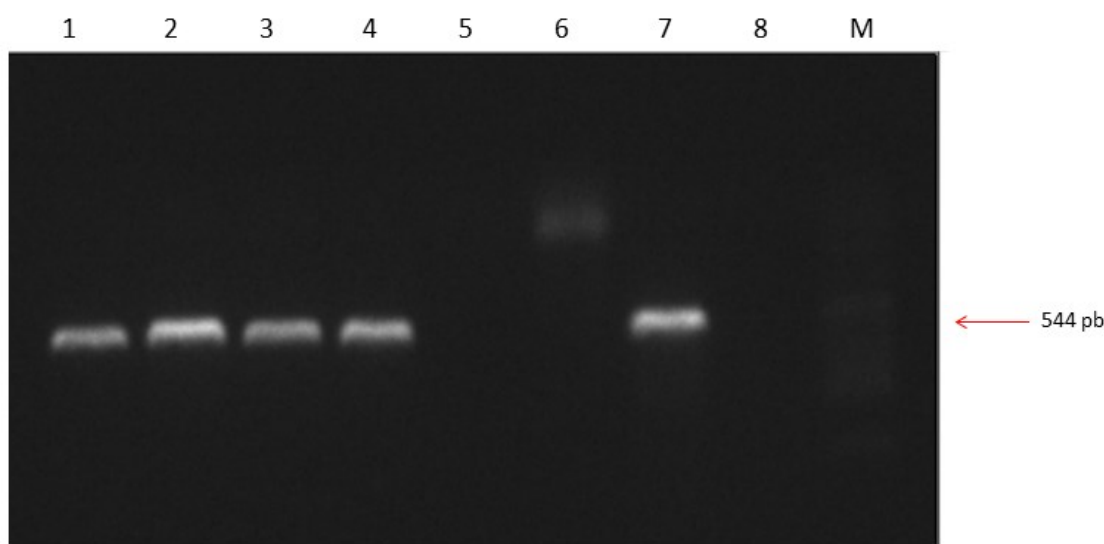
A região flanqueada por sequencias do HA do pVOTE.1 contém os seguintes elementos: *gpt*, gene de seleção, o promotor precoce/tardio e T7 seguido do operador lac (SLO) e *ptp1b*. O resultado final da recombinação o vírus vT7lacOI/PTP1B.

### 6.3 - DETECÇÃO DA REGIÃO DO MARCADOR FLAG NO GENE SINTÉTICO DE PTP1B E SEQUENCIAMENTO DO VÍRUS RECOMBINANTE

Foram selecionados aleatoriamente cinco clones virais recombinantes, os quais foram utilizados para infectar células BSC-40. Em seguida, as células infectadas foram processadas para extração de DNA, utilizado posteriormente para análise por PCR tendo-se como objetivo a amplificação de uma região de 544 pb que se sobrepõe ao marcador FLAG, inserido na região terminal 3' do RNAm do gene sintético de PTP1B nos vírus recombinantes. Foi verificado que quatro entre os cinco clones apresentavam o fragmento esperado (FIGURA 15A).

Em seguida, a amostra 4 foi selecionada para sequenciamento, também aleatoriamente, utilizando os iniciadores da tabela 1 (T7-PTP1BR/7.1F-7.1R/5F-4R/4F-4R). Foi verificado a presença da mesma mutação silenciosa encontrada na sequência de PTP1B presente no plasmídeo pVOTE.1 (FIGURA 15 B). Assim, foi possível demonstrar por PCR convencional e sequenciamento que o vírus recombinante selecionado sofreu a recombinação homóloga esperada e possui o gene que codifica para PTP1B na região do gene A56R (HA).

16A



#### LEGENDA

- 1,2,3,4,5- Clones do vírus recombinante
- 6 - Controle celular
- 7 - Controle positivo (pVOTE.1/PTP1B)
- 8 - Controle negativo
- M - Marcador de peso molecular relativo (1Kb)

## 16B

```

ptplb      ATG GAG ATG GAG AAG GAG TTC GAG GAG ATC GAC AAG GCT GGG AAC TGG GCG GCT ATT TAC CAG GAC ATT CGA CAT GAA GCC AGC GAC TTC CCA TGC AAA
Seq.ptpl-b .....

ptplb      GTC GCG AAG CTT CCT AAG AAC AAA AAC CGG AAC AGG TAC CGA GAT GTC AGC CCT TTT GAC CAC AGT CCG ATT AAA TTG CAC CAG GAA GAT AAT GAC TAT
Seq.ptpl-b .....

ptplb      ATC AAT GCC AGC TTG ATA AAA ATG GAA GAA GCC CAG AGG AGC TAT ATT CTC ACC CAG GGC CCT TTA CCA AAC ACA TGT GGG CAC TTC TGG GAG ATG GTG
Seq.ptpl-b .....

ptplb      TGG GAG CAG AAG AGC AGG GGC GTG GTC ATG CTC AAC CGC ATC ATG GAG AAA GGC TCG TTA AAA TGT GCC CAG TAT TGG CCA CAG CAA GAA GAA AAG GAG
Seq.ptpl-b .....

ptplb      ATG GTC TTT GAT GAC ACA GGT TTG AAG TTG ACA CTA ATC TCT GAA GAT GTC AAG TCA TAT TAC ACA GTA CGA CAG TTG GAG TTG GAA AAC CTG ACT ACC
Seq.ptpl-b .....

ptplb      AAG GAG ACT CGA GAG ATC CTG CAT TTC CAC TAC ACC ACA TGG CCT GAC TTT GGA GTC CCC GAG TCA CCG GCT TCT TTC CTC AAT TTC CTT TTC AAA GTC
Seq.ptpl-b .....

ptplb      CGA GAG TCA GGC TCA CTC AGC CTG GAG CAT GGC CCC ATT GTG GTC CAC TGC AGC GCC GGC ATC GGG AGG TCA GGG ACC TTC TGT CTG GCT GAC ACC TGC
Seq.ptpl-b .....

ptplb      CTC TTA CTG ATG GAC AAG AGG AAA GAC CCA TCT TCC GTG GAC ATC AAG AAA GTA CTG CTG GAG ATG CCG AGG TTC CGC ATG GGG CTC ATC CAG ACT GCC
Seq.ptpl-b .....

ptplb      GAC CAG CTG CCG TTC TCC TAC CTG GCT GTC ATC GAG GGC GCC AAG TTC ATC ATG GGC GAC TCG TCA GTG CAG GAT CAG TGG AAG GAG CTC TCC CGG GAG
Seq.ptpl-b .....

ptplb      GAT CTA GAC CTT CCA CCC GAG CAC GTG CCC CCA CCT CCC CGG CCA CCC AAA CGC ACA CTG GAG CCT CAC AAC GGG AAG TGC AAG GAG CTC TTC TCC AGC
Seq.ptpl-b .....

ptplb      CAC CAG TGG GTG AGC GAG GAG ACC TGT GGG GAT GAA GAC AGC CTG GCC AGA GAG GAA GGC AGA GCC CAG TCA AGT GCC ATG CAC AGC GTG AGC AGC ATG
Seq.ptpl-b .....

ptplb      AGT CCA GAC ACT GAA GTT AGG AGA CGG ATG GTG GGT GGA GGT CTT CAA AGT GCT CAG GCG TCT GTC CCC ACC GAG GAA GAG CTG TCC TCC ACT GAG GAG
Seq.ptpl-b .....

ptplb      GAA CAC AAG GCA CAT TGG CCA AGT CAC TGG AAG CCC TTC CTG GTC AAT GTG TGC ATG GCC ACG CTC CTG GCC ACC GGC GCG TAC TTG TGC TAC CGG GTG
Seq.ptpl-b .....

ptplb      TGT TTT CAC GGG GGC GGG GGC GAC TAC AAG GAC GAC GAT GAC AAA GGG GGC GGC TAA GAA TTC TGC AGT CGA CCG
Seq.ptpl-b .....

```

**FIGURA 16. AMPLIFICAÇÃO DE *ptpn1* NO VÍRUS RECOMBINANTE.**

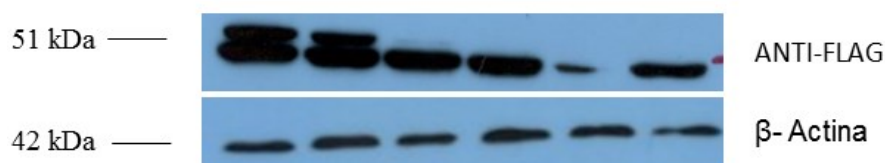
(A) Os amplicons obtidos após reação de amplificação por PCR (544 pb), foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1% e corados com SYBR safe. Canaletas: M - marcador de peso molecular, 1 Kb, Promega®; (1-5) amostras dos clones 1 a 5 (6) controle celular; (7) controle positivo- DNA do plasmídeo pVOTE.1/PTP1B; (8) controle negativo.

(B) Alinhamento da sequência codificadora de PTP1B (GenBank) com a sequência gerada pelo sequenciamento do vírus vT7lacOI/PTP1B, em vermelho mutação.

#### 6.4 - DETECÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA TIROSINA FOSFATASE PTP1B POR WESTERN BLOT EM CÉLULAS BSC-40

Para detectar a expressão da proteína PTP1B, foram utilizadas células BSC-40, infectadas com o vírus proveniente do clone 4 (vT7lacOI/PTP1B) na MOI 0,5 e após a adsorção foram adicionadas diferentes concentrações de IPTG 100,50,25 e 12,5  $\mu\text{M}$ , mantendo-se um controle de célula e controle de vírus, no qual havia sido feita a infecção, mas sem a adição de IPTG. Após 8 h as células foram lisadas de acordo com item 4.11 apresentado na metodologia, e incubadas com anticorpo anti-FLAG e, posteriormente, o anticorpo anti-mouse IgG HRP. Conforme esperado, o ensaio de western-blot revelou que, somente com adição de IPTG houve a expressão da proteína. Observou-se ainda, um aumento dose-dependente da expressão, correlacionado ao aumento da concentração de IPTG (FIGURA 17).

17



**FIGURA 17. EXPRESSÃO DA PROTEÍNA PTP1B EM BSC-40.**

Células BSC-40 foram infectadas a MOI de 0,5, adicionando-se as concentrações de IPTG 100  $\mu\text{M}$  (1), 50  $\mu\text{M}$  (2), 25  $\mu\text{M}$  (3), 12,5  $\mu\text{M}$  (4), sem IPTG (5) e controle celular (6). Após 8 hpi as células foram coletadas e processadas para extração de proteínas celulares totais. 20  $\mu\text{g}$  de extrato proteico foram fracionados por eletroforese (SDS-PAGE). A membrana foi incubada com o anticorpo anti-FLAG (1:1000). O anticorpo anti- $\beta$ -actina (1:5000) foi utilizado para controle de carregamento.

## 6.5 - DETECÇÃO DA PROTEÍNA E RNA MENSAGEIRO DE PTP1B EM MEF

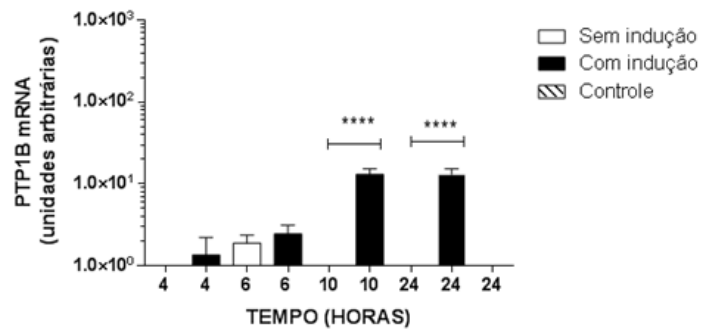
Com o objetivo posterior de avaliar a regulação de PTP1B pelo fator de transcrição Egr-1, foi necessário avaliar, inicialmente se as células MEF WT e *egr-1*<sup>-/-</sup> poderiam ser utilizadas para observar a indução da expressão da proteína PTP1B pela adição de IPTG. Para verificar essa possibilidade, foi realizado um ensaio para análise da expressão de proteína por WB e IF, e também por qPCR visando observar acúmulo do RNAm de PTP1B após tratamento com o indutor IPTG, utilizando-se iniciadores descritos na Tabela 2.

Os dados do qPCR, mostraram que há um acúmulo significativo da RNAm de PTP1B, a partir de 10 h, quando a célula é induzida com IPTG (FIGURA 18A).

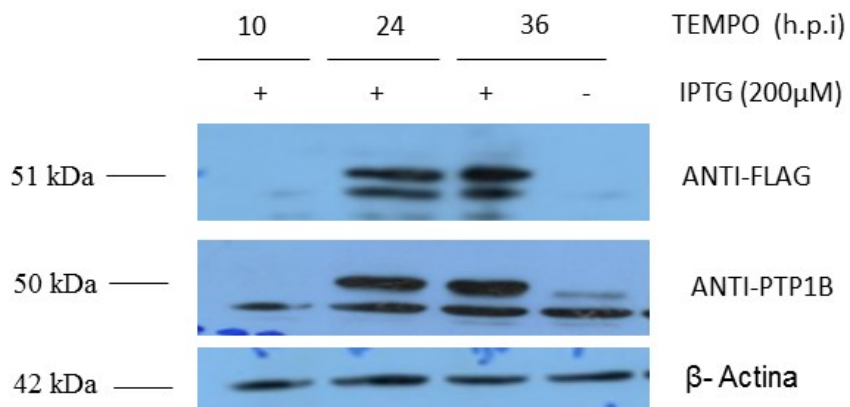
Outro ensaio que foi utilizado para confirmar o aumento da expressão da proteína PTP1B, pelo vírus recombinante após a adição de IPTG, foi à detecção da proteína, utilizando o anticorpo anti-PTP1B e ANTI-FLAG, por western-blot. O experimento foi realizado, infectando células MEF WT EGR-1, com MOI de 3 (titulado em BSC-40). Após a infecção foi adicionado IPTG 200 µM, foram coletados os tempos de 10, 24 e 36 h. Foi observado que com adição de IPTG no tempo de 36 h, há um aumento da produção da proteína PTP1B com relação ao poço que não foi adicionado IPTG. A mesma membrana foi incubada com anticorpo de anti-flag, sendo visto que a produção da proteína inicia-se as 24 horas nestas condições (FIGURA 18B).

Com o objetivo de otimizar a expressão de PTP1B nas células MEF WT, estas foram pré-tratadas 1 h antes da infecção com IPTG nas concentrações de 200 µM, 500 µM e 1 mM, infectadas na MOI de 3 (titulado em BSC-40), com o VV-PTP1B. Após a adsorção foi adicionado meio contendo IPTG nas mesmas concentrações do pré-tratamento (FIGURA 18C). Como demonstrado, o acúmulo da proteína foi visível por WB após 10 hpi e aumentou com o decorrer da infecção. Todas as concentrações testadas foram capazes de induzir a produção de PTP1B. Um ensaio semelhante a este, foi realizado para obter imagens de microscopia de fluorescência, no qual as células MEF WT, foram pré-tratadas 1 h antes da infecção com IPTG a 1 mM, infectadas na MOI de 10, com o vírus recombinantes. Após a adsorção foi adicionado meio contendo IPTG na mesma concentração do pré-tratamento. Como resultado, foi observado que as células que foram infectadas e induzidas com IPTG apresentaram um acúmulo de PTP1B (FIGURA 18 D).

18A

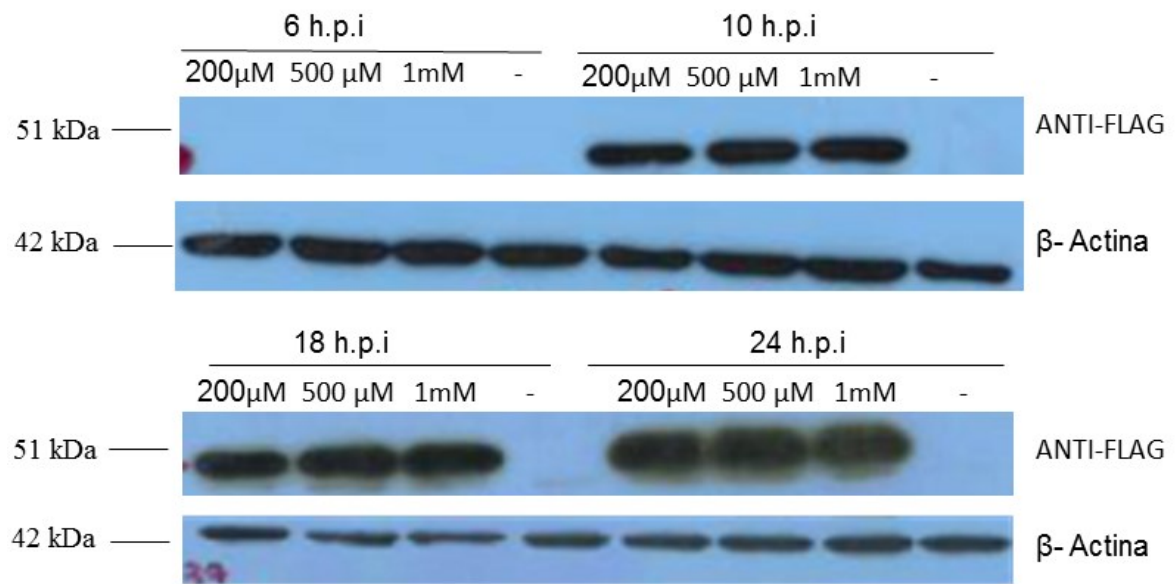


18B

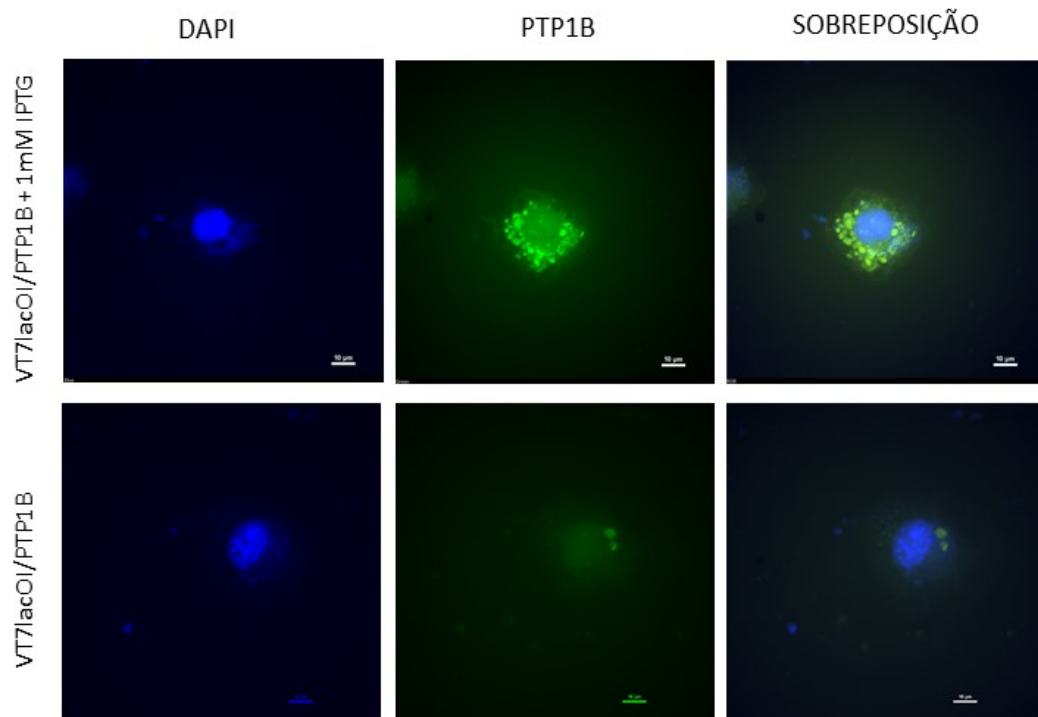




18 C



18D



## **FIGURA 18. DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DA PROTEÍNA E EXPRESSÃO DO RNA MENSAGEIRO DE PTP1B EM CÉLULAS MEF.**

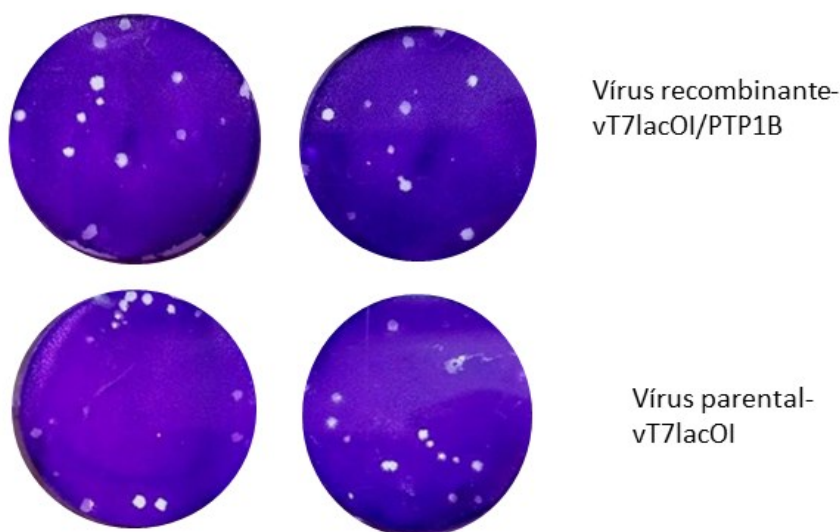
(A) As células MEF WT EGR-1 foram infectadas com MOI de 3, após a adsorção foi adicionado 100  $\mu$ M de IPTG, mantendo-se , controle de vírus sem a adição de IPTG a cada tempo. Após os diferentes tempos de infecção, as células foram coletadas, submetidas à extração de RNA total, e transcrição reversa, sendo o cDNA resultante utilizado como molde em PCR em tempo real. O controle experimental foi o vírus não induzido 24 h. Os dados foram analisados utilizando o software GraphPad prism 6 com o teste de one-way-ANOVA e o pós teste de Tukey. O experimento foi realizado em duplicata experimental e técnica. (B)- Células MEF WT EGR-1 foram infectadas com MOI de 3, com meio contendo IPTG . Após os tempos indicados as amostras foram processadas para extração de proteínas celulares totais. 20  $\mu$ g de extrato proteico foram fracionados por eletroforese (SDS-PAGE). A membrana foi incubada com 1:1000 de anti-FLAG, 1:1000 de anti-PTP1B e re-incubadas com  $\beta$ -actina 1:5000. (C) As células MEF WT EGR-1 foram pré-tratadas com as concentrações indicadas, infectadas com MOI de 3, e após a adsorção foi adicionado meio contendo IPTG, e após os tempos de 6,10,18 e 24 h, foi realizada a extração de proteína. Em seguida o fracionamento em gel de poli-acrilamida de 20  $\mu$ g desse extrato proteico. A membrana foi incubada com 1:1000 de anti-FLAG e re-incubada 1:5000 de  $\beta$ -actina. (D)  $2 \times 10^4$  MEF WT EGR-1, foram crescidas em lâminulas de 13mm de diâmetro. Em seguida, as células foram pré-tratadas com 1mM de IPTG, foram infectadas com VT7lacOI/PTP1B, moi de 10. Após 18 h.p.i, as células foram fixadas, bloqueadas, permeabilizadas e incubadas com anticorpo anti-PTP1B por 50 min. Posteriormente, as células foram simultaneamente incubadas com o anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado a FITC. As imagens foram capturadas utilizando o microscópio Nikon Eclipse Ti, do centro de aquisição de imagem ICB/UFGM. Os experimento foi realizado em duplicata, para a confirmação do resultado.

## 6.6 - AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE MULTIPLICAÇÃO E DISSEMINAÇÃO DO VÍRUS RECOMBINANTE

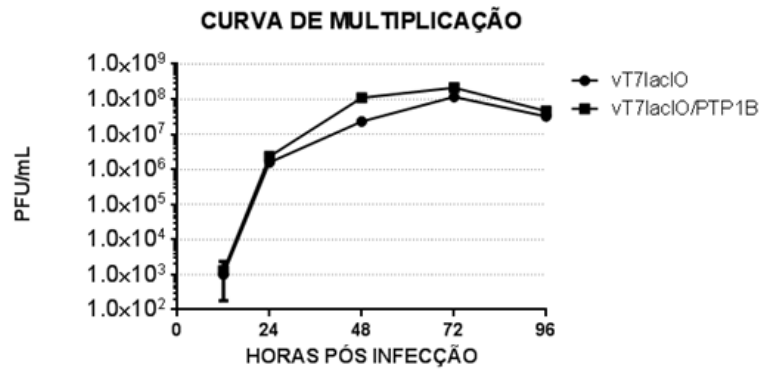
Foi avaliado se a recombinação homóloga no gene do HA resultou em alteração da capacidade de multiplicação viral ou alteração no fenótipo de placa do vírus recombinante em comparação com o VACV WT e VACV vT7lacOI. Para isto foram utilizadas células BSC-40 infectadas com 20 PFU do vT7lacOI/PTP1B e foram comparadas a morfologia da placa deste vírus com a do vírus parental. Notou-se que não houve diferença no tamanho da placa (FIGURA 19A). Foi também realizado uma curva de crescimento do vírus no qual infectou-se células BSC-40 com MOI de 0.01, onde foi avaliada a multiplicação viral nos tempos de 12, 24, 48 e 72 horas (FIGURA 19B). Não houve diferenças significativas no crescimento entre ambos.

Para confirmar que não houve alterações na capacidade do vírus de se multiplicar, um segundo experimento foi realizado comparando os vírus recombinante, o vírus parental (vT7lacOI) e o vírus VACV WR, na MOI de 0,01 (ciclo múltiplos) e 3 (ciclo único) (FIGURA 19C e 19D). Foi confirmado assim que não há diferença na multiplicação entre os vírus estudados.

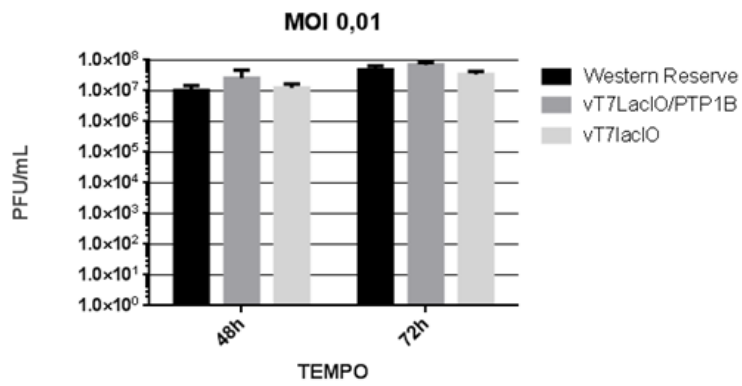
19A



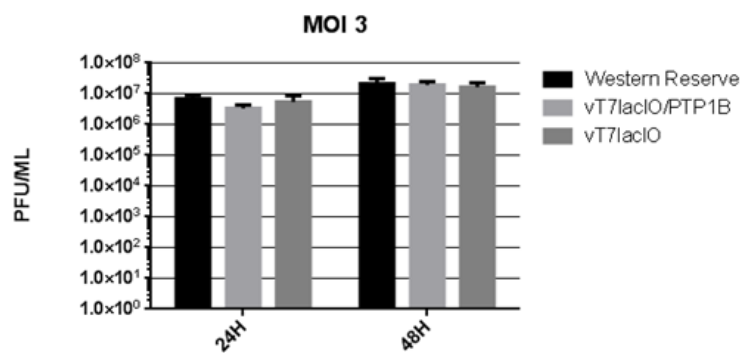
19B



19C



19D



**FIGURA 19. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE MULTIPLICAÇÃO VIRAL.**

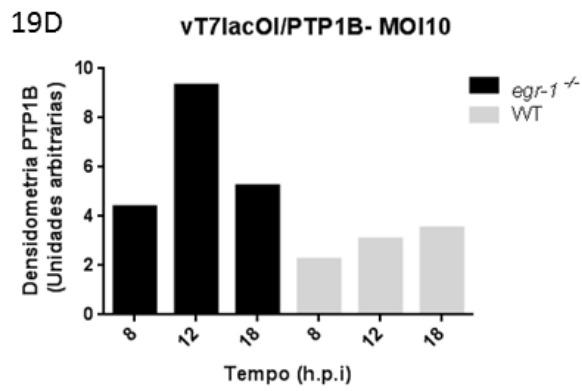
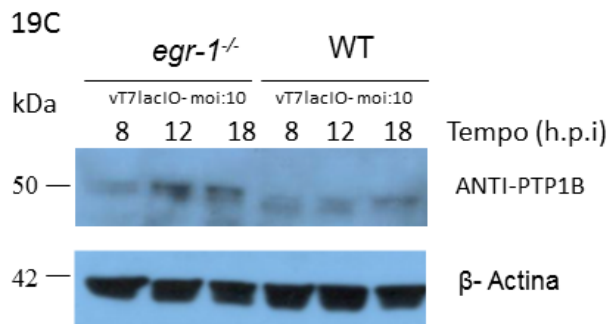
(A) Células BSC-40 foram crescidas e infectadas com 20 PFU dos vírus vT7lacOI/PTP1B e vT7LacOI, após 48 h foram fixadas com formol 10% e coradas com cristal violeta. (B) Foi realizada infecção com MOI de 0,01 com os vírus VT7laCoI, vT7lacOI/PTP1B, após os tempos indicados, as células foram congeladas e descongeladas 3 vezes e em seguida, foi coletado o sobrenadante, diluído seriadamente e titulado em BSC-40. Os dados foram analisados utilizando o software GraphPad prism 6 com o teste t student, tanto no pareado quanto no não pareado. (C-D) Foi realizada a infecção com MOI de 0,01 e MOI de 3 com os vírus VT7laCoI, vT7lacOI/PTP1B, Western Reserve, após os tempos indicados, as células foram congeladas e descongeladas e seguido o protocolo anteriormente descrito. Os dados foram analisados utilizando o software GraphPad prism 6 com o teste de one-way ANOVA para cada um dos tempos.

## 6.7 - EXPRESSÃO DE PTP1B EM MEF WT OU NOCAUTES PARA *egr-1* INFECTADOS COM O VÍRUS RECOMBINANTE

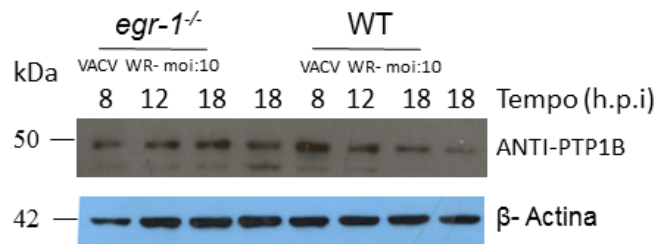
A literatura relata que EGR-1 é capaz de se ligar à região promotora e reprimir a transcrição do gene codificador para a proteína tirosina fosfatase 1 B (PTP1B). PTP1B tem a capacidade de regular a atividade das tirosinas cinases celulares, tais como Src (FUKADA e TONKS, 2001; TONKS, 2003), que estão envolvidas na regulação da liberação de formas envelopadas dos OPXVs (REEVES et al., 2005).

Dados da tese de doutorado de BRASIL, 2010 e OLIVEIRA, 2013, demonstraram o efeito negativo que o fator de transcrição Egr-1, causa sobre a proteína tirosina fosfatase PTP1B. O estudo de BRASIL, 2010, utilizou a técnica de nocaute gênico sobre Egr-1, infectando células MEF WT e *egr-1<sup>-/-</sup>*, com *Orthopoxvirus* VACV e CPXV, e coletando os tempos de 12, 18 e 24 horas, observou um acúmulo da proteína PTP1B, durante os intervalos tardios de infecção nas células nocautes. Um perfil semelhante, de acúmulo da proteína PTP1B foi observado por OLIVEIRA, 2013, utilizando a técnica de dominante negativo para *egr-1*. Desta forma, buscou-se obter os mesmos resultados, com o vírus vT7lacOI/PTP1B e como controle experimental foram infectadas células MEF WT e *egr-1<sup>-/-</sup>* com o VACV WR (FIGURA 20 A-B).

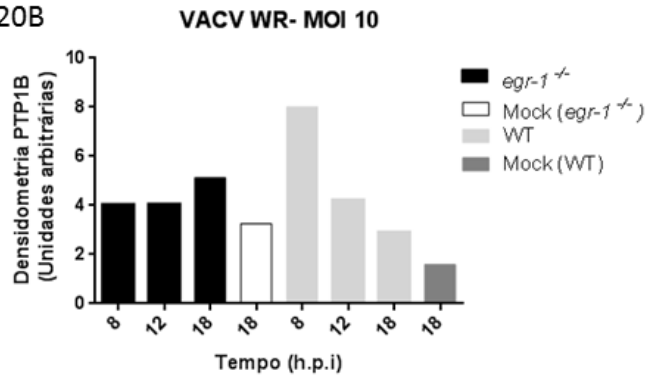
Como observado, na figura 20 C-D, foi possível observar entre 12 e 18 h.p.i, a expressão de PTP1B é ligeiramente aumentada em MEF *egr-1<sup>-/-</sup>* em comparação com MEF WT, infectadas com VACV vT7lacOI/PTP1B.



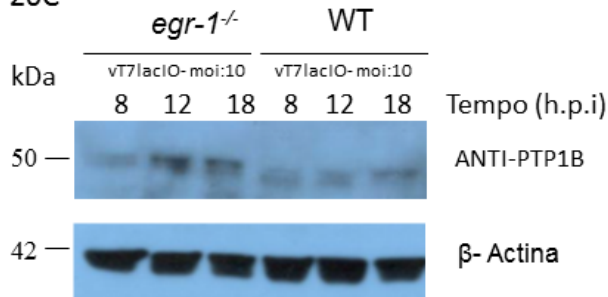
20A



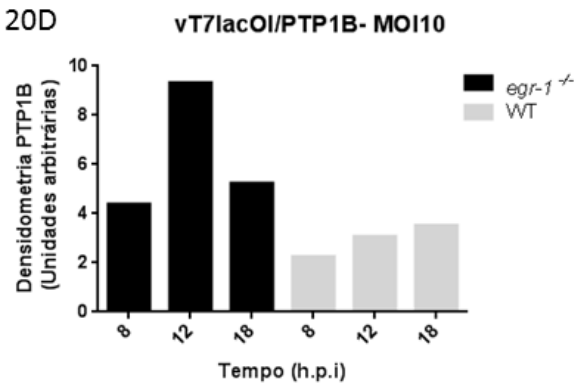
20B



20C



20D





**FIGURA 20. EXPRESSÃO DA PROTEÍNA PTP1B EM MEF WT E *egr-1*<sup>-/-</sup>**

(A-D)MEF foram infectados com VAVC WR ou vT7lacOI/PTP1B, na MOI de 10, e foram coletados os tempos de 8,12,18 h. As células foram coletas e processadas para extração de proteínas celulares totais. 40 µg de extrato proteico foram fracionados por eletroforese (SDS-PAGE). A membrana foi incubada com o anticorpo anti-PTP1B (1:1000). O anticorpo anti-β-actina (1:5000) foi utilizado para controle de carregamento (B e D). Análise densitométrica da expressão de PTP1B durante a infecção pelo VAVC WR ou vT7lacOI/PTP1B em MEF WT/*egr-1*<sup>-/-</sup>, foram realizadas utilizando o *software* ImageJ e os gráficos plotados no *software* GraphPad Prism versão 6.0.

## V - DISCUSSÃO

Em uma infecção efetiva, o ambiente celular é influenciado pelo vírus para gerar um ambiente propício para o estabelecimento da infecção e multiplicação (MUNTER, WAY e FRISCHKNECHT, 2006). Já está descrito na literatura o envolvimento do VACV com a via de MEK/ERK como sendo importante para multiplicação do vírus e levando ao acúmulo do fator de transcrição EGR-1 (ANDRADE, A.A. et al., 2004; SILVA P.N.G et al., 2006) que poderia atuar sobre a proteína tirosina fosfatase PTP1B, sendo este evento importante para a disseminação das formas envelopadas do vírus (BRASIL, 2010; OLIVEIRA, 2013). Neste trabalho, foi desenvolvida uma ferramenta para o estudo aprofundado do possível papel da proteína fosfatase PTP1B na biologia do VACV. Para a construção desta ferramenta foi necessário, primeiramente o desenho da sequência de PTP1B e para isto foi utilizado o banco de dados, GenBank onde pesquisou-se a sequência codificadora de PTP1B de *Mus musculus*, (Gene ID: 19246, CCDS17107.1.), sendo escolhido esse organismo devido à célula que foi utilizada para avaliar a regulação de egr-1 sobre PTP1B que são provenientes de camundongo MEF (fibroblastos embrionários murinos). Juntamente com a sequência foi adicionado na posição C-terminal um TAG-FLAG, para facilitar a detecção da proteína nos ensaios de “Western-blot”. Para que o inserto pudesse ser clonado no vetor de expressão pVOTE.1 foram também desenhados sítios de enzima de restrição EcoRI e NcoI. Posteriormente, esta sequência foi clonada no vetor de expressão pUC19.

O plasmídeo pUC19/PTP1B foi digerido utilizando as enzimas de restrição EcoRI e NcoI. A reação de digestão foi eficiente e o produto obtido demonstrou o tamanho esperado do inserto. Este produto foi utilizado para a reação de ligação com o plasmídeo pVOTE.1 (WARD, et al., 1995), um vetor de expressão para células eucariontes que apresenta um sistema de seleção (*gpt*) e possibilita a recombinação homóloga no *locus* do gene A56R do VACV, um gene não essencial à multiplicação do vírus em cultivo celular (DeHAVEN, et al., 2011). Após a reação de ligação, foi realizado o sequenciamento do inserto, utilizando iniciadores específicos para a sequência do plasmídeo (T7) e do inserto de *PTP1B*. O sequenciamento revelou somente uma mutação silenciosa, não modificando o aminoácido gerado: arginina (FIGURA 14 E-F).

Após a análise do sequenciamento, foi realizado o ensaio de recombinação utilizando o vírus vT7lacOI e o plasmídeo pVOTE.1/PTP1B para a geração do vírus vT7lacOI/PTP1B. A linhagem VACV modificada vT7lacOI, já foi anteriormente utilizado com ferramenta pra

expressão de proteínas em estudos de diversos vírus como o *Hendra virus*, *Nipah virus* (Bonaparte et al., 2005) coronavírus (Simmons et al., 2003), HIV (Reeves et al., 2002) e o VAVC (Sanz e Moss, 1999; Shors, Keck e Moss 1999; Senkevich et al., 2005; De Silva et al., 2007; Meng, et al., 2012), nestes estudos o vírus vT7lacOI, pode fornecer uma produção de proteína de forma regulável pela indução de IPTG, é ajudou a elucidar o papel exercido da proteína viral no ciclo de multiplicação do vírus, em nosso estudo o vírus recombinante produzido também será posteriormente utilizado para estudo da multiplicação viral, mas especificamente a etapa de liberação.

O sistema de vírus vT7LacOI recombinado com o vetor p.VOTE1, possibilita a utilização de sistema de seleção química utilizando ácido micofenólico, hipoxantina e xantina, para a seleção do clone vírus recombinado, no caso do estudo o clone vT7lacOI/PTP1B, devido o fato da recombinação gerar menos de 1% de vírus recombinante na progênie resultante (RICE A. D. et al., 2001).

Após a etapa de seleção, foi realizado uma triagem por PCR de quais clones coletados continham o marcador FLAG, resultando em 80% de positividade entre os clones (FIGURA 16 A). O fato de um clone não ser positivo no PCR, pode ter ocorrido pela ineficiência do método de recombinação e seleção utilizado.

Um dos clones positivos na PCR do marcador FLAG, foi selecionado aleatoriamente para realizar o sequenciamento e o ensaio de detecção da proteína por “Western-blot”. A análise do sequenciamento revelou que a sequência gerada era igual a do plasmídeo pVOTE.1/PTP1B (FIGURA 16 B). Somente uma pequena região do inserto não foi sequenciada, correspondente ao aminoácido glicina e a sequência de término. O ensaio de “Western-blot” revelou que a proteína PTP1B, apresentava uma banda com massa molecular esperada de 51kDa (FIGURA 17 A). A compilação destes dados demonstrou que a proteína é codificada pelo vírus recombinante.

Para prosseguir o trabalho, iniciaram-se os estudos para verificar se o vírus recombinante apresentava alguma modificação na sua capacidade de multiplicação, visto que este não contém o gene *ha* (A56R), devido à inserção da sequência codificadora de PTP1B neste *locus*. A literatura relata que o gene A56R, não é essencial para a replicação do vírus e pode ser utilizado para inserção de genes de proteínas e construção de vírus recombinantes (DeHAVEN, et al., 2011). Os ensaios de titulação com MOI baixa e alta e o ensaio de fenótipo de placa, confirmaram que o vírus vT7lacOI/PTP1B, não apresenta diferença na sua

capacidade de multiplicar se comparado a seu parental vT7lacOI, ou a linhagem Western Reserve (FIGURA 19 A-D), dados semelhantes foram encontrados por SHORS e colaboradores, 1999.

Paralelamente aos ensaios, avaliando a capacidade de multiplicação e disseminação do vírus recombinante foram feitos experimentos em células MEF WT. Esta célula foi utilizada devido a hipótese que o trabalho tenta corroborar, se de fato ocorre uma regulação sobre PTP1B pelo fator de transcrição EGR-1 (BRASIL, 2010; OLIVEIRA, 2013), que foi verificaram anteriormente por meio de “Western-blot”, a diminuição da expressão de PTP1B em células WT. Foram então, realizados ensaios de “Western-blot”, qPCR, que juntos demonstraram que a célula MEF WT, era capaz de produzir a proteína PTP1B, após a adição de IPTG. O ensaio de western-blot detectou a expressão da proteína com 24 h (FIGURA 18B), enquanto o ensaio de qPCR, mostrou um aumento da expressão do RNAm codificador de *ptp-1b*, após 10 horas de infecção (FIGURA 18 A). Após estes ensaios, foi feita uma otimização para produzir as condições para que se produzisse a proteína em melhores concentrações e de maneira mais precoce, foi então que pré- tratou as células com IPTG a (200µM, 500 µM, 1mM) por 1 hora e durante toda infecção foi inoculado meio contendo o indutor, com este protocolo houve a detecção da proteína, de maneira mais precoce, após 10 horas de infecção (FIGURA 18 C). Para corroborar com estes dados foi realizado, uma microscopia de imunofluorescência, onde foi visto que com a adição de IPTG há um acúmulo da proteína PTP1B na célula (FIGURA 18 D).

Foi demonstrado ainda que a expressão de PTP1B é inibida durante períodos tardios da infecção pelo vT7lacOI/PTP1B, de maneira dependente de EGR-1 (FIGURA 20 B). BRASIL, 2010 observou que a expressão de PTP1B, também é inibida durante períodos tardios da infecção pelo VACV e CPXV, também de forma dependente de EGR-1. FUKADA e TONKS, 2001 relatam que o fator de transcrição EGR-1 se liga à região promotora do gene codificador de PTP1B regulando-o negativamente. Com base nestes estudos, criamos a hipótese que PTP1B seja regulado por EGR-1, durante a infecção pelo VACV.

O estudo de BRASIL, 2010, relata que EGR-1 atua sobre as formas envelopadas do VACV independente do estado mitogênico da célula hospedeira, visto que no ensaio de multiplicação viral, observou-se um menor título de VACV em células MEF *egr-1<sup>-/-</sup>*, quando comparadas as células MEF WT. Além disso, foi observado que a inibição farmacológica de PTP1B reverte o fenótipo de processamento de liberação de partículas EEV e CEV em MEF

WT. Com base nesses dados, foi então inferido um possível efeito de PTP1B sobre a disseminação do VACV. Visto na FIGURA 20 (C-D), conseguimos obter dados semelhante ao trabalho de BRASIL, 2010, ao que se refere a regulação de PTP1B por EGR-1. Além disso, conseguimos controlar a expressão de PTP1B com IPTG (FIGURA 18 B) . Assim, este trabalho oferece uma ferramenta importante para estudos futuros que visam um melhor entendimento dos processos envolvidos com ciclo de multiplicação do VACV, uma vez que o vírus recombinante vT7lacOI/PTP1B, aqui desenvolvido, poderá ser usado para esses fins.

## VI - CONCLUSÃO

- 1- Foi produzido um cassete (gene sintético) contendo o gene murino que codifica para PTP1B, os sítios de restrição específico para inserção no vetor de transporte pVOTE.1 e um marcador de FLAG para a detecção específica do gene expressando ectopicamente, gerando o plasmídeo p.VOTE.1/PTP1B, que com a análise de sequenciamento demonstrou conter uma sequência correta do inserto.
- 2- O plasmídeo pVOTE.1/PTP1B juntamente com a amostra VACV vT7lacOI, foi utilizada para a inserção do gene sintético de PTP1B, por recombinação homóloga, resultando na geração do vírus vT7lacOI/PTP1B, este vírus foi posteriormente selecionado e amplificado e avaliado a sequência do inserto PTP1B pela técnica de sequenciamento, demonstrando ter uma sequência correta do inserto inserido em seu genoma.
- 3- A análise da transcrição do gene *ptpn1* em células infectadas com o vírus vT7lacOI/PTP1B, pela técnica de PCR quantitativo, demonstrou que com adição de IPTG houve um aumento da expressão de RNAm codificador de PTP1B.
- 4- A avaliação da expressão ectópica da proteína PTP1B por Western Blot em células BSC-40 e MEF infectadas com o vírus recombinante foi realizada e visualizou-se a expressão da proteína PTP1B.
- 5- Foi constatado com análise de microscopia imunofluorescência que as células infectadas com o vírus recombinante, com adição de IPTG apresentavam aumento da expressão da proteína PTP1B.
- 6- A avaliação da capacidade de multiplicação e disseminação do vírus recombinante constatou que não houve alteração no perfil de multiplicação viral, pela inserção da sequência codificadora de PTP1B na região da hemaglutinina do vírus.
- 7- Verificou-se com análise da expressão endógena de PTP1B em células deficientes em Egr-1 infectadas com o vírus vT7lacOI/PTP1B, que houve um aumento da expressão da proteína PTP1B em tempos tardios da infecção, sugerindo que o fator de transcrição Egr-1 regule negativamente a proteína tirosina fosfatase em tempos tardios da infecção.

## VII - PERSPECTIVAS

Com base nos dados obtidos, este trabalho tem com perspectiva avaliar a possível regulação de PTP1B pelo fator de transcrição Egr-1 durante a infecção pelo VACV, e se esta proteína atuaria na disseminação viral regulando as tirosinas cinases Src e Abl. Para isto, será necessário o desenvolvimento de experimentos adicionais para o esclarecimento deste possível mecanismo. Abaixo uma lista de alguns ensaios a serem realizados:

-Avaliar a interação física de PTP1B com os fatores Src e Abl, por ensaio de imunoprecipitação após infecção pelo VACV;

-Analisar, por microscopia de imunofluorescência, a localização de PTP1B e as proteínas tirosina-cinases,

-Realizar ensaios de titulação, com objetivo de avaliar os possíveis efeitos que o aumento de PTP1B acarretaria na disseminação do vírus em células MEF WT e *egr-1*<sup>-/-</sup>.

-Investigar o efeito do aumento de PTP1B sobre a formação das caudas de actina, nas células MEF WT e *egr-1*<sup>-/-</sup>.

-Analisar, por meio de ensaio de gene repórter de luciferase, se Egr-1 regula de fato o gene *ptn1* durante a infecção pelo VACV.

## VIII - BIBLIOGRAFIA

Abrahão J.S. et al. Bovine Vaccinia Outbreaks: Detection and Isolation of Vaccinia Virus in Milk Samples. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.6, n.9, p 1141-1146, 2009.

Albanaz, J. D. **Envolvimento de p38 MAPK no ciclo de vida do *Vaccinia virus***.2014. Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2014.

Alexander, W. A.; Moss B.; Fuerst T. R. Regulated Expression of Foreign Genes in Vaccinia Virus under the Control of Bacteriophage T7 RNA Polymerase and the Escherichia coli lac Repressor. **American Society for Microbiology**, v.66, n.5, p. 2934-2942.

Andrade, A. A. et al. The vaccinia virus-stimulated mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway is required for virus multiplication. **Biochemical Journal**, v. 381, p. 437-446, 2004.

Andrade L. G. et al. Vaccinia virus dissemination requires p21-activated kinase 1. **Archives of Virology**, v. 161, n. 11, p. 2991-3002, 2016.

Babkin, I. v.; Babkina A.N. The Origin of the Variola Virus. **Viruses**, v.7, n. 3, p.1100-1112, 2015.

Bakke, J.; Haj, F. G. Protein-tyrosine phosphatase 1B substrates and metabolic regulation. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v. 37, p. 58-65, 2015.

Bedadala, G. R. et al. Lytic HSV-1 infection induces the multifunctional transcription factor Early Growth Response-1 (EGR-1) in rabbit corneal cells. **Virology Journal**, v. 8, 2011.

Bonaparte M I. et al. Ephrin-B2 Ligand Is a Functional Receptor for Hendra Virus and Nipah Virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.102, n. 30, 2005.

Bonjardim, C. A. Viral exploitation of the MEK/REK pathway – A tale of vaccinia virus and other viruses. **Virology**, 2016. No prelo



Bourdeau, A.; Dube, N.; Tremblay, M. L. Cytoplasmic protein tyrosine phosphatases, regulation and function: the roles of PTP1B and TC-PTP. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 17, n. 2, p. 203-209, 2005.

Brasil, B.S.A.F. **Papel regulatório das vias sinalizadoras celulares MEK/EKR/EGR e MKK/JNK sobre na multiplicação e disseminação dos Orthopoxvirus: Vaccinia virus e Comox virus. 2010.** Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2010.

Broyles, S. S. Vaccinia virus transcription. **Journal of General Virology**, v. 84, p. 2293-2303, 2003.

Campos, M.A.S.; Kroon, E.G. Critical period for irreversible block of Vaccinia virus replication. **Rev Bras Microbiol**, v.24,p104-110, 1993.

Cargnello, M.; Roux, P. P. Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 76, n. 2, p. 496-496, 2012.

Carter, G. C. et al. Entry of the vaccinia virus intracellular mature virion and its interactions with glycosaminoglycans. **Journal of General Virology**, v.86, n.5, p. 1279-1290, 2005.

Chang, Y. et al. Induction of the early growth response 1 gene by *Epstein-Barr virus* lytic transactivator Zta. **Journal of Virology**, v. 80, n. 15, p. 7748-7755, 2006.

Condit, R. C.; Moussatche, N.; Traktman, P. In a nutshell: Structure and assembly of the vaccinia virion. **Advances in Virus Research**, v. 66, p. 31-124, 2006.

Czerny, C-P. eds. **Zoonoses - Infections Affecting Humans and Animals: Focus on Public Health. 1 ed.** Holanda: Springer, cap.20, p 497-527, 2015.

Damaso C.R. et al. An emergent poxvirus from humans and cattle in Rio de Janeiro State: Cantagalo virus may derive from Brazilian smallpox vaccine. **Virology**, v.277, n.2, p. 439-449, 2000.

Damon, I.K. eds. **Fields Virology 6<sup>a</sup> ed.** Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, cap 67, p. 2160- 2158, 2013.

Decker, E. L. et al. Early growth response proteins (EGR) and nuclear factors of activated T cells (NFAT) form heterodimers and regulate proinflammatory cytokine gene expression. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 3, p. 911-921, 2003.

Denu J M; Dixont J E. **Protein tyrosine phosphatases: mechanisms of catalysis and Regulation.** Current Opinion in Chemical Biology, v.2,n.5, 1998.

De Haven B. C.; Gupta K.; Isaacs S. N. The vaccinia virus A56 protein: a multifunctional transmembrane glycoprotein that anchors two secreted viral proteins. **Journal of General Virology**, v. 277, n.2, p. 1971-1980, 2011.

De Magalhaes, J. C. et al. A mitogenic signal triggered at an early stage of vaccinia virus infection - Implication of MEK/ERK and protein kinase in a virus multiplication. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 42, p. 38353-38360, 2001.

De Silva, F. S. et al. Poxvirus DNA primase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 47, 2007.

Dyson, O. F.; Traylen, C. M.; Akula, S. M. Cell Membrane-bound Kaposi's Sarcoma-associated Herpesvirus-encoded Glycoprotein B Promotes Virus Latency by Regulating Expression of Cellular Egr-1. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 48, p. 37491-37502, 2010.

Fan, Y. et al. Activation of Egr-1 Expression in Astrocytes by HIV-1 Tat: New Insights into Astrocyte-Mediated Tat Neurotoxicity. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 6, n. 1, p. 121-129, 2011.

Feldhammer, M . et al. PTP1B: A simple enzyme for a complex world. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 48, n. 5, p. 430-445, 2013.

Fu, M. G. et al. Egr-1 target genes in human endothelial cells identified by microarray analysis. **Gene**, v. 315, p. 33-41, 2003.

Fukada, T.; Tonks, N. K. The reciprocal role of Egr-1 and Sp family proteins in regulation of the PTP1B promoter in response to the p210 Bcr-Abloncoprotein-tyrosine kinase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 27, p. 25512-25519, 2001.

Golden, J. W.; Hooper, J. W. The strategic use of novel smallpox vaccines in the post-eradication world. **Expert Review of Vaccines**, v. 10, n. 7, p. 1021-1035, 2011.

Gossler, U.; Schmid, R. M.; Holzmann, B. Regulation of Egr-1-dependent gene expression by the C-terminal activation domain. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 255, n. 2, p. 208-215, 1999.

Greber, U. F. Signalling in viral entry. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 59, n. 4, p. 608-626, Abril 2002.

Haller, S. L. et al. *Poxviruses* and the evolution of host range and virulence. **Infection Genetics and Evolution**, v. 21, p. 15-40, 2014.

Hendrickson, R. C. et al. *Orthopoxvirus* Genome Evolution: The Role of Gene Loss. **Viruses**, v. 2, n. 9, p. 1933-1967, 2010.

Internacional Committee On Taxonomy Of Viruses - ICTV. Disponível em <<http://www.ictvonline.org>> Acesso em 04/01/2015.

Jacobs et al. Vaccinia virus vaccines: Past, present and future. **Antiviral Research**, v. 84, n.1, p 1-13, 2009.

Joklik, W.K. The purification of four strains of poxvirus. **Virology**, v. 18, n.1, p 9-18, 1962.

Kalia M.; Jameell S. Virus entry paradigms. **Amino Acids**, v.4, n.5, p. 1147-1157, 2011.

Krishna, M.; Narang, H. The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, n. 22, p. 3525-3544, 2008.

Kroon E.G. et al. Zoonotic Brazilian Vaccinia virus: From field to therapy. **Antiviral Research**, v.4, n.5, p. 150-163.

Krungkrai, S. R.; Krungkrai J. Insights into the pyrimidine biosynthetic pathway of human malaria parasite *Plasmodium falciparum* as chemotherapeutic target *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, v.9, n.6.2016.

Leite, F.: Way M. The role of signalling and the cytoskeleton during Vaccinia Virus egress. ***Virus Research***, v.209, p.87-99, 2015.

Leite J.A. et al. Passatempo virus, a vaccinia virus strain, Brazil. ***Emerg Infect Dis***, v.11, n.12, p. 1935–1938, 2005

Liu, L. et al. From Crescent to Mature Virion: Vaccinia Virus Assembly and Maturation. ***Viruses***, v. 6, n. 10, p. 3787-3808, 2014.

Livak, K.J., Schmittgen, T.D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. ***Methods***, v.25, n.4, p. 402-408, 2001.

McFadden, G. Poxvirus tropism. ***Nature Reviews Microbiology***, v. 3, p. 201-213, 2005.

McFadden, G. Killing a Killer: What Next for Smallpox?.***Plos Pathogens***, v. 6, n. 1, Jan 2010.

Meng, X. Vaccinia Virus A6 Is Essential for Virion Membrane Biogenesis and Localization of Virion Membrane Proteins to Sites of Virion Assembly. *Journal of Virology*, v.86, n. 10, p. 5603–5613.

Mishra, A. C. Smallpox: Forgotten by Public, Remains a Concern for Public Health. ***Proceedings of the National Academy of Sciences India Section B-Biological Sciences***, v. 82, n. 1, p. 23-29, 2012.

Moss, B. Poxvirus entry and membrane fusion.***Virology***, v. 344, p. 48-54, 2006.

Moss, B. eds. ***Fields Virology 6<sup>a</sup> ed.*** Philadelphia: Lippincott-Raven Williams & Wikins, cap 66, p.2129-2159, 2013.

Moss, B. Reflections on the early development of poxvirus vectors. *Vaccine*, v.31, p. 4220-4222, 2013.

Mulligan, R. C.; Berg P.; Selection for animal cells that express the *Escherichia coli* gene coding for xanthine-guanine phosphoribosyltransferase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 78, n.4, p. 2072-2076, 1981

Munter, S. Way, M. e Frischknecht, F. Signaling during pathogen infection. *Science STKE*, v.2006,n.335,p 1-13, 2006.

Newsome, T. P.;Scaplehorn N.; Way M. SRC mediates a switch from microtubule- to actin-based motility of vaccinia virus. **Science**, v. 306,n 5693, p.124-129, 2004.

Pagel, J.-I.; Deindl, E. Concepts of Egr-1 Activation - A Hub for Signal Transduction Cascades. **Current Signal Transduction Therapy**, v. 5, n. 2, p. 149-160, 2010.

Pauli G. et al. Orthopox Viruses: Infections in Humans. **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, v. 37, n. 6, 2010

Pereira, A. C. T. C. et al. A *Vaccinia virus*-Driven Interplay between the MKK4/7-JNK1/2 Pathway and Cytoskeleton Reorganization. **Journal of Virology**, v. 86, n. 1, p. 172-184, 2012.

Oliveira, L.C. **Papel exercido pelos reguladores transcricionais egr-1 e c-fos sobre a disseminação do Vaccinia vírus**. 2013. Tese (Doutorado em Microbiologia)- Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

Reeves, J. D. et al. Sensitivity of HIV-1 to Entry Inhibitors Correlates with Envelope/Coreceptor Affinity, Receptor Density, and Fusion Kinetics. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 25, p. 16249-16254.

Reeves, P.M. et al. Disabling poxvirus pathogenesis by inhibition of Abl-family tyrosine kinases. **Nature Medicine**, v. 11, p 731-739, 2005.

Rice, A. D. et al. An Efficient Method for Generating Poxvirus Recombinants in the Absence of Selection. **Viruses**, v.3, p.217-232, 2011

Riedel S. Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination. **Proceedings Baylor University Medical Center**, v.18, n.1, p. 21-25

Roberts, K. L.; Smith, G. L. *Vaccinia virus* morphogenesis and dissemination. **Trends in Microbiology**, v. 16, n. 10, p. 472-479, 2008.

Romagnoli, L. et al. Early growth response-1 protein is induced by JC virus infection and binds and regulates the JC virus promoter. **Virology**, v. 375, n. 2, p. 331-341, 2008.

Salgado, A. P. C. et al. Study of Vaccinia and Cowpox viruses' replication in Rac1-N17 dominant-negative cells. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 5, p. 554-562, 2013.

Sanz, P., Moss B et al. Identification of a transcription factor, encoded by two vaccinia virus early genes, that regulates the intermediate stage of viral gene expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, p. 2692–2697, 1999.

Schmidt, F.I., Bleck, C.K., Helenius, A., and Mercer, J. Vaccinia extracellular virions enter cells by macropinocytosis and acid-activated membrane rupture. **The EMBO Journal**, v.30, n.17, p.3647–3661, 2011.

Schmidt, F. I.; Bleck, C. K. E.; Mercer, J. Poxvirus host cell entry. **Current Opinion in Virology**, v. 2, n. 1, p. 20-27, 2012.

Schmidt, F. I. et al. Vaccinia virus Entry Is Followed by Core Activation and Proteasome-Mediated Release of the Immunomodulatory Effector VH1 from Lateral Bodies. **Cell Reports**, v. 4, n. 3, p. 464-476, 2013.

Senkevich, T. G. et al. Multiprotein Entry-Fusion Complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 51, p. 18572-18577.

Shchelkunov, S. N. An Increasing Danger of Zoonotic Orthopoxvirus Infections. **Plos Pathogens**, v. 9, n. 12, Dez 2013.

Shi, L. et al. Lipopolysaccharide stimulation of ERK1/2 increases TNF-alpha production via Egr-1. **American Journal of Physiology-Cell Physiology**, v. 282, n. 6, p. 1205-1211, 2002.

Shors, T., Keck J. G., Moss B. Down Regulation of Gene Expression by the Vaccinia Virus D10 Protein. **Journal of Virology**, v.73, n.1, p. 791-796, 1999.

Simmons G. et al. Characterization of severe acute respiratory syndrome-associated coronavirus (SARS-CoV) spike glycoprotein-mediated viral entry. **PNAS**, v.101, n.12, p. 4240-4245, 2004.

Silva, P. N. G. et al. Differential role played by the MEK/ERK/EGR-1 pathway in *Orthopoxviruses* vaccinia and cowpox biology. **Biochemical Journal**, v. 398, p. 83-95, 2006.

Silverman, E. S.; Collins, T. Pathways of Egr-1-mediated gene transcription in vascular biology. *American Journal of Pathology*, v. 154, n. 3, p. 665-670, Mar 1999.

Singh, R. K. et al. Emergence and Reemergence of Vaccinia-Like Viruses: Global Scenario and Perspectives. **Indian Journal of Virology**, v. 23, n. 1, p. 1-11, 2012.

Smith, G. L.; McFadden, G. Smallpox: anything to declare? **Nature Reviews Immunology**, v. 2, p. 521-527, 2002.

Soares, J. A. P. et al. Activation of the PI3K/Akt Pathway Early during Vaccinia and Cowpox Virus Infections Is Required for both Host Survival and Viral Replication. **Journal of Virology**, v. 83, n. 13, p. 6883-6899, 2009.

Thèves, C.; Crubézy E.; Biagini P.; History of Smallpox and Its Spread in Human Populations. **Microbiology Spectrum**, v.4, n.4, p.1-10, 2016.

Thiel, G.; Cibelli, G. Regulation of life and death by the zinc finger transcription factor Egr-1. **Journal of Cellular Physiology**, v. 193, n. 3, p. 287-292, 2002.

Tonks, N. K. PTP1B: from the sidelines to the front lines!. **FEBS Letters**. v.546, n. 1, p. 140-148, 2003.

Trindade G. S. et al. Araçatuba virus: a vaccinia-like virus associated with infection in humans and cattle. **Emerging Infectious Diseases**, v.9, n.2, 2003.

Trindade G.S. et al. Isolation of two vaccinia virus strains from a single bovine vaccinia outbreak in rural area from Brazil: implications on the emergence of zoonotic orthopoxviruses. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 75, n. 3, 2006.

Trindade, G.S. et al. .Brazilian Vaccinia viruses and their origins. **Emerging Infectious Diseases**, v.13, n.7, 2007.

Tsou, R. C.; Bence, K. K. Central regulation of metabolism by protein tyrosine phosphatases. **Frontiers in Neuroscience**, v. 6, 2013.

Virolle, T. et al. The Egr-1 transcription factor directly activates PTEN during irradiation-induced signalling. **Nature Cell Biology**, v. 3, n. 12, p. 1124-1128, 2001.

Wang, G. et al. Infection of human cancer cells with myxoma virus requires Akt activation via interaction with a viral ankyrin-repeat host range factor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 12, p. 4640-4645, 2006.

Ward, G. A. et al. Stringent chemical and thermal regulation of recombinant gene expression by vaccinia virus vectors in mammalian cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.92, p. 6773-6777, 1995.

Yip, S. C.; Saha. S.; Chernoff. PTP1B: a double agent in metabolism and oncogenesis. **Trends in Biochemical Sciences**. v.35, n.8, p. 442-449, 2010.

Yoo, Y. D. et al. The IE2 regulatory protein of human cytomegalovirus induces expression of the human transforming growth factor beta 1 gene through an Egr-1 binding site. **Journal of Virology**, v. 70, n. 10, p. 7062-7070, 1996.