



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**INDUÇÃO DO ESTRESSE DO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO  
CELULAR PELO *VACCINIA VIRUS*: MODULAÇÃO DA VIA UPR  
DURANTE A INFECÇÃO VIRAL**

**THIAGO LIMA LEÃO**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação do Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito necessário à formação como Mestre em Microbiologia.

Orientação: Prof. Dr. Flávio Guimarães da Fonseca

Co-orientação: M. Sc. Bárbara Resende Quinan

Belo Horizonte  
Outubro de 2013

**INDUÇÃO DO ESTRESSE DO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO  
CELULAR PELO *VACCINIA VIRUS*: MODULAÇÃO DA VIA UPR  
DURANTE A INFECÇÃO VIRAL**

**THIAGO LIMA LEÃO**

Belo Horizonte  
Outubro de 2013

*“A MENTE QUE SE ABRE A UMA NOVA IDÉIA JAMAIS  
RETORNA AO SEU TAMANHO ORIGINAL”.*

Albert Einstein

*Dedico esse trabalho a minha avó Zuleika (in  
memorian) por todo o seu amor e suporte*

## AGRADECIMENTOS

Ao professor Flávio Guimarães da Fonseca, pela oportunidade, por confiar, apoiar e por sua competência, dedicação e disponibilidade em orientar este trabalho.

À doutoranda Bárbara Resende Quinan, pela orientação, colaboração e confiança.

Ao professor Aristóbolo Mendes da Silva, pela confiança, por sua imprescindível colaboração que tornou esse trabalho possível, pela paciência nos ensinamentos e pela orientação com empenho e disposição.

Aos doutores Gabriel Magno de Almeida, Marco Antônio Campos e Viviane Gouvêia pela participação na avaliação desta dissertação.

À minha companheira Fábíola, por todo amor e dedicação.

A todos do laboratório de Virologia Básica e Aplicada pelas oportunas e relevantes contribuições e pelos ensinamentos ao longo desse trabalho.

Aos alunos de pós-graduação e graduação do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG, Mariana, Patrícia, Rodrigo e Fernando; à funcionária Tânia Mara, meu muito obrigado pela receptividade e ajuda constante.

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

Aos docentes e funcionários da Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.

À minha família por me apoiar e ajudar a tornar o meu sonho possível, em especial minha mãe.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a execução deste trabalho, meu muito obrigado!

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>VIII</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>X</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>XI</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>XVI</b>
<b>I – INTRODUÇÃO.....</b>	<b>18</b>
1.1 – O RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO E SUAS VIAS DE ATIVAÇÃO DE RESPOSTA AO ESTRESSE CELULAR.....	18
1.2 – SENSORES DO ESTRESSE DO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO.....	23
1.2.1 – <i>Proteína Cinase Dependente de Inositol - IRE1</i> .....	23
1.2.2 – <i>Proteína Cinase Residente no Reticulo Endoplasmático semelhante à PKR – PERK</i> .....	26
1.2.3 – <i>Fator de Transcrição 6 – ATF-6</i> .....	28
1.3 – CINÉTICA DA ATIVAÇÃO DOS SENSORES DA UPR.....	29
1.4 – VIA UPR E INFECÇÕES VIRAIS.....	30
1.5 – FAMÍLIA POXVIRIDAE.....	32
1.6 – MVA (VÍRUS VACCINIA ANKARA MODIFICADO).....	38
1.7 – RESPOSTA IMUNE INATA DO HOSPEDEIRO À INFECÇÃO POR VACV.....	40
1.8 – LUCIFERASE DE VAGA-LUMES.....	42
<b>II – JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>44</b>
<b>III – OBJETIVOS.....</b>	<b>46</b>
OBJETIVO GERAL.....	46
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	46
<b>IV – METODOLOGIA.....</b>	<b>47</b>
4.1 – ESTRATÉGIA DE TRABALHO.....	47
4.2 – AMOSTRAS VIRAIS RECOMBINANTES (RMVA).....	48
4.2.1 – <i>Origem dos Vírus rMVA</i> .....	48
4.2.2 – <i>Iniciadores</i> .....	49
4.2.3 – <i>Sequenciamento (SANGER et al., 1977; Dye Enamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBace – GE Healthcare)</i> .....	50
4.2.4 – <i>Análise das Sequências Nucleotídicas</i> .....	51
4.2.5 – <i>Produção de Células Fibroblásticas de Embriões de Galinha (CEFs)</i> .....	51
4.2.6 – <i>Repique Celular</i> .....	53
4.2.7 – <i>Seleção dos Vírus Recombinantes</i> .....	53
4.2.8 – <i>Amplificação dos Vírus Recombinantes</i> .....	54
4.2.9 – <i>Detecção do Gene para a Proteína Recombinante Luciferase</i> .....	55
4.2.10 – <i>Purificação Viral</i> .....	56
4.2.11 – <i>Titulação Viral</i> .....	57
4.2.12 – <i>Detecção do mRNA para a proteína Luciferase</i> .....	58
4.2.13 – <i>Células Fibroblásticas de Embriões de Camundongo (MEFs)</i> .....	59
4.2.14 – <i>Extração de Proteínas Totais (WCE)</i> .....	60
4.2.15 – <i>Quantificação das proteínas (Método de Bradford)</i> .....	60

4.2.16 – Fracionamento de proteínas em gel de poliacrilamida/SDS-PAGE.....	61
4.2.17 – Ensaios de Western-blot .....	61
4.2.18 – Plasmídio pGL3 control vector.....	62
4.2.19 – Obtenção dos plasmídio em pequena escala (Mini-preparações de DNA plasmidial).....	63
4.2.20 – Ensaios de atividade da proteína repórter Luciferase.....	64
4.3 – ANÁLISE DA OCORRÊNCIA DE ESTRESSE DO RETÍCULO ENDOPLASMÁTICO (RE).....	65
4.3.1 – RT-PCR-RFLP .....	65
<b>V – RESULTADOS .....</b>	<b>67</b>
5.1 – SEQUENCIAMENTO E ANÁLISE DAS SEQUÊNCIAS PLW44-HASS-LUC E PLW44-LUC .....	67
5.2 – PRODUÇÃO DOS VÍRUS RECOMBINANTES.....	70
5.3 – DETECÇÃO DO GENE PARA A PROTEÍNA LUCIFERASE .....	71
5.4 – DETECÇÃO DO MRNA PARA A PROTEÍNA LUCIFERASE.....	72
5.5 – DETECÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA LUCIFERASE.....	72
5.6 – AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DA PROTEÍNA LUCIFERASE.....	73
5.7 – ANÁLISE DO PROCESSAMENTO DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO XBP-1 DURANTE INFECÇÃO PELOS MVA RECOMBINANTES .....	75
5.8 – ANÁLISE DO PROCESSAMENTO DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO XBP-1 DURANTE INFECÇÃO PELOS VACVS. ....	76
5.9 – EFEITO DA INFECÇÃO POR VACV SOBRE O PROCESSAMENTO DO FATOR DE TRANSCRIÇÃO XBP-1 .....	77
<b>VI – DISCUSSÃO.....</b>	<b>79</b>
<b>VII – CONCLUSÕES.....</b>	<b>82</b>
<b>VIII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>83</b>

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** – Estresse do RE e funções da UPR.

**Figura 2** – Mecanismo de ação dos três principais braços da via UPR.

**Figura 3** – Múltipla via pró-apoptótica proveniente do RE.

**Figura 4** – Via de sinalização IRE1.

**Figura 5** – Modelo de controle traducional pela sequência líder do ATF4.

**Figura 6** – Via de sinalização ATF6.

**Figura 7** – Cinética da sinalização UPR e decisões de destino celular.

**Figura 8** – Sequência temporal da ativação da via UPR.

**Figura 9** – Morfologia do vírus Vaccínia.

**Figura 10** – Representação esquemática da replicação do DNA do VACV.

**Figura 11** – Ciclo de Multiplicação dos Poxvírus.

**Figura 12** – Representação esquemática que ilustra a diferença básica entre o vírus intracelular maduro e o vírus extracelular envelopado.

**Figura 13** – Representação esquemática da entrada das partículas IMV e EEV na célula hospedeira.

**Figura 14** – Deleções ocorridas no genoma do vírus VACV-ANK que culminaram na formação do vírus MVA.

**Figura 15** – Peptídeo sinal HASS.

**Figura 16** – Representação esquemática que ilustra a retirada dos embriões dos ovos. Além disso, é mostrada também a posição do corte e os órgãos a serem retirados.

**Figura 17** – Representação esquemática do plasmídeo pGL3-Control Vector.

**Figura 18** – Alinhamento entre a sequência do gene da Luciferase clonado no pLW44 e a sequência controle EF090416.1.



**Figura 19** – Alinhamento entre a sequência do gene da Luciferase, adicionado do peptídeo sinal HASS, clonado no plasmídeo pLW44, e a sequência controle EF090416.1.

**Figura 20** – Rodadas de seleção dos vírus recombinantes.

**Figura 21** – Amplificação do DNA codificador para a proteína Luciferase com os iniciadores pLW44-F e pLW44-R.

**Figura 22** – Amplificação do DNA codificador para a proteína Luciferase com os iniciadores pLW44-F e pLW44-R

**Figura 23** – Amplificação do DNA codificador para a proteína Luciferase com os iniciadores Luc-int-F e Luc-int-R

**Figura 24** – PCR Aninhada. Amplificação do DNA codificador para a proteína Luciferase com os iniciadores pLW44-F e pLW44-R seguido de amplificação com os iniciadores Luc-int-F e Luc-int-R

**Figura 25** – Amplificação do cDNA codificador para a proteína Luciferase com os iniciadores Luc-int-F e Luc-int-R

**Figura 26** – Detecção da proteína Luciferase

**Figura 27** – Análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição do DNA (PCR-RFLP) de células infectadas com os rMVAs.

**Figura 28** – Análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição do DNA (PCR-RFLP) de células infectadas com diferentes linhagens de VACV

**Figura 29** – Análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição do DNA (PCR-RFLP) de células infectadas com VACV e tratadas com indutor de estresse do RE

## **LISTA DE TABELAS**

**Tabela 1** – Iniciadores e suas respectivas sequências para amplificação do gene da Luciferase e ou análise do inserto.

**Tabela 2** – Análise da atividade enzimática da luciferase em CEFs após 48 horas de infecção e ou transfecção.

## LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
μL	Microlitros
μg	Microgramas
AIP1	<i>ASK1-interacting protein-1</i>
APCs	Células apresentadoras de antígenos
ASFV	<i>African Swine Fever Virus</i>
ASK1	<i>Apoptosis signal–regulating kinase 1</i>
ATF	<i>Activating transcription factor</i>
b-ZIP	zíper de leucina e a região básica da proteína que é responsável pela ligação no DNA
BAK	<i>Bcl-2 homologous antagonist/killer</i>
BAX	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BI-1	<i>ER membrane protein Bax inhibitor-1</i>
Bim	<i>Bcl-2-like protein 11</i>
BiP	<i>Binding immunoglobulin protein</i>
bp	Pares de bases
BSA	Soro Albumina Bovina
C/EBPζ	<i>CCAAT/enhancer binding protein Zeta</i>
Ca <sup>2+</sup>	Cátions divalentes de cálcio
CASPASE	<i>Cysteine-dependent Aspartate-Specific Proteases</i>
CEFs	<i>Chicken Embryo Fibroblasts</i>
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
cm <sup>2</sup>	Centímetro quadrado

CEV	Vírus envelopado associado às células
CHOP	CCAAT-Enhancer-Binding Protein Homologous Protein
D-MEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DDIT3	<i>DNA damage-inducible transcript 3</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxiribonucléico
DO	Densidade óptica
dNTP	Desoxiribonucleotídeo trifosfatado
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EcoRI	Enzima de restrição produzida pelo microrganismo <i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EEV	Vírus extracelular envelopado
eIF	Fator de iniciação da Tradução de Eucariotos
eIF2AK3	<i>Eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 3</i>
ERAD	Sistema de degradação associado ao Retículo Endoplasmático
ERK	Cinase regulada por sinal Extracelular
ERN1	<i>ER to nucleus signalling 1</i>
FADD	<i>Fas-associated protein with death domain</i>
GADD	<i>Growth arrest- and DNA damage-inducible gene</i>
GFP	Proteína verde fluorescente
GRP	Proteínas regulas por Glicose
H	Horas
H <sub>2</sub> O	Água
HA	Hemaglutinina
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
Hind III	Enzima de restrição produzida pelo microrganismo <i>Haemophilus influenza</i>

HSP	Proteína do Choque Térmico
IκB	<i>Inhibitor of kappa B</i>
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
IKK	<i>Inhibitor of kappa B Kinase</i>
IMV	Vírus intracelular maduro
IP-10	<i>Interferon-gamma-inducible protein 10</i>
IPS-1	Estimulador do promotor de interferon-β 1
IRE1	Proteína Cinase dependente de Inositol
JNK	<i>c-Jun N-terminal Kinase</i>
kb	Quilobases
kDa	Quilodaltons
LB	Meio Luria-Bertani
Luc	Luciferase
LVBA	Laboratório de Virologia Básica e Aplicada
LVC	Laboratório de Virologia Comparada
m.o.i	Multiplicidade de infecção
MCS	Múltiplo sítio de clonagem
MCP-1	Proteína monócito quimioatraente 1
MDA-5	Proteína do gene associado a diferenciação do melanoma 5
MEM	Meio mínimo essencial de Eagle
mg	Miligramas
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
mH5	Promotor modificado do vírus Vaccínia do tipo tardio/precoce
MIP-1beta	<i>Macrophage inflammatory protein 1-beta</i>
mL	Mililitros

mM	Milimolar
mRNA	RNA mensageiro
MVA	Vírus Vaccínia Ankara Modificado
MyD88	Fator de diferenciação mielóide 88
NALP3	<i>NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3</i>
NCK	<i>non-catalytic region of tyrosine kinase adaptor protein 1</i>
NFκB	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
ng	Nanogramas
nm	Nanômetros
nt	Nucleotídeos
ORF	Janela aberta de Leitura
p/v	Porcentagem peso/volume
PAR-4	<i>Prostate apoptosis response-4</i>
PARC	<i>Pulmonary and activation-regulated chemokine</i>
PBS	Solução salina fosfatada e tamponada
PCR	Reação em cadeia pela polimerase
PDI	<i>Protein disulfide isomerase</i>
PERK	<i>PKR-like endoplasmic reticulum kinase</i>
PFU	Unidade formadora de placa
PKR	<i>Protein kinase R</i>
PP2A	<i>Protein phosphatase 2</i>
PstI	Enzima de restrição produzida pelo microrganismo <i>Providencia stuartii</i>
PTP-1B	<i>Protein-tyrosine phosphatase 1B</i>
RACK1	<i>Receptor for activated C kinase 1</i>
RE	Retículo endoplasmático
RIDD	<i>Regulated IRE1 dependent decay</i>

rpm	Revoluções por minuto
rMVA	MVA recombinante
RNA	Ácido ribonucléico
rVAC	VACV recombinante
S1P	<i>Site-1 Protease</i>
S2P	<i>Site-2 Protease</i>
SDF – 1alfa	<i>Stromal cell-derived factor-1alpha</i>
Sall	Enzima de restrição produzida pelo microrganismo <i>Streptomyces albus</i>
SFB	Soro fetal bovino
SIV	Vírus da imunodeficiência de Símios
<i>SmaI</i>	Enzima de restrição produzida pelo microrganismo <i>Serratia marcescens</i>
TBK1	<i>TANK-binding kinase 1</i>
T <sub>CD4+</sub>	Células T auxiliares
T <sub>CD8+</sub>	Células T citotóxicas
TGN	Trans-Golgi <i>network</i>
TLR	Receptor do tipo toll
TRAF2	<i>TNF-R-associated factor-2</i>
UFC	Unidade formadora de colônia
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UPR	Resposta a proteínas mal formadas
V	Volts
VACV	Vírus Vaccínia
VARV	Vírus Variola
XBP-1	<i>X-box binding protein 1</i>

## RESUMO

A via UPR (do inglês *Unfolded Protein Response*) é uma resposta celular ao acúmulo de proteínas desenoveladas no lúmen do retículo endoplasmático, induzida por uma variedade de estímulos externos e internos, incluindo acúmulo de proteínas mal formadas. Vírus como o *Vaccinia Virus* induz às células hospedeiras produzirem grandes quantidades de proteínas virais que sofrem glicosilação e outras modificações pós-traducionais no retículo endoplasmático, podendo assim, sobrepular a capacidade da organela e conseqüentemente ativarem a via UPR da qual a via dependente de IRE1 é a mais conservada. O presente trabalho teve como objetivo avaliar se a produção excessiva de proteínas recombinantes direcionadas ao retículo endoplasmático, geradas a partir do vetor vacinal MVA, poderia desencadear a via de sinalização UPR e afetar negativamente a produção destas proteínas. Vírus MVA recombinante expressando a proteína luciferase endereçada ou não ao retículo endoplasmático foram gerados e fibroblastos murinos selvagens ou deficientes para PERK foram infectados por diferentes intervalos de tempo. Foi extraído o RNA total dessas células e feito ensaios de RT-PCR-RFLP para avaliar o perfil de processamento do fator de transcrição XBP-1. Os resultados sugerem que proteína recombinante está sendo produzida pelos vetores virais MVA. Adicionalmente os resultados sugerem que a via UPR é modulada pelos MVA recombinantes. Além disso, os dados mostram que, vírus MVA selvagens, bem como Vaccinia-WR são capazes de modular a sinalização via IRE1 mesmo na presença concomitante de um forte indutor de estresse do retículo endoplasmático. Assim concluiu-se que a inibição do processamento de XBP1, representa uma estratégia viral de modulação da resposta celular ao estresse não descrita anteriormente nos poxvírus.

**Palavras-chave:** Vírus Vaccinia, estresse do retículo endoplasmático, vetores virais recombinantes, vírus MVA, UPR, IRE1-XBP1



## **ABSTRACT**

*The unfolded protein response (UPR) is a cellular response to accumulation of unfolded proteins in the lumen of the endoplasmic reticulum (ER), induced by a variety of external and internal stimuli, including accumulation of misfolded proteins. Viruses such as Vaccinia Virus (VACV) induce host cells to produce large quantities of viral proteins, many of which undergo glycosylation and other modifications in the ER. This large protein input can overwhelm the work capacity of the organelle and consequently activate the UPR of which the inositol-requiring enzyme 1 (IRE1)-dependent pathway is the most conserved component. The aim of this work was to evaluate if the excessive production of recombinant proteins directed to ER, generated from the MVA vector, could trigger the UPR signaling pathway and negatively affect the production of these proteins. Recombinant MVA expressing the protein luciferase addressed or not to ER, were generated and MEFs wild-type or PERK-KO were infected. At different hours post infection, total RNA was extracted and RT-PCR-RFLP tests performed to assess the transcription factor XBP-1 splicing pattern. The results suggest that recombinant protein is being produced by viral vectors. Additionally, the data suggest that the UPR signaling pathway is modulated by rMVAs. Moreover, MVA wild-type and VACV-WR affected IRE1 in the same way, even in the presence of ER stress inducers. We concluded that IRE1 inhibition represents a previously undescribed poxvirus strategy to modulate cellular stress response.*

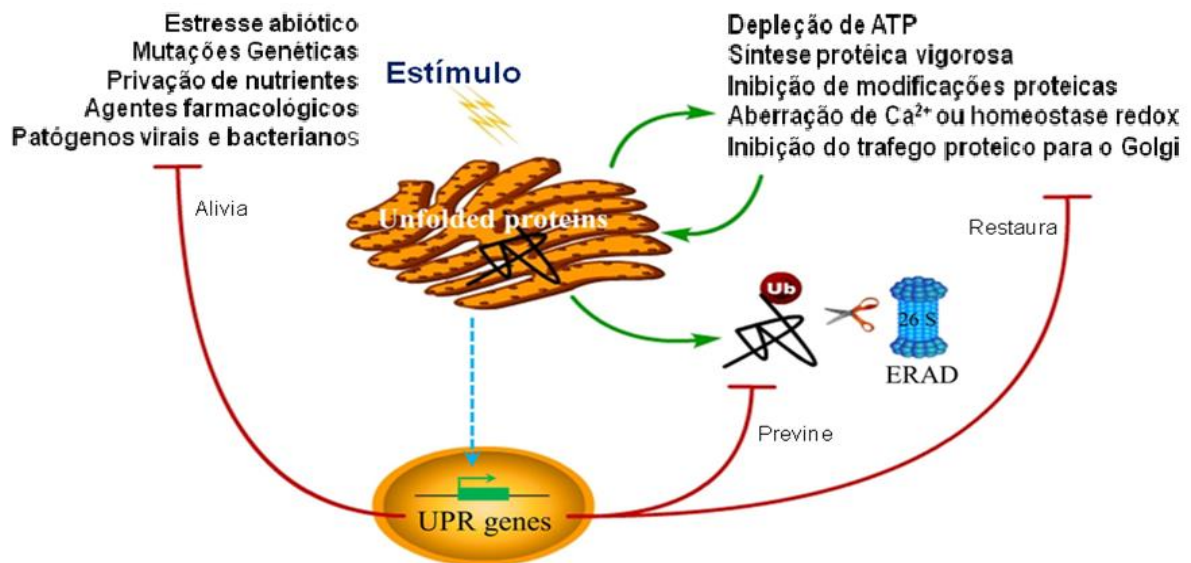
**Key-Words:** *Vaccinia virus, ER stress, recombinant viral vectors, MVA, UPR, IRE1-XBP1*

# I – INTRODUÇÃO

## 1.1 – O Retículo Endoplasmático e suas vias de ativação de resposta ao estresse celular

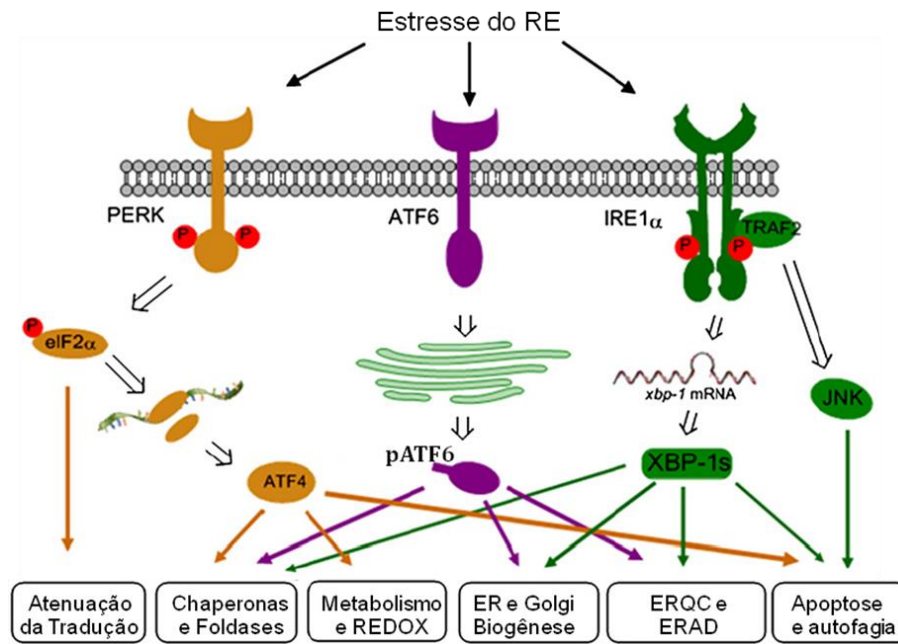
Grande parte das proteínas sintetizadas por uma célula eucariótica é destinada às vias endo/exocíticas. Para tal, essas proteínas possuem uma sequência sinal marcando-as para translocação do citoplasma para o lúmen do retículo endoplasmático (RE). A síntese de proteínas com a sequência sinal ocorre em ribossomos aderidos à membrana do RE e a sequência sinal ajuda a direcionar o ribossomo à membrana do RE (NELSON & COX, 2005, ALBERTS *et al.*, 2002). O lúmen do RE é um ambiente único, que contém a maior concentração de íons  $\text{Ca}^{2+}$  dentro da célula devido ao transporte ativo de íons de  $\text{Ca}^{2+}$  por cálcio ATPases. O lúmen do RE quando comparado ao citossol é um ambiente oxidativo, fundamental para a formação de pontes dissulfídicas nas proteínas em maturação permitindo a estabilização da estrutura protéica. Devido às proteínas serem translocadas como cadeias polipeptídicas não dobradas, o lúmen do RE possui uma infinidade de chaperonas cálcio-dependentes, lectinas, foldases e glucosidases que auxiliam na formação de pontes dissulfídicas e glicosilação (somente de glicoproteínas) permitindo o dobramento e montagem correta das proteínas.

O RE é uma organela multifuncional, que, além de garantir a estrutura correta das proteínas, possui um papel chave na síntese de lipídeos, esteróis e na manutenção do cálcio intracelular (FAGONE & JACKOWSKI, 2009). Desta forma, o RE é sensível a perturbações na homeostase celular que são desencadeadas por diferentes tipos de estresse, podendo ser de origem endógena ou exógena, e incluem, por exemplo, danos químicos, mutações gênicas, insuficiência de nutrientes, diferenciação celular e também infecções por diferentes patógenos (WALTER & RON, 2011; ZHANG & WANG, 2012.). Essas perturbações podem causar alterações na estrutura das proteínas nascentes levando ao acúmulo de proteínas mal dobradas no RE, uma condição denominada estresse do RE (Figura 1) (RON & WALTER, 2007).



**Figura 1: Estresse do RE e funções da UPR.** Perturbações a homeostase do RE causam sobrecarga de proteínas desdobradas ou mal dobradas no lúmen do RE, uma condição denominada estresse do RE, desencadeando a UPR. A UPR pode ser induzida por agentes químicos farmacológicos como tunicamicina, tapsigargina, homocisteína, agentes redutor-oxidantes, bem como agentes antiinflamatórios não esteróides, que impõem o estresse sobre o RE por causarem vigorosa síntese de proteínas, desequilíbrio do potencial redox e de  $\text{Ca}^+$ , e a inibição de modificações nas proteínas ou transporte para o complexo de Golgi. Em células de mamíferos, estresse do RE também ocorre em muitas circunstâncias, tais como carência nutritiva, processos de desenvolvimento, mutação genética, bem como insultos patogênicos. O exemplo mais conhecido de estresse do RE decorrentes de mutação genética são doenças causadas por mal dobramento protéico em humanos. Relatos recentes têm indicado em plantas, uma estreita ligação entre o UPR e estímulos ambientais, tais como calor, o sal, e estresse, bem como ataque viral, embora os mecanismos subjacentes sejam em grande parte ainda desconhecidos. O objetivo da indução UPR é de restaurar as funções do RE e aliviar o estresse exercido sobre o RE. Além disso, o UPR também elimina proteínas mal formadas citotóxicas, que são deslocadas pela membrana RE para sofrerem ubiquitinação (Ub) e degradação mediada pelo proteassoma através de uma via conhecida como ERAD. No entanto, se a homeostase ou função do RE não puder ser re-estabelecida, será ativado pela UPR uma via de morte celular programada, supostamente para proteger o organismo de células que exibem proteínas mal dobradas, fato ainda não confirmado em plantas. **Fonte:** Adaptado ZHANG & WANG, 2012

Nas células eucarióticas, essa condição é detectada por diferentes sensores residentes na membrana do RE, os quais desencadeiam uma via de transdução de sinal que induzem a expressão de chaperonas e foldases, componentes do sistema de degradação associado ao RE (ERAD), além de aumentar a síntese de fosfolípidios, causando um aumento do volume da organela de forma a contribuir para a recuperação da homeostase. A ativação coordenada dos sensores constitui uma resposta específica ao estresse do RE, a qual foi denominada de resposta a proteínas mal formadas ou UPR (do inglês *Unfolded Protein Response*) (**Figura 2**) (NELSON & COX, 2005; XU *et al.* 2005; HUSSAIN & RAMAIAH, 2007; RUTKOWSKI & KAUFMAN, 2004).



**Figura 2: Mecanismo de ação dos três principais braços da via UPR.** Acúmulo de proteína mal dobradas dentro do lumen desencadeia UPR. Existem, pelo menos, três principais sensores de estresse na membrana do RE: IRE1, PERK e ATF6. Em células com estresse do RE, IRE1 é autofosforilada, levando a ativação de seu domínio endorribonuclease. Esta atividade medeia o processamento do mRNA codificador para XBP1, que é um fator de transcrição que regula positivamente a expressão de muitos genes essenciais da UPR envolvidos no dobramento e controle de qualidade de proteínas, além de regular a biogênese do RE/Golgi. IRE1 ativo se liga a proteína adaptadora TRAF2, desencadeando ativação de JNK, que pode participar do regulamento de autofagia e apoptose. Em alternativa, PERK ativo, fosforila o fator iniciador eIF2 $\alpha$  e inibe a tradução, diminuindo a síntese de proteínas e a sobrecarga de proteínas mal dobradas no RE. Além disso, este evento permite a tradução específica de ATF4, um fator de transcrição que induz a expressão de genes envolvidos no metabolismo de aminoácidos, resposta antioxidante e reguladores da apoptose incluindo CHOP. Uma terceira via da UPR é mediada pelo ATF6, uma proteína transmembrana do RE tipo II codificada por um fator transcricional com zíper de leucina. Após indução de estresse do RE, ATF6 é processado, aumentando a expressão de algumas chaperonas do RE e genes relacionados ao ERAD. Na parte inferior, são indicadas as funções celulares abrangidas por cada ramo de sinalização da via UPR. **Fonte:** adaptado de HETZ & GLIMCHER, 2009

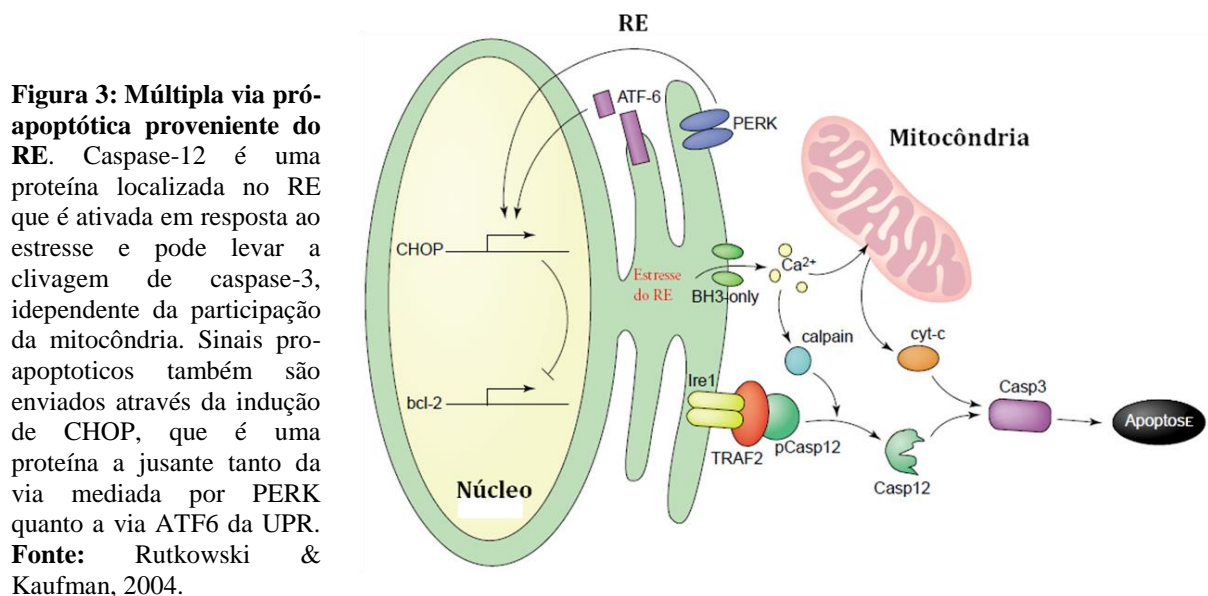
A UPR pode ser encontrada desde organismos bem simples como as leveduras, até organismos muito complexos como os mamíferos (MORI, 2009). Todos os eucariotos compartilham mecanismos similares para lidarem com o estresse do RE, tais como o aumento da expressão de chaperonas responsáveis pelo redobramento de proteínas e proteases destinadas a degradar proteínas irreversivelmente desenoveladas. De qualquer forma, diferentes aspectos são elaborados ou conservados dentre os diferentes organismos. Por exemplo, em leveduras, o aumento dos níveis de proteínas desenoveladas leva a ativação de um sensor que resulta na produção de um fator de transcrição, ativando a expressão de

chaperonas. Todos os metazoários possuem ainda um mecanismo adicional para lidar com o estresse no retículo endoplasmático: a atenuação da tradução através da inibição da formação de um complexo entre as duas subunidades ribossomais (BERNALES, PAPA, WAGNER, 2006). De forma bastante similar, as células de mamíferos podem aumentar os níveis de chaperonas através de fatores de transcrição produzidos como resultado da ativação de uma proteína homóloga à encontrada na via UPR de leveduras, a primeira a ser caracterizada.

Do ponto de vista evolutivo, simultaneamente ao aumento da complexidade dos organismos houve também um incremento na via UPR, que passou a contar com um maior número de moléculas e a influenciar um maior número de mecanismos celulares. Inicialmente o restabelecimento da homeostase celular foi vinculado ao controle transcricional de genes e posteriormente a via UPR passou a contar também com alternativas de controle traducional, sendo que em mamíferos estas duas vias de controle são bastante estabelecidas e estudadas (MORI, 2009)

Um paradoxo da via UPR é que ela leva a uma resposta com ativação simultânea de vias de sobrevivência e pró-apoptóticas da célula (**Figura 3**) (WOEHLBIER & HETZ, 2011). A primeira descoberta e mais bem caracterizada das vias pró-apoptóticas é a produção do fator de transcrição *CCAAT-Enhancer-Binding Protein Homologous Protein* (CHOP) também conhecido como *Growth Arrest and DNA Damage Inducible Gene 153* (GADD153), *DNA-damage-inducible transcript 3* (DDIT3) e *C/EBP $\zeta$*  que é regulada por todos os braços da via UPR (OYADOMARI & MORI, 2004; HUSSAIN & RAMAIAH, 2007; XU et al. 2005). O mecanismo pelo qual CHOP leva à morte celular ainda não está bem esclarecido, no entanto, foi demonstrado que CHOP leva a repressão da transcrição de proteínas supressoras de apoptose da família Bcl-2 (*B Cell Lymphoma 2*) e regula positivamente a síntese de membros da família de receptores TNF (do inglês, *Tumor Necrosis Factor*) que contenham o domínio de morte (XU et al. 2005; NISHITOH, 2012). A produção da proteína CHOP “flutua” ao longo do tempo, sendo robustamente induzida na fase inicial após a exposição das células aos fármacos, seguido de um declínio nos níveis de CHOP enquanto persiste a regulação positiva de chaperonas. Em contrapartida à atividade pró-apoptótica, foi sugerido que CHOP ativa a transcrição de GADD34, que interage com proteína fosfatase I para catalisar desfosforilação eIF2 $\alpha$  restabelecendo a síntese de proteínas e a homeostase celular (HOSOI & OSAWA, 2010; RUTKOWSKI et al., 2006).

A adaptação celular ao estresse é resultado da estável regulação positiva da proteína de 78kDa regulada por glicose, GRP78, uma chaperona molecular residente no lúmen do RE que também é conhecida como *Binding Protein* (BiP) ou *heat shock 70 kDa protein 5* (HSPA5), bem como outras proteínas que estão envolvidas em aliviar o estresse de dobramento de proteínas no RE, incluindo GRP94, ERp57, calreticulina, calnexina PDI (do inglês, *protein disulfide isomerase*) e p58<sup>IPK</sup>. Contudo, estudos feitos por Rutkowski e colaboradores (2006) sugerem que de forma geral, o fator determinante para a adaptação das células é a composição de proteínas, não havendo grande influência da expressão genômica. Além disso, sugerem que as proteínas ATF4, CHOP e GADD34 formam uma rede integrada capaz de converter um gradiente linear de estresse em um sinal binário de vida ou morte (RUTKOWSKI *et al.* 2006; NISHITOH, 2012; TAKAYANAGI *et al.* 2013). Outros eventos pró-apoptóticos são iniciados pela via UPR, incluindo a fosforilação de *c-Jun N-terminal Kinase* (JNK), clivagem de caspases (*cysteine-dependent aspartate-specific proteases*) específicas do RE, ativação de p53 e perda da homeostase de cálcio celular (**Figura 3**) (XU *et al.* 2005; HUSSAIN & RAMAIAH, 2007; HE, 2006; TABAS & RON, 2011).



A UPR também pode ativar a via do fator de transcrição NF- $\kappa$ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), através da supressão da transcrição de I $\kappa$ B (*inhibitor of kappa B*) por mecanismos que envolvem a PERK (do inglês, *PKR-like Endoplasmic Reticulum Kinase*), resultando na regulação de mediadores inflamatórios, como interleucina-6 e TNF- $\alpha$  (DENG *et al.*, 2004).

## 1.2 – Sensores do Estresse do Retículo Endoplasmático

Quando a capacidade do RE é sobrecarregada, a via UPR é ativada. Esta ativação pode ser resultado de diferentes condições fisiológicas como diferenciação e desenvolvimento de células especializadas com alta taxa de secreção de proteínas como as células pancreáticas e os linfócitos B, condições metabólicas alteradas, mutação em genes codificantes para proteínas da via endo/exocítica, bem como infecção por determinados patógenos. Além disso, algumas intervenções experimentais sabidamente induzem a via UPR, tais como inibição da N-glicosilação no retículo endoplasmático, depleção dos estoques intracelulares de cálcio, estresse redutor, inibição do proteassoma ou ainda expressão de proteínas mutantes que saturam a capacidade de dobramento do retículo endoplasmático (**Figura 1**) (WALTER & RON, 2011).

Existem três proteínas residentes no retículo endoplasmático que são responsáveis por “policar” o estresse do RE e são os principais sinalizadores da via UPR: a Proteína Cinase dependente de Inositol (*Inositol-requiring Transmembrane Kinase and Endonuclease*, ou IRE1), a Proteína Cinase Residente no RE semelhante à PKR (PERK) e o Fator de Transcrição com zíper de leucina ATF6 (*Activating Transcription Factor 6*) (**Figura 2**) (MARCINIAK & RON, 2006).

Essas moléculas são mantidas inativadas pela ligação da principal e mais abundante chaperona do RE, BiP/GRP78 no domínio luminal desses sensores (SHEN et al., 2005; LI et al., 2008).

### 1.2.1 – Proteína Cinase Dependente de Inositol - IRE1

IRE1 ou, ERN1 (do inglês, *Endoplasmic Reticulum to Nucleus signaling 1*), é uma glicoproteína transmembrana do tipo I, ubiquamente expressa, com um domínio voltado para o lúmen do RE sensível à polipeptídeos mal-formados através de reconhecimento dos mesmos. Possui uma parte voltada para o citoplasma com um domínio cinase e um domínio com homologia a ribonuclease (RNase) L. Em condições normais, IRE1 está associada ao BiP que a mantém em um estado inativo, quando proteínas mal-formadas acumulam no RE, elas podem sequestrar a chaperona BiP/GRP78 ou se ligar diretamente a monômeros de IRE1 (GARDNER & WALTER, 2011; HETZ & GLIMCHER, 2009) resultando na oligomerização e *trans*-autofosforilação dos domínios cinase justapostos, isso, promove uma mudança

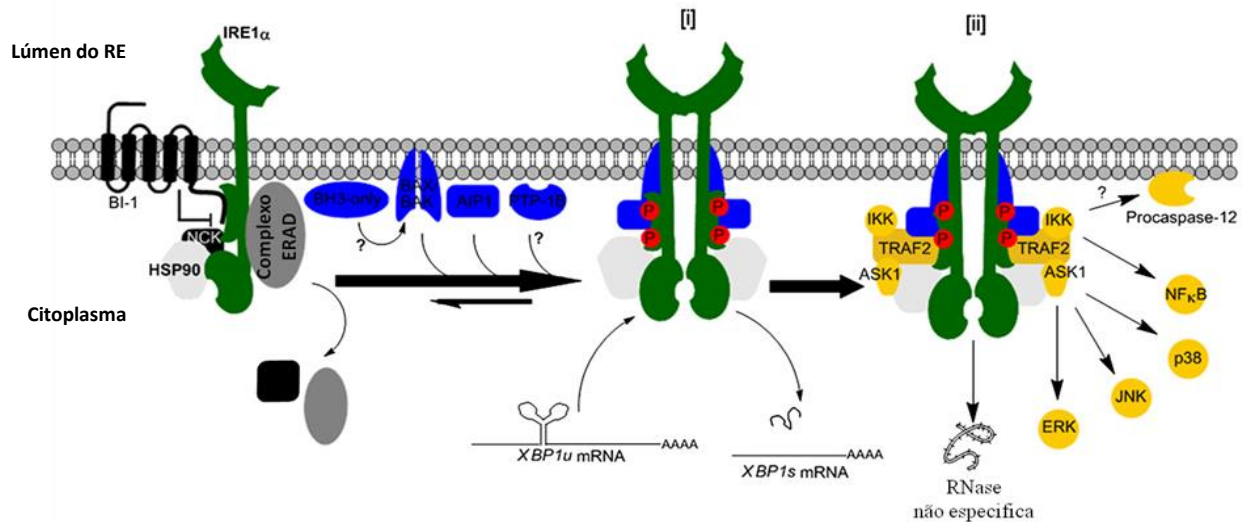
conformacional que ativa alostericamente a atividade endonucleásica no lúmen da cisterna reticular (RON & WALTER, 2007; KORENNYKH *et al.* 2011).

A ativação do domínio endonucleásico, inicia o processamento pós-transcricional do mRNA do fator de transcrição Hac1 (homólogo a ATF/CREB1) em leveduras (COX & WALTER, 1996; MORI *et al.*, 1996) ou XBP-1 (*X-box binding protein 1*) em metazoários (YOSHIDA *et al.*, 2001; CALFON *et al.*, 2002). O mRNA precursor de Hac1 ou XBP1 é clivado duas vezes pela IRE1 ativada e um intron de 26 nucleotídeos é excisado (HETZ *et al.*, 2011). Os fragmentos 5' e 3' de mRNA são re-ligados produzindo um mRNA que codifica para um fator de transcrição da família b-ZIP (zíper de leucina e a região básica da proteína que é responsável pela ligação no DNA) de 41 kDa mais estável e potente, capaz de induzir a expressão de chaperonas, enzimas modificadoras (principalmente enzimas envolvidas na degradação associada ao RE – ERAD) e remodelamento de membrana (YOSHIDA *et al.*, 2001; CALFON *et al.*, 2002; LEE *et al.*, 2003). A função nucleásica da IRE1 também está envolvida na degradação de mRNA associados a membrana, processo denominado de Decaimento regulador dependente de IRE1 (*Regulated IRE1 dependent decay*, RIDD) (**Figura 4**). Essa resposta complementa outros componentes da UPR em reduzir a tradução global (SCHEUNER & KAUFMAN, 2008). Em adição, o domínio cinase da IRE1 pode se ligar a proteína adaptadora TRAF2 (*tumor necrosis factor receptor-associated factor 2*) levando a ativação de ASK1 (*apoptosis signal-regulating kinase 1*) e da via de *cJun-N terminal kinase* (JNK) (RON & WALTER, 2007; HUSSAIN & RAMAIAH, 2007, LIN *et al.*, 2007; SCHRÖDER & KAUFMAN, 2006; XU *et al.*, 2005). A cinase JNK fosforila alguns membros da família de proteínas supressoras de apoptose *Bcl-2* e induzem apoptose dependente de BAX (*Bcl-2 associated x protein*) (LEI & DAVIS, 2003)

Hetz e colaboradores (2006) demonstraram a capacidade de BAX e outra proteína pró-apoptótica da família *Bcl-2*, BAK (do inglês, *Bcl-2 homologous antagonist/killer*), em se ligar diretamente a IRE1 (RODRIGUEZ *et al.*, 2012). Essas proteínas foram descritas anteriormente durante apoptose derivada da mitocôndria. No entanto, recentemente foi demonstrado que BAX é translocada não só para a mitocôndria, mas também para a membrana do RE durante o estresse prolongado do RE. Uma vez translocada, BAX permeabiliza a membrana e causa a translocação de proteínas do lúmen do RE para o citossol (WANG *et al.*, 2011). Nesse contexto, BiP, uma proteína do lúmen do RE com funções anti-apoptóticas, quando presente no citossol, é translocada para a membrana plasmática onde se



torna um receptor indutor de apoptose por PAR-4 (*Prostate Apoptosis Response-4*) (WANG et al., 2011) que é capaz de ativar a via extrínseca da cascata através de FADD, caspase-8 e caspase-3 (BURIKHANOV et al., 2009).



**Figura 4: Sinalização via IRE1.** A sinalização por IRE1 $\alpha$  em mamíferos é iniciada pela formação de uma plataforma complexa de proteínas na membrana do RE, denominada por Hetz & Glimcher (2009) como o UPRosome, onde múltiplos fatores se agrupam e modulam sua atividade. Por exemplo, ativação de IRE1 $\alpha$  exige a ligação de proteínas acessórias, tais como BAX, BAK, AIP1, e talvez proteínas BH3-only como PUMA e BIM (a jusante de BAX/BAK) além da atividade do *ER-located* phosphatase PTP-1B. Sob estresse crônico ou prolongado do RE, a sinalização por IRE1 $\alpha$  é regulada negativamente e a proteína BI-1 localizada no RE é envolvida na inativação de IRE1 $\alpha$ , ao passo que a ligação de HSP90 diminui sua renovação. Além do mais, IRE1 $\alpha$  quando ativa, inicia uma variedade de sinalizações através da ligação de TRAF2 e talvez outras proteínas adaptadoras. Esses eventos desencadeiam a ativação de cinases ASK1/JNK, ERK, e p38, que podem regular apoptose e autofagia. IRE1 $\alpha$  sequestra IKK e induz a sinalização via NF- $\kappa$ B. Em adição, uma atividade não específica da RNase foi descrita para IRE1 $\alpha$  em moscas. IRE1 $\alpha$  em sua forma inativa interage com componentes da maquinaria ERAD podendo regular esse processo e, também moduladores da ERK como NCK. Para simplificar, a figura separa os componentes que controlam ativação/inativação de IRE1 $\alpha$  em relação ao processamento do mRNA de XBP1 (I), e os componentes relacionados a regulação de outros braços de sinalização (II), e esta separação gráfica dos complexos não reflete uma dissociação temporal entre I e II. As proteínas que ligam a IRE1 $\alpha$  inativa são mostradas em escala de cores cinza, as que regula sua ativação e o processamento do mRNA de XBP em azul e as que controlam outros vias de sinalização, em amarelo. **Fonte:** adaptado de HETZ & GLIMCHER, 2009

### 1.2.2 – Proteína Cinase Residente no Reticulo Endoplasmático semelhante à PKR – PERK

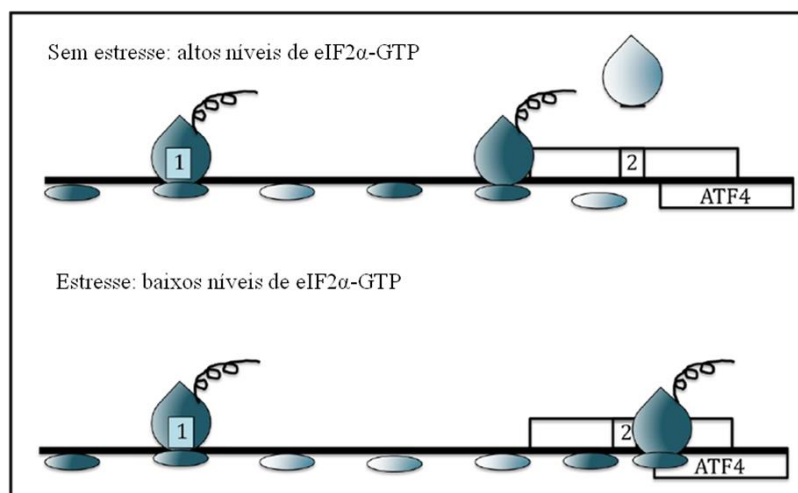
PERK também conhecida como eIF2AK3, compartilha com IRE1 várias características na sua estrutura e ativação, no entanto, falta-lhe o domínio com atividade endorribonuclease (HARDING *et al.*, 1999). Semelhante a sinalização por IRE-1, a dissociação de BiP ligada a PERK permite PERK oligomerizar e ser ativada por autofosforilação (**Figura 2**). O dímero de PERK ativada é capaz de reconhecer e fosforilar a subunidade alfa do fator de iniciação da tradução em eucariotos (eIF2 $\alpha$ ) no resíduo de serina 51, que inibe a troca do nucleotídeo GDP por GTP feita pelo complexo pentamérico eIF2B e consequentemente atenua a tradução de mRNAs. eIF2 é uma proteína G heterotrimérica (PER'ERY & MATHEW, 2007), se liga ao GTP e ao RNA transportador (tRNA) “carregando” um aminoácido de metionina (Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup>) para a formação do complexo ternário (eIF2-GTP-Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup>). O complexo ternário interage com a subunidade menor do ribossoma (40S) e seus fatores protéicos associados (eIF1A e eIF3) para a formação do complexo de pré iniciação (43S) necessário para o início da síntese do polipeptídeo. O complexo de pré iniciação se liga ao mRNA ativado que está associado a fatores protéicos (proteína de ligação à cauda poli-A – PABP, eIF4G e o complexo eIF4F). No passo seguinte, esse complexo escaneia o mRNA na direção 5' para a 3' até reconhecer o códon de iniciação (AUG) resultando na liberação do eIF1 permitindo a hidrólise do GTP ligado ao eIF2, liberando fosfato inorgânico, o que diminui a afinidade do eIF2 pelo Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup>. Após esse evento a subunidade maior do ribossoma (60S) se junta, para formar o complexo de iniciação (80S). Em consequência os fatores protéicos (eIF2, eIF3, eIF5) são liberados, sendo o eIF2 liberado na forma de eIF2-GDP (guanosina difosfato). Para reciclar o eIF2 liberado e para que o mesmo participe novamente do início da tradução é necessário que GDP seja substituído por um nucleotídeo GTP, o que exige a participação de outro fator de iniciação da tradução, o eIF2B, que também é um fator de troca de nucleotídeo de guanina. Fosforilação da subunidade  $\alpha$  do eIF2 no resíduo de serina 51 leva a uma associação forte entre o fator eIF2B e o eIF2 $\alpha$ -P, que impede a troca dos nucleotídeos GDP por GTP catalisada pelo eIF2B (JACKSON *et al.*, 2010).

Devido a quantidade limitada de eIF2B, a fosforilação de uma fração do *pool* de eIF2 presente nas células, pode ter um efeito relativamente grande na tradução, sequestrando o

eIF2B, o que dificulta a troca de nucleotídeos e leva inibição da tradução (PER'ERY & MATHEW, 2007)

A fosforilação de eIF2 $\alpha$  regula positivamente a tradução do fator de transcrição 4 (ATF-4), que por sua vez induz a transcrição de CHOP, GADD34, ATF-3 e genes envolvidos no transporte de aminoácidos, biossíntese de glutatona e resistência ao estresse oxidativo. (HUSSAIN & RAMAIAH, 2007; LEE *et al.*, 2010)

Na ausência de estresse do RE, a maioria dos ribossomos estão comprometidos na tradução de múltiplas janelas abertas de leitura a montante do códon de iniciação (uORFs) do ATF-4 na porção 5' do mRNA e, não chegam a ORF do ATF-4. Após o estresse do RE, grandes quantidades de eIF2 $\alpha$  é fosforilada e permitem que os ribossomos "deslizem" através das uORFs, aumentando a probabilidade atingirem a ORF do ATF-4, levando a sua tradução (**Figura 5**) (RASHEVA & DOMINGOS, 2009).



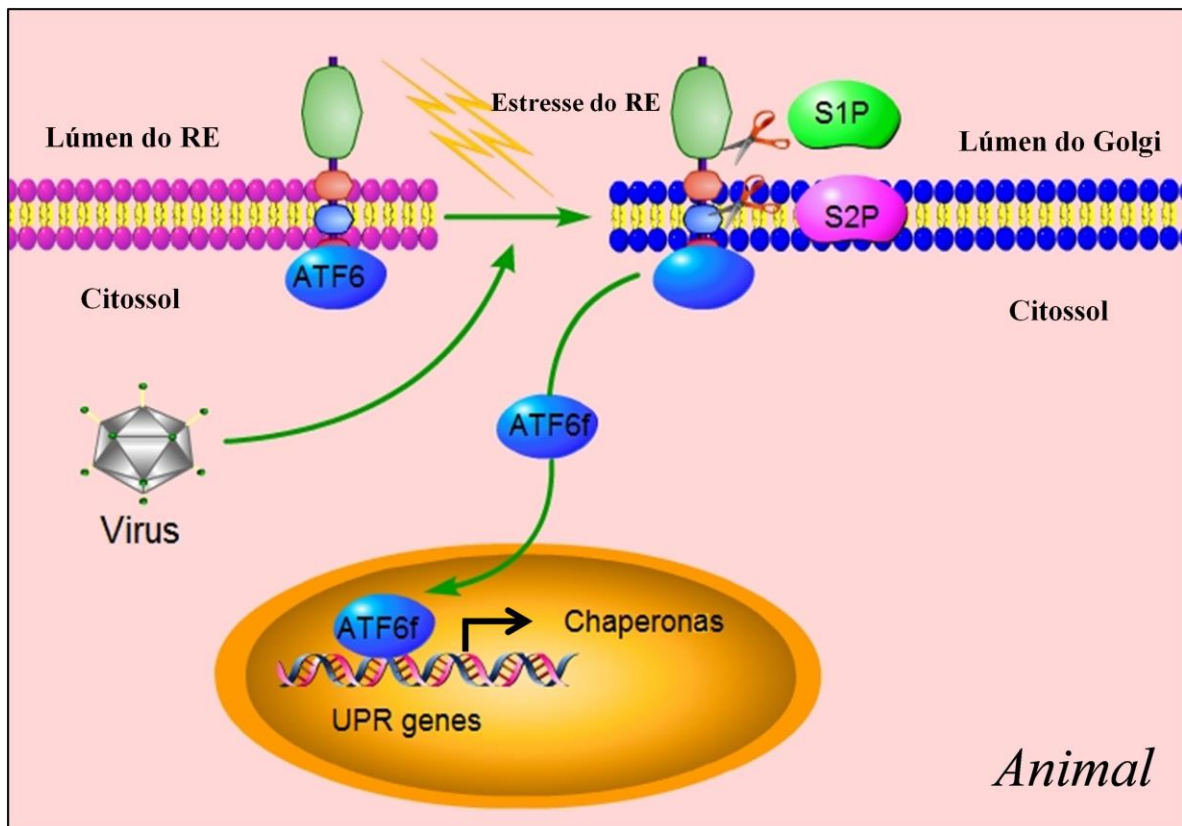
**Figura 5: Modelo de controle traducional pela sequência líder do ATF4.** O mRNA de ATF4 é ilustrado como uma linha reta com duas janelas abertas de leituras a montante (uORFs) 1 e 2 na sequência líder 5', representado por retângulos. O sombreamento da pequena subunidade ribossomal indica a associação do eIF2-GTP com Met-tRNA<sup>Met</sup>. A uORF1 próxima a 5' é um elemento positivo que facilita o escaneamento feito pelo ribossomo e reiniciação a jusante na região codificadora no mRNA de ATF4. Quando eIF2-GTP é abundante em células não estressadas, ribossomos escaneiam a jusante da uORF1 e reiniciam na próxima região codificadora, a uORF2, um elemento inibitório que bloqueia a expressão de ATF4. Em condições de estresse, a fosforilação do eIF2 que é acompanhada da redução dos níveis de eIF2-GTP aumentando o tempo necessário do escaneamento feito pelo ribossomo para tornar-se competente para reiniciar a tradução. Este atraso permite a que os ribossomos escaneiem através da uORF2 inibitória e em vez disso reinicie na região codificadora de ATF4. FONTE: Adaptado de YOUSEFI, I. 2011.

Ativação de PERK ocorre de forma reversível, permitindo a recuperação da tradução de mRNAs após o estresse do RE, que em caso contrario, poderiam causar danos permanentes à célula. Durante estágios tardios da via UPR, a proteína HSP40 p58<sup>IPK</sup> co-chaperona é

regulada positivamente pelo fator de transcrição ATF6, a fim de inibir atividade da cinase PERK, isso ocorre pela ligação da co-chaperona p58<sup>IPK</sup> no domínio cinase da enzima PERK.

### 1.2.3 – Fator de Transcrição 6 – ATF-6

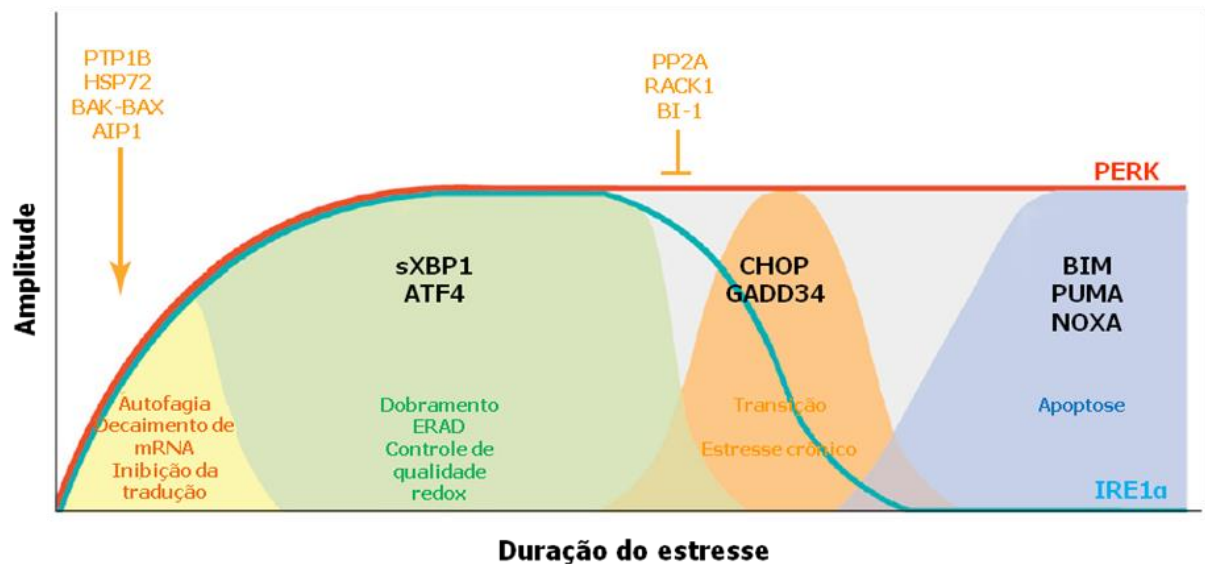
O ATF-6 é uma proteína transmembrana tipo II no RE com seu domínio amino-terminal que contém um motivo transcricional bZIP, voltado para o citoplasma. Diferente da PERK e IRE-1a o ATF-6 possui na porção carboxi-terminal que esta voltada para o lúmen do ER, sinais de localização do aparato Golgi que são mascarados por BiP/GRP78. Em resposta ao estresse ER, a liberação de BiP/GRP78 facilita a translocação do ATF-6 para o Golgi onde é clivado pelas proteases sítio 1 (S1P) e sítio 2 (S2P) para produzir um domínio amino-terminal ativo de 50 kDa (N-ATF6/p50ATF6) que é translocado para o núcleo onde induz a síntese de chaperonas, enzimas modificadoras e CHOP (**Figura 6**) (HUSSAIN & RAMAIAH, 2007; SHEN *et al.*, 2005).



**Figura 6: Via de sinalização ATF6.** Em células não estressadas, ATF6 reside na membrana do RE. É translocado para o Golgi durante o estresse do RE por um mecanismo que envolve Trombospondinas. No aparato de golgi essa proteína é submetida a clivagens por proteases (S1P e S2P) presentes na organela para liberar um porção efetora da proteína (ATF6f) no citossol. Depois entra no núcleo o induz a expressão de uma serie de genes alvos da via UPR. Alguns vírus animais são capazes de ativar seletivamente a via do ATF6 para a sua replicação. FONTE: modificado de ZHANG & WANG, 2012.

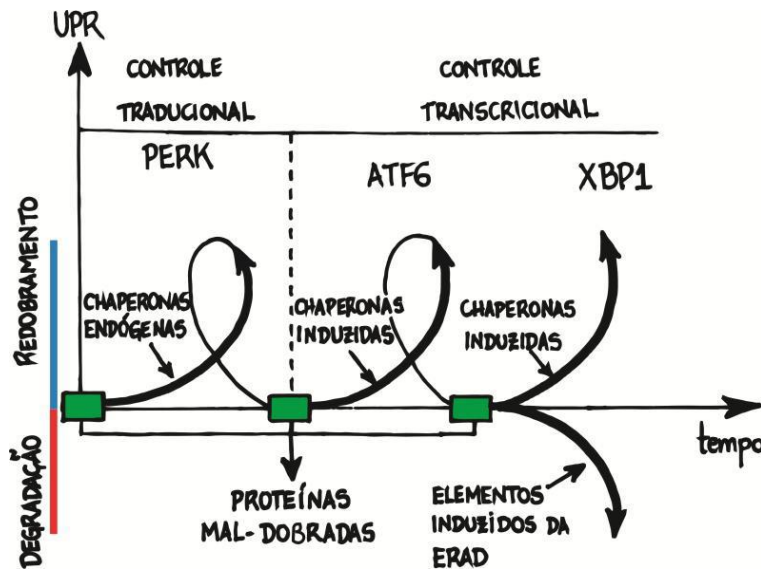
### 1.3 – Cinética da Ativação dos sensores da UPR

Ativação dos sensores UPR, teoricamente dispara quatro ondas de respostas ao longo do tempo para restaurar a homeostase no RE e, em seguida, altera programas adaptativos para a indução de apoptose a fim de eliminar células irreversivelmente danificadas (**Figura 7**): (i) uma resposta imediata para diminuir a carga de proteínas na RE; (ii) uma resposta transcricional controlando o aumento da expressão de genes alvos da UPR relacionados ao dobramento e controle de qualidade; (iii) uma fase de transição; e (iv) uma fase final que aumenta a expressão de genes pró-apoptóticos específicos.



**Figura 7: Cinética da sinalização UPR e decisões de destino celular.** Durante o curso do estresse do RE, ocorre uma dinâmica modulação da sinalização de IRE1. Vários reguladores associam-se ao IRE1 para regular a sua atividade em termos de cinética, amplitude e especificidade dos tecidos. A interação com PTP1B, AIP1, HSP72, BAX e BAK, aumentam a amplitude da sinalização por IRE1 $\alpha$ . Após estresse prolongado, IRE1 retorna a um estado latente, um processo modulado pela interação com BI-1 e, possivelmente com a fosfatase alcalina PP2A em complexo com RACK1. Fonte: adaptado de WOHLBIER & HETZ, 2011.

A via UPR é um mecanismo tempo-dependente e os componentes da mesma são ativados de maneira sequencial diante das condições fisiológicas de estresse no retículo endoplasmático (**Figura 8**).



**Figura 8: Sequência temporal da ativação da via UPR.** Inicialmente a via UPR atua no controle traducional através de PERK inibindo a síntese de novas proteínas e posteriormente, não sendo este mecanismo capaz de restabelecer a homeostase celular, desencadeia-se uma fase de controle transcricional mediado por ATF6/IRE1, que tem como principal função promover a indução da expressão de XBP-1. Não sendo estes mecanismos suficientes no restabelecimento da homeostase celular, ativa-se um processo de degradação de proteínas desenoveladas através de proteassomos, denominada via ERAD. FONTE: BORSA, M. 2012.

#### 1.4 – Via UPR e Infecções Virais

No curso de uma infecção produtiva os vírus induzem as células hospedeiras a produzir grandes quantidades de proteínas virais, e diferente de eucariotos e procariotos, os vírus não possuem chaperonas como as proteínas do choque térmico (HSPs) e contam somente com as HSPs do hospedeiro para o dobramento das proteínas virais. Além disso, muitas proteínas virais sofrem glicosilação e outras modificações no RE, causando estresse ao ER e consequente ativação da UPR. Algumas consequências da UPR tais como expressão de chaperonas e regulação do metabolismo podem ser úteis à replicação viral. No entanto, a atenuação de síntese de proteína e apoptose não é condizente com a máxima replicação viral. Por isso muitos vírus desenvolveram mecanismos diferentes de ativar seletivamente parte da UPR para aliviar o estresse do RE (HOOPER, HIGHTOWER, HOOPER, 2012).

Vários estudos utilizando como modelo de infecção por diferentes vírus de mamíferos incluindo membros das famílias *Arenaviridae*, *Asfaviridae*, *Bunyaviridae*, *Caliciviridae*,

*Coronaviridae*, *Flaviviridae*, *Herpesviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Picornaviridae*, *Reoviridae*, *Retroviridae*, *Togaviridae*, etc; demonstraram alguma modulação da UPR. Todos são capazes de interferir com a sinalização de ao menos um dos braços da via UPR (PASQUAL, G. *et al.* 2011; GALINDO, I. *et al.* 2012; VERSTEEG, G. A. *et al.* 2007; PEÑA & HARRIS, 2011; BURNETT, H. F. *et al.* 2012; ZAMBRANO, J. L. *et al.*, 2012; BORSA, M. 2012; BARRY, G. *et al.*, 2012). No entanto, como os sensores da UPR reconhecem a infecção viral para ativar a via ainda não está completamente esclarecido. Um estudo conduzido por Sung e colaboradores (2009) usando o coronavírus SARS, identificou um proteína acessória do SARS-CoV (proteína 8ab) capaz de ligar diretamente ao domínio luminal de ATF6. A expressão ectópica da proteína 8ab em células de mamíferos induz a proteólise de ATF6 e translocação do RE para o núcleo (SUNG *et al.*, 2009). Esse achado sugere que talvez os vírus explorem suas próprias proteínas para modular diretamente a via UPR.

Dentre os *herpesviridae*, umas das famílias virais mais estudadas nesse contexto, foram identificadas várias proteínas capazes de interferir com a via UPR. Vírus como Epstein-Barr (EBV), infectam linfócitos B, células secretoras profissionais que precisam de um bom funcionamento do RE e dependem fortemente da via UPR. Uma estratégia usada para garantir a replicação viral é ativar a via UPR de maneira dose dependente da síntese de uma proteína viral, a proteína latente de membrana 1 (LMP-1) que mimetiza o receptor CD40, induz a expressão de NF- $\kappa$ B e culmina na ativação de IRE1, PERK e ATF6 (LEE & SUGDEN, 2008). Citomegalovírus (CMV), outro membro da família *herpesviridae*, possui uma estratégia totalmente diferente da utilizada pelos EBV, os CMVs possuem proteínas virais capazes de interagir com IRE1 e regular negativamente sua atividade, sendo que a expressão de uma dessas proteínas (M50) é capaz de induzir uma redução nos níveis de expressão desse sensor (STAHL *et al.*, 2013). Diminuindo a expressão de IRE1 os CMVs podem evitar respostas celulares que provavelmente são prejudiciais para replicação desses vírus.

Os membros da família *Flaviviridae*, como o Dengue vírus, também utilizam diferentes estratégias para modular a UPR. Os dengue vírus (DENV) ativam de maneira espécie específica diferentes membros da via UPR e, no caso específico dos DENV-2, a ativação dos sensores da via é sequencial e ocorre em sincronia com o estágio da infecção viral permitindo que a célula hospedeira se adapte ao estresse causado pela infecção e prevenindo a ativação de eventos pró-apoptóticos (PEÑA & HARRIS, 2011).

Além do trabalho feito por Galindo e colaboradores (2012) para avaliar a relação da UPR com a infecção pelo vírus da peste suína Africana (ASFV), pouco ou nenhum esforço foi feito para investigar esta relação entre outras famílias de vírus de DNA fita dupla que replicam no citoplasma. Em seu trabalho eles demonstraram uma ativação da via UPR, em específico o sensor ATF6 e caspase-12, aumento na expressão de chaperonas do RE como calreticulina, calnexina, PDI, mas não de BiP e ERp57. Além disso, observaram um aumento na expressão de GADD34, que pode explicar o fato de não haver atenuação da tradução protéica nem acúmulo de CHOP, também foi observada uma diminuição de uXBP-1 sendo sua forma processada não detectada (GALINDO et al., 2012). A modulação da UPR e indução da apoptose deve ser vantajoso para esses vírus, uma vez que esses processos bloqueiam os efeitos prejudiciais a infecção enquanto mantêm os benéficos. Supõe-se que os membros da família *Poxviridae* também sejam capazes de modular a via UPR uma vez que esses possuem proteínas inibidoras de da proteína cinase R (PKR) e possivelmente PERK, no entanto, essa capacidade nunca foi testada. Jindal & Young (1992) mostraram que a durante a infecção pelo vírus Vaccínia, as proteínas da família Hsp70 tem papel crucial no dobramento das proteínas virais e altos níveis de expressão de proteínas Hsp70 são detectados, mas não de membros da família Hsp90 e Hsp60.

## 1.5 – Família Poxviridae

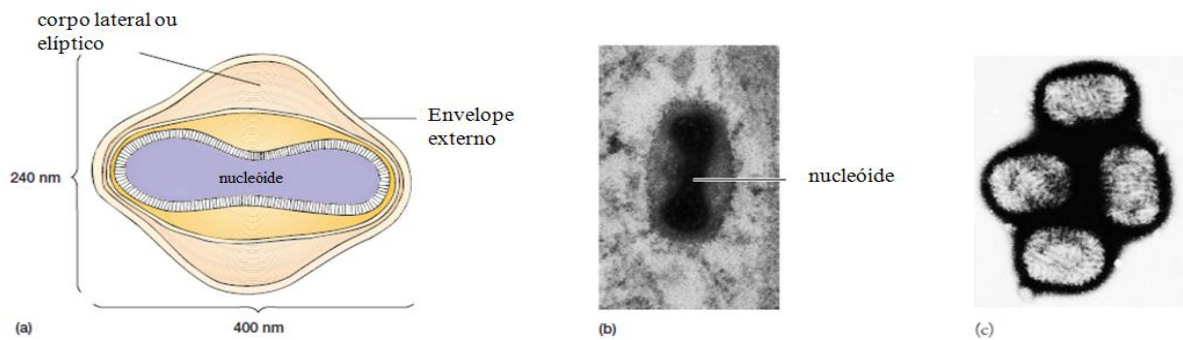
A família *Poxviridae* é constituída por duas subfamílias e treze gêneros de complexos vírus de DNA que infectam células de vertebrados e invertebrados. A subfamília *Chordopoxvirinae*, que consiste em dez gêneros: *Avipoxvirus*, *Capripoxvirus*, *Cervidpoxvirus*, *Crocodylidpoxvirus*, *Leporipoxvirus*, *Molluscipoxvirus*, *Orthopoxvirus*, *Parapoxvirus*, *Suinopoxvirus* e *Yatapoxvirus* (ICTV, 2013) e a subfamília *Entomopoxvirinae* que é dividida em três gêneros baseados no inseto hospedeiro em que foram isolados: *Alphaentomopoxvirus*, *Betaentomopoxvirus* e *Gammaentomopoxvirus*. No entanto, análises completas das sequências sugerem mudanças na classificação de alguns indivíduos do gênero *Betaentomopoxvirus*, colocando-os em gêneros separados (MOSS, 2007; DAMON, 2007).

Dentro do gênero *Orthopoxvirus* encontram-se os vírus Varíola (VARV), *Vaccinia* (VACV) e *Cowpox*. O VARV é o agente etiológico da varíola, doença que flagelou a população humana até a sua “erradicação” no final da década de 70, quando foram feitas



grandes campanhas mundiais de vacinação organizadas pela OMS (Organização Mundial de Saúde). O VACV é o agente etiológico da vaccínia bovina e foi o principal vírus utilizado na campanha de vacinação contra o VARV (LEFKOWITZ *et al.*, 2006; WEYER, 2009) O último caso de ocorrência natural de varíola foi reportado no ano de 1977, tendo dois outros casos ligados a laboratório em 1978 (DAMON, 2007). Já no caso dos VACV, surtos zoonóticos da doença causada por esses vírus foram relatados no Brasil (ABRAHÃO, J. S. *et al.*, 2009; TRINDADE *et al.*, 2009) e um modelo hipotético para o ciclo de transmissão desses vírus foi proposto baseado no fato desses estarem circulando entre animais silvestres, peridomesticos e animais domesticados em diversos estados do país (DA FONSECA, F. G. *et al.*, 2011)

Os vírus Vaccínia (VACV), assim como todos os outros poxvírus, são vírus grandes e complexos, que infectam animais (cerca de 400 x 240 x 200 nm) (PRESCOTT *et al.*, 2002; SMITH, 2007). São vírus cujo genoma é constituído por DNA de fita dupla, linear, cujo tamanho varia de 130.000 pb até mais de 300.000 pb, e que apresentam alças terminais e repetições invertidas (MOSS, 2007). O DNA está associado com proteínas e contido no cerne, uma estrutura central formada como um disco bicôncavo e cercado por uma membrana. Dois corpos elípticos ou laterais ficam entre o cerne e a membrana externa, que é composto por uma membrana coberta por uma série de túbulos (**Figura 9**) (PRESCOTT *et al.*, 2002 MURPHY, 1999). Os principais componentes dos poxvírus são proteínas, lipídeos e DNA sendo que cada um deles contribui com, respectivamente, 90%, 5% e 3,2% do peso seco. Os componentes lipídicos do VACV são predominantemente colesterol e fosfolipídeos, sendo o carboidrato um componente encontrado nos vírus extracelulares envelopados (EEVs) como parte das glicoproteínas. Também podem ser encontrados vestígios de RNA, porém, seu significado ainda é incerto (MOSS, 2007).



**Figura 9 – Morfologia do *Vaccinia virus*.** (a) Diagrama da estrutura do *Vaccinia*. (b) Micrografia do vírus mostrando claramente o nucleóide (x200.000). (c) Estrutura superficial do *Vaccinia*. Uma micrografia eletrônica de varredura de quatro vírus mostrando a matriz espessa de fibras de superfície (x150.000). **Fonte:** adaptado de PRESCOTT *et al.*, 2002.

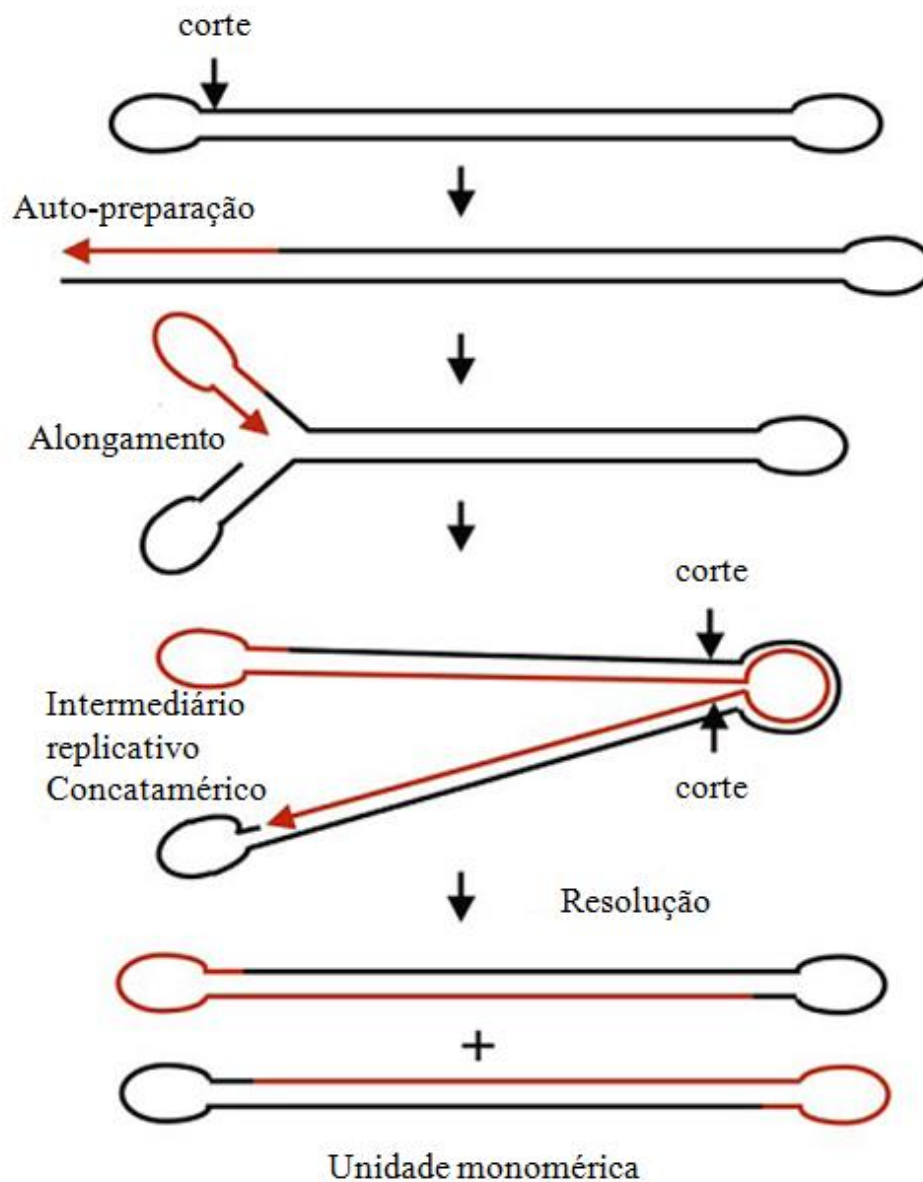
O processo de multiplicação dos poxvírus inicia-se com um contato da partícula viral com a superfície celular, e sua posterior penetração na célula. O cerne viral é liberado no citoplasma e, é transportado por microtúbulos para o interior da célula em regiões próximas ao núcleo. Entre as várias enzimas encontradas no interior da partícula dos poxvírus existe uma RNA-polimerase viral que transcreve cerca da metade do genoma viral em mRNAs precoces. Esses RNAs são transcritos no interior do cerne do vírus e, a seguir, liberados no citoplasma (MURRAY & ROSENTHAL, 2006). Os mRNAs precoces do VACV são detectados dentro de 20 minutos após a infecção e acumulam em níveis máximos em 1-2 horas (MOSS, 2007).

Dos 50 polipeptídeos encontrados no cerne viral, 30 são enzimas, das quais pelo menos metade são diretamente envolvidas na biossíntese de mRNAs precoces. Como as enzimas necessárias são contidas no interior do cerne viral, a transcrição precoce não é afetada por inibidores da síntese protéica (SMITH, 2007).

Os promotores dos genes do VACV são pequenos (~30pb) e ricos em A+T exatamente como os promotores encontrados nos genes do hospedeiro, no entanto, os promotores virais não são reconhecidos pela RNA polimerase II das células do hospedeiro, assim como a RNA polimerase do VACV não reconhece os promotores das células hospedeiras (SMITH, 2007).

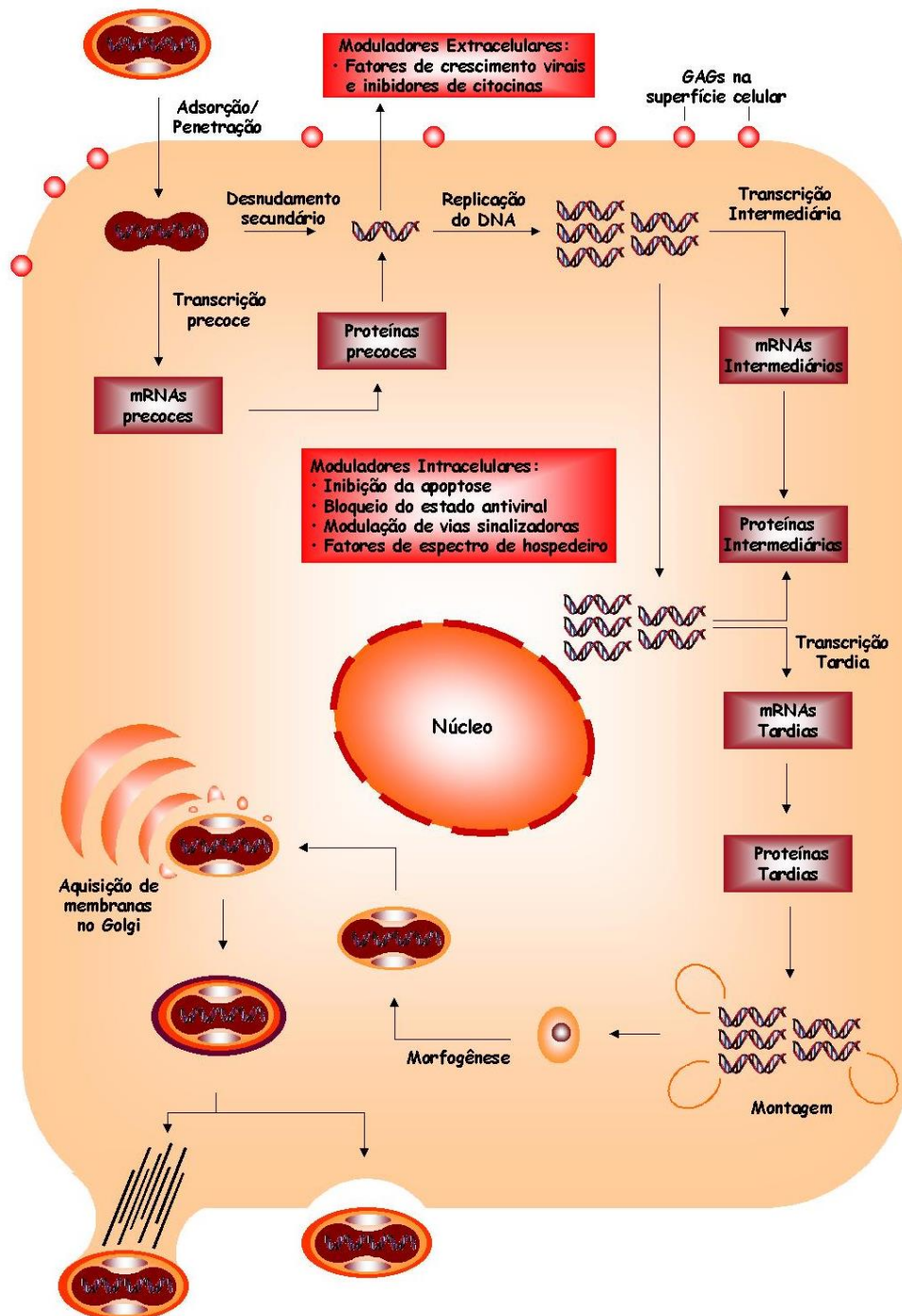
A replicação do DNA viral ocorre no citoplasma (PRESCOTT *et al.*, 2002) em áreas distintas, que aparecem como “fábricas” ou corpúsculos de inclusão em micrografias eletrônicas (KATSAFANAS & MOSS, 2007). Num modelo proposto, a replicação começaria com a introdução de um corte em uma das fitas de DNA perto das alças terminais. O

desdobramento da alça permite que a DNA polimerase copie a alça e faça a extensão até o final do molde. Então, as duas fitas separadas e as cópias de DNA recém produzidas se dobram novamente em alças permitindo que a DNA polimerase continue a extensão da cópia de todo o genoma, podendo formar moléculas concateméricas. Em seguida essas moléculas são clivadas por nucleases específicas em monômeros como mostrado na **figura 10**, que são empacotados em novos vírus (SMITH, 2007). Cabe ressaltar que este modelo ainda não foi demonstrado experimentalmente. Por outro lado, a existência de uma primase viral sugere que outras formas de replicação do DNA devem ser consideradas (DE SILVA *et al.* 2007).



**Figura 10 – Representação esquemática da replicação do DNA do VACV.** A molécula de dsDNA linear com alças terminais é clivada perto de uma alça permitindo a extensão até ao final do molde. Após a renaturação da alça terminal, a extensão continua a produzir o DNA em moléculas concataméricas intermediárias que são clivadas em monômeros com a mesma unidade de comprimento. O DNA recém sintetizado é mostrado em vermelho e o DNA molde em preto. **Fonte:** adaptado de SMITH, 2007.

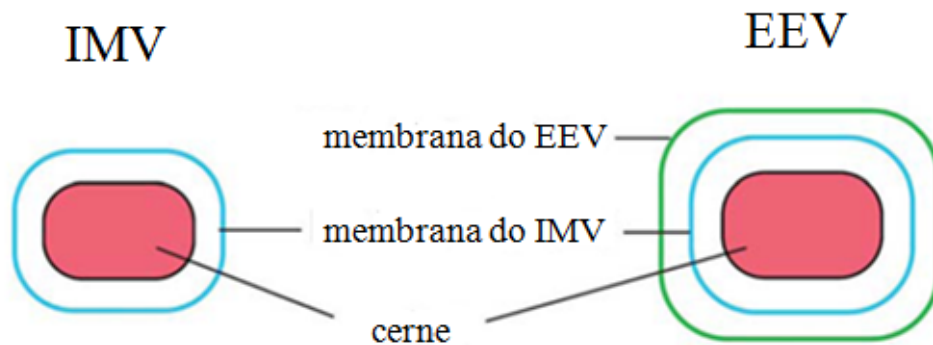
Em células sincronicamente infectadas com o VACV, a replicação do DNA começa 1 a 2 horas após a infecção e resulta na geração de 10.000 cópias do genoma por célula, das quais metade é finalmente empacotada dentro de partículas virais (MOSS, 2007). O ciclo reprodutivo completo nos poxvírus leva cerca de 24 horas (**Figura 11**). (PRESCOTT *et al.*, 2002).



**Figura 11 – Ciclo de multiplicação dos poxvírus.** Inicia-se com a adsorção viral seguido de fusão à membrana plasmática e liberação do nucleocapsídeo no citoplasma. Ocorre a transcrição de genes precoces que induzem o desnudamento secundário e consequente replicação do DNA. Durante e após a replicação do DNA, ocorre a transcrição dos genes intermediários e tardios. Por fim, ocorre a morfogênese das partículas virais e aquisição de membranas. As partículas recém formadas podem permanecer dentro da célula, aderidas à membrana plasmática ou serem liberadas para o meio extracelular ou permanecem associadas à célula. Fonte: McFADDEN, 2005.

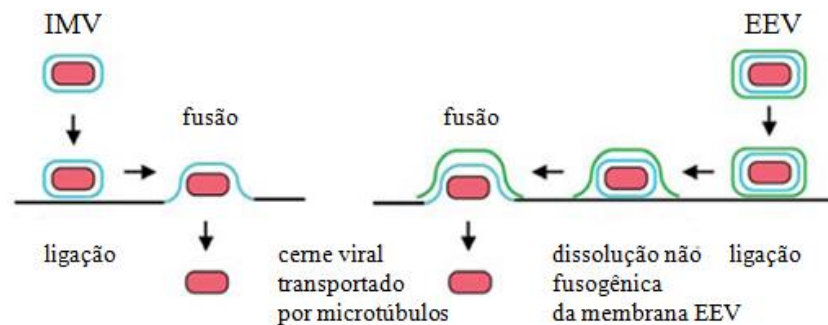
Estudos de como os poxvírus penetram nas células hospedeiras são complicados devido à existência de múltiplas formas infecciosas que podem usar diferentes receptores celulares e proteínas virais. No entanto, o DNA viral isolado é incapaz de causar infecção. Sabe-se que os vírus envelopados extracelulares (EEVs) e os relacionados vírus envelopados associados às células (CEVs) constituem partículas importantes para a difusão célula-célula, sendo que ocorre a formação de caudas de actina para auxiliar os vírus CEVs nesse processo. Já os vírus intracelulares maduros (IMVs) são partículas que são liberadas através do processo de lise celular (MOSS, 2007; SMITH, 2007). Recentemente foi demonstrado que as formas IMVs também podem entrar na célula através de endocitose mediada por receptor ou macropinocitose (MERCER *et al.* 2010).

Os vírus EEVs e IMVs, ambos formas infecciosas que se desenvolvem no curso de uma infecção, diferem-se somente porque o EEV é uma partícula de IMV envolvida por um envelope lipídico derivado do “*trans-Golgi network*” (TGN) ou dos endossomos. Esse envelope, adquirido durante a morfogênese e modificado pela inclusão de diversas proteínas virais e celulares, está ausente nas partículas de IMVs (**Figura 12**).



**Figura 12** – Representação esquemática que ilustra a diferença básica entre o vírus intracelular maduro e o vírus extracelular envelopado. **Fonte:** adaptado de SMITH, 2007.

A entrada dos IMVs na célula hospedeira ocorre por um processo relativamente simples porque são envolvidos por apenas um envelope lipídico. Assim, o cerne viral pode entrar no citosol logo após a fusão da membrana do vírus com a membrana plasmática. Já a entrada dos EEVs exige que um de seus envelopes lipídicos seja retirado por um mecanismo não fusogênico que necessita de moléculas específicas na superfície da célula e do vírus (SMITH, 2007). Esses diferentes processos de infecção celular são ilustrados na **figura 13**.



**Figura 13 – Representação esquemática da entrada das partículas IMV e EEV na célula hospedeira.** As partículas de IMV se ligam a um receptor na superfície celular não identificado e se fundem com a membrana plasmática permitindo a liberação do cerne viral no citoplasma. A partícula EEV liga-se a superfície celular e glicosaminoglicanos medeiam a disruptura não fusogênica da membrana externa do EEV. O IMV interno em seguida liga-se a superfície da célula e entra como uma partícula de IMV. **Fonte:** adaptado de SMITH, 2007.

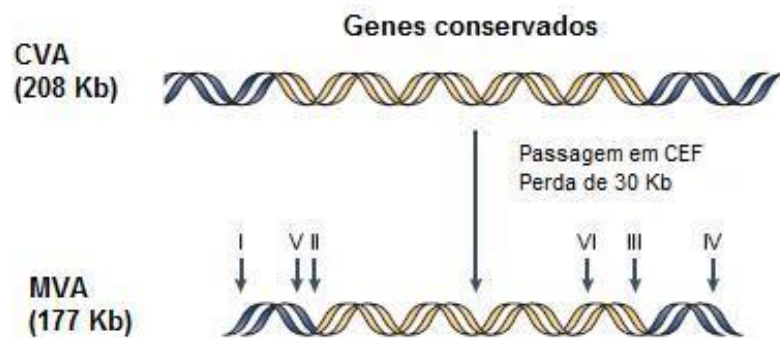
O VACV tem a habilidade de interromper a produção de proteínas da célula hospedeira após a infecção (MURRAY & ROSENTHAL, 2006) de tal forma, que os recursos celulares podem ser quase completamente utilizados para a produção de proteínas virais e proteínas recombinantes associadas ao vírus. As enzimas responsáveis pela síntese de mRNAs virais são todas fornecidas pelo próprio vírus, que traz para o citoplasma celular uma RNA polimerase dependente de DNA para a transcrição de genes virais e recombinantes (SMITH, 2007). Dentre as enzimas da maquinaria de transcrição fornecida pelo vírus incluem-se uma enzima capping, uma poli A polimerase, fatores de iniciação e terminação da transcrição precoce (inicial). Os mRNAs são poliadenilados e possuem uma extremidade metilada na região 5' (SMITH, 2007).

### 1.6 – MVA (Vírus *Vaccinia* Ankara Modificado)

O uso bem sucedido do VACV, no programa mundial de erradicação da varíola em conjunto com o desenvolvimento de estratégias de geração eficiente de vírus *Vaccinia* recombinantes (rVACV) expressando proteínas exógenas, aumentou o potencial do uso de vetores derivados de poxvírus como *delivery systems* (sistemas de veiculação) em programas de vacinação (RAMIREZ *et al.*, 2000). O vírus MVA é derivado da linhagem de VACV isolado na cidade de Ankara, Turquia. O MVA foi produzido por atenuação desta linhagem de VACV de Ankara através de passagens seriadas em células primárias de embriões de galinha (CEFs), resultando em deleções no genoma da amostra viral, tornando-a pouco virulenta e

capaz de atender à demanda da época que se configurava na produção de uma vacina segura contra a Varíola (RAMIREZ *et al.*, 2000).

Análises do genoma feitas por Meyer *et al.* (1991) e Antoine *et al.* (1998), identificaram seis regiões principais de deleções (**Figura 14**) e os genes oriundos da amostra parental (cerca de 15% do genoma parental viral, 30.000 pb), perdidos durante o curso da atenuação com mais de 570 passagens em cultura de células (ANTOINE *et al.*, 1998). Isso tornou o MVA inapto a multiplicar produtivamente na maioria das células originárias de mamíferos. No entanto, em CEFs, o MVA consegue multiplicar-se eficientemente (AUSUBEL *et al.*, 2003). Além disso, de acordo com Garber *et al.* (2009), rMVA também multiplicam-se em títulos elevados em CEFs.



**Figura 14 – Deleções ocorridas no genoma do vírus VACV-ANK que culminaram na formação do vírus MVA.** As seis regiões de deleção ocorrem principalmente em regiões pouco conservadas entre os poxvírus e estão relacionadas à redução do espectro de hospedeiros e à evasão do sistema imune. **Fonte:** adaptado de McFADDEN 2005.

O defeito replicativo do MVA em células humanas, bem como na maioria das outras células de mamíferos, ocorre no final da morfogênese, mais precisamente como resultado de um bloqueio na maturação do vírus, sem alteração na produção de proteínas precoces e tardias (SUTTER & MOSS, 1992). Apesar dessa incapacidade de multiplicar em muitas células de mamíferos, os MVAs possuem todas as vantagens dos poxvírus para utilização como vetores de expressão em eucariotos, incluindo-se sua enorme capacidade de acomodar DNA exógeno em seu genoma (até 25 Kb) bem como a expressão de altos níveis de proteínas, até mesmo de proteínas recombinantes, capacidade de induzir resposta imune celular e humoral e conferir

proteção por longos períodos (GEIBEN-LYNN *et al.*, 2008; DREXLER *et al.*, 2004; GRANDPRE *et al.*, 2009).

Vários pesquisadores demonstraram a eficiência do uso de rMVA expressando proteínas virais, tumorais ou de parasitos para indução de imunidade protetora (RAMIREZ *et al.*, 2000), mesmo que parcial, contra HIV (GUDMUNSDOTTER *et al.* 2009; EARL *et al.* 2009), SIV (OURMANOV *et al.*, 2009), AHSV (CHIAM *et al.*, 2009), Influenza A/H5N1 (KREIJTZ *et al.*, 2009), Dengue (MEN *et al.*, 2000), raiva (ERTL, 2009), malária (HUTCHINGS *et al.*, 2007; PRIEUR *et al.*, 2003), *M. tuberculosis* (TCHILIAN *et al.*, 2009) e melanoma (GREINER *et al.*, 2006) usando diferentes regimes de imunização com dose e reforço homólogo ou heterólogo e diferentes rotas de administração dos vírus recombinantes.

Apesar dos bons resultados utilizando vírus rMVA para imunização em diferentes protocolos (GRANDPRE *et al.*, 2009), estudos de interações intracelulares do hospedeiro com o vírus rMVA, podem aumentar o sucesso dessa ferramenta molecular em induzir imunidade protetora em mamíferos.

## 1.7 – Resposta imune inata do hospedeiro à infecção por VACV

A imunidade inata desempenha papel importante nas infecções microbianas, e uma característica chave dessa resposta imune é sua capacidade de reconhecer uma variedade de microorganismos, sinais de estresse e de dano celular por meio de receptores de reconhecimento de padrão (PRRs). Esses receptores presentes em vários tipos celulares podem estar na superfície, ancorados a membrana citoplasmática, em vesículas endossomais e/ou no citoplasma sendo capazes de ativar essas células gerando uma potente resposta imune (ABBAS, 2008). Os PRRs reconhecem padrões moleculares invariantes compartilhados por vários microorganismos e que de forma geral, não estão presentes em mamíferos (ex: dsRNA, ilhas CpG não metilados, peptídeos derivados de proteínas bacteriana contendo N-Formilmetionil, açúcares ricos em manose, etc.). A ativação desses PRRs desencadeia uma cascata de sinalização que resulta na síntese de proteínas envolvidas com a resposta imune e processos inflamatórios. Os genes codificadores de tais receptores [ex: receptores do tipo *toll* – TLR, receptores do tipo NOD – NLR (do inglês *nucleotide oligomerization domain like receptor*), proteína cinase dependente de RNA de fita-dupla – PKR, etc.] não sofrem rearranjo



gênico tal como ocorre com os genes codificadores de receptores de linfócitos T e B, o que limita o repertório de especificidade (MOGENSEN, 2009; ABBAS, 2008; GOLDSBY *et al.*, 2002; GARCÍA *et al.*, 2006; GARCÍA *et al.*, 2007; WILKINS & GALE Jr, 2010; UNTERHOLZNER & BOWIE, 2007).

Existem 7 tipos de receptores TLR envolvidos na resposta imune contra vírus (FINBERG *et al.*, 2007). Delaloye e colaboradores (2009), demonstraram, mais especificamente que o MVA induz uma resposta imune inata forte, sendo em macrófagos, coordenada pelos receptores TLR-2 e TLR-6 dependente do fator de diferenciação mielóide 88 (TLR-2-TLR-6-MyD88), pela proteína do gene associado a diferenciação do melanoma 5 dependente de estimulador do promotor de interferon- $\beta$  1 (MDA-5-IPS-1) e pela via do complexo molecular multimérico NALP3 inflamossomo, que é formado por NALP3, ASC (*Apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD*) e pro-caspase 1 promovendo uma regulação do padrão de citocinas, quimiocinas e interferons (DELALOYE *et al.*, 2009). No caso de células dendríticas plasmocitóides a ativação é realizada pelo receptor TLR-8-MyD88 (MARTINEZ *et al.*, 2010). O perfil de citocinas, quimiocinas e interferons pode variar dependendo do tipo celular infectado (DELALOYE *et al.*, 2009).

Os VACVs têm a capacidade de interromper a apresentação de antígenos restritos as moléculas de MHC II (principal complexo de histocompatibilidade de classe II) em células profissionais em apresentação de antígenos (APCs), essa capacidade depende do tempo de infecção e do título viral (LI *et al.*, 2005). Moléculas de MHC I são expressas em altos níveis basais em células não infectadas, normalmente, tem sua expressão aumentada nessas células quando essas são infectadas por MVA com uma baixa multiplicidade de infecção (m.o.i = 0,05) e diminuem sua expressão quando infectadas com altas doses (m.o.i = 5) (NÖRDER *et al.* 2010).

Ensaio feitos por microarranjos de DNA revelaram que infecções de células humanas pelo MVA levam a um aumento na expressão de genes do hospedeiro capazes de acentuar a resposta imune específica (GUERRA *et al.*, 2004). Em vários tipos celulares infectados com o vírus MVA foi observado a ativação da via de sinalização do fator de transcrição NF- $\kappa$ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*), sendo dependente da ativação da PKR por dsRNA (LYNCH *et al.*, 2009), mesmo o vírus expressando genes inibidores da PKR (genes K3L e E3L) (LANGLAND & JACOBS, 2002). A ativação da PKR

ocorre por dsRNAs gerados pela transcrição convergente de genes precoces, intermediários ou tardios durante infecção pelo MVA (MYSKIW *et al.*, 2011). Estudos mostraram que a ativação da PKR ocorre durante a fase precoce ou intermediária de transcrição de genes virais e somente na ausência do produto do gene K1L, outro inibidor da PKR, que é truncado no genoma do MVA (WILLIS *et al.*, 2011). Além disso, espécies de RNA gerados durante a infecção pelo MVA, ativam a via apoptótica da célula dependente da PKR.

Outra proteína viral sabidamente envolvida na inibição da via do fator de transcrição NF- $\kappa$ B é a glicoproteína M2L, expressa precocemente durante o ciclo de multiplicação viral e localizada no RE (HINTHONG *et al.*, 2008).

Várias vias de transdução de sinais, ativadas durante uma infecção pelo MVA já foram identificadas, entre elas incluem a ativação de ERK 1/2, JNK, IRF3, IRF7 (*interferon regulatory factor*) e STAT-1 (Fator de transcrição Transdutor de sinais e ativador de transcrição 1) (DELALOYE *et al.* 2009). Hu e colaboradores mostraram que a ativação da via de sinalização pela cinase JNK (c-Jun amino-terminal cinase) é importante para a ativação da PKR (HU *et al.*, 2008). Em um estudo recente, foi demonstrado a habilidade do complexo DNA-PK, formado por Ku70, Ku 80 e DNA-PKcs, em intensificar a resposta imune inata dependente de IRF3 através da molécula adaptadora TBK1 (*TANK-binding kinase 1*) (FERGUSON *et al.* 2012). O sensoamento de DNA pelo complexo DNA-PK é inibido pela proteína viral C16 que interage com o heterodímero de Ku e N2 que impede o processo desencadeado por essa via (PETERS *et al.*, 2013).

Dentre as estratégias que os VACV usam para evadir de respostas do hospedeiro a infecção, destaca-se a expressão de proteínas virais com homologia a família Bcl-2, tais como A46, A52, B14, C1, F1, K7, N1 e N2 (GONZALES & ESTEBAN, 2010; SMITH *et al.*, 2013) que atuam de forma não redundante em diferentes pontos das cascatas de sinalizações da resposta imune inata.

### 1.8 – *Luciferase de Vaga-Lumes*

Luciferase é o nome genérico dado para uma família de enzimas que catalisam reações bioquímicas a partir do substrato luciferina com o objetivo de emitir bioluminescência. Essas proteínas compartilham entre si, sequências de nucleotídeos homólogas e que ocorrem em

procariotos, fungos, dinoflagelados, radiolários e em aproximadamente setecentos gêneros de animais marinhos do reino Metazoa. A reação catalisada pela enzima luciferase oriunda do vaga-lume *Photinus pyralis* usa ATP como co-fator e, é caracterizada pela formação de um complexo enzima luciferil-adenilato, na presença do íon magnésio divalente ( $Mg^{2+}$ ) e, conseqüente liberação de uma molécula de fosfato inorgânico ou pirofosfato (PPi). Posteriormente, o complexo sofre descarboxilação oxidativa, o que produz Adenosina Monofosfato (AMP),  $CO_2$  (g), oxiluciferina e luz, além de reconstituir a luciferase. A luz é emitida devido à conversão de energia química, durante a oxidação do substrato, a um estado energético excitado o suficiente para emitir um fóton durante o retorno ao estado energético inicial (CONTI *et al*, 1996). A reação é bastante eficiente já que é liberado aproximadamente um fóton para cada molécula de luciferina oxidada. A luz produzida apresenta *quantum* de 0,88, possui cor verde amarelada e comprimento de onda de 560 nm em um potencial hidrogeniônico (pH) entre 7,5 e 8,5 (DE WET *et al*, 1986).

A luciferase tem sido amplamente utilizada como gene ou proteína repórter no campo da pesquisa científica, em estudos de biologia celular e molecular. Dentre esses estudos destacam-se a construção de um vírus recombinante *Vaccinia* WR expressando tal gene, usado para seguir a infecção viral em tecidos (RODRIGUEZ *et al*, 1988). Também já foi usado para monitorar em tempo real, por imagens da bioluminescência, a via biossintética secretora em células de mamíferos usando um plasmídios contendo a sequência codificante para a *Gaussia* Luciferase (BHAUMIK & GAMBHIR, 2002 ; SUZUKI *et al.*, 2007).

## II – JUSTIFICATIVA

É esperado que haja ativação da via UPR por vírus pertencentes a todas as famílias virais conhecidas, em função da maior demanda por dobramento de proteínas derivadas justamente da produção de proteínas virais durante uma infecção produtiva. Porém, também é esperado que os vírus normalmente interfiram na ativação dessa via a fim de evitar que a mesma culmine no processo de apoptose (RUTKOWSKI *et al.*, 2006; HE, 2006). Dessa forma, diante de infecções virais a via UPR pode ser apenas parcialmente ativada, apresentar componentes funcionalmente inibidos ou ainda um padrão de ativação de proteínas sincronizado com o estágio do ciclo de replicação do vírus invasor (ZHANG & WANG, 2012; HOOPER, HIGHTOWER, HOOPER, 2012).

Pesquisas conduzidas no Laboratório de Virologia Básica e Aplicada (ICB/UFMG) buscam desenvolver vacinas utilizando vírus recombinantes tendo o vírus MVA como plataforma, já que ele consiste em um dos sistemas de expressão mais versáteis para o uso em eucariotos, com diversas aplicações na biologia molecular, sendo capaz de expressar grandes quantidades do gene exógeno (GEIBEN-LYNN *et al.*, 2008). Após o seu uso com sucesso, durante a campanha de erradicação da Varíola, o MVA se tornou um forte candidato como sistema de veiculação de antígenos em substituição às vacinas convencionais. Dessa forma, muitos ensaios clínicos usando o MVA como vetor vacinal foram conduzidos e agora a sua segurança é bem documentada.

Contudo, uma melhor compreensão da interação vírus-hospedeiro permitirá que façamos modificações no vetor MVA que levem a maiores chances de sucesso como vetor vacinal. Dessa forma, o objetivo deste trabalho é contribuir com a linha de pesquisa do nosso grupo no sentido de entender a relação da UPR com a infecção por VACV que pode interferir na eficiência de produção de proteínas recombinantes pelo sistema MVA e com isso, tentar aperfeiçoar nossa ferramenta molecular usada no desenvolvimento de vacinas.

Além disso, o conhecimento dessas refinadas estratégias usadas pelo MVA para controlar a via UPR, levam a uma nova e otimista perspectiva de que esses vírus ou proteínas codificadas por ele possam eventualmente ser utilizados na terapêutica de patologias

neurodegenerativas, doenças auto-imunes, tumores, aterosclerose, entre outras doenças crônicas.

### **III – OBJETIVOS**

#### *Objetivo Geral*

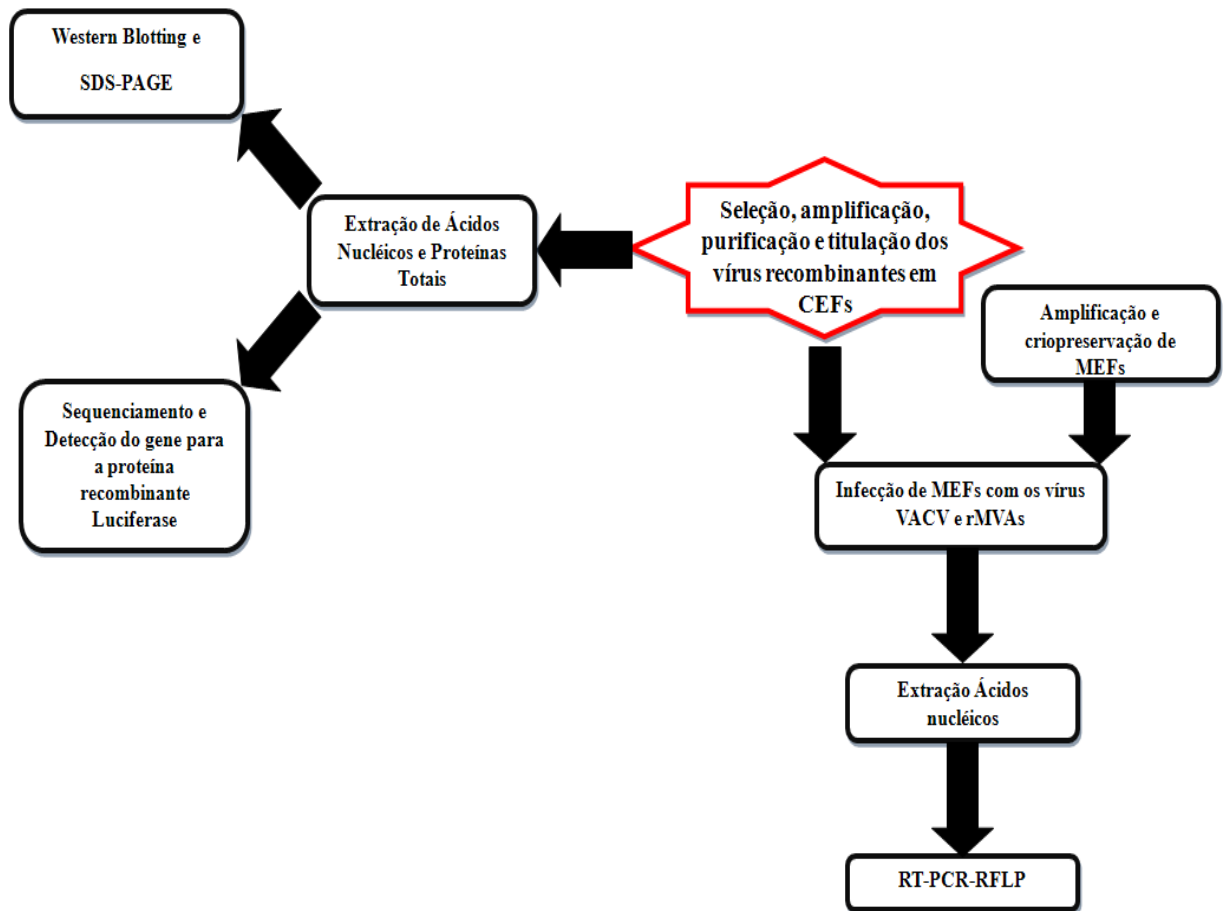
O presente trabalho tem como objetivo geral investigar o impacto da ativação da via UPR da célula hospedeira na eficiência da expressão de antígenos exógenos produzidos por vetores recombinantes poxvirais.

#### *Objetivos Específicos*

- Gerar, por meio de recombinação homóloga os vírus MVA recombinantes expressando a proteína Luciferase endereçada ou não ao retículo endoplasmático;
- Determinar a expressão da proteína recombinante Luciferase através de ensaios de Western Blot;
- Avaliar a ativação de IRE1 durante a infecção pelos rMVAs, através de ensaios de PCR-RFLP do fator de transcrição XBP-1, em células selvagens ou deficientes para PERK.

## IV – METODOLOGIA

### 4.1 – Estratégia de Trabalho



## 4.2 – Amostras Virais Recombinantes (rMVA)

### 4.2.1 – Origem dos Vírus rMVA

O vírus MVA selvagem foi gentilmente cedido pelo Dr. Bernard Moss (Laboratory of Viral Diseases, NIAID, National Institutes of Health – NIH, EUA), na passagem número 581. Desde então, o vírus é rotineiramente multiplicado, purificado e titulado em CEFs no laboratório.

Os vírus rMVA-GFP-Luc e rMVA-GFP-HASS-Luc foram gerados, através recombinação homóloga em CEFs infectadas com vírus MVA selvagem e transfectadas com um dos plasmídios de transferência (pLW44/HASS-Luc ou pLW44/Luc) (SANTOS e DA FONSECA, 2010 – dados não publicados) construídos como parte do projeto de iniciação científica do estudante Vinícius Cotta dos Santos no Laboratório de Virologia Comparada (atual Laboratório de virologia Básica e Aplicada – LVBA).

O plasmídio pLW-44 vem sendo utilizado por vários pesquisadores para a construção de MVAs recombinantes (BISHT *et al.*; 2004). O plasmídio de transferência pLW-44 (5028 pb) foi originalmente construído por Linda Wyatt (*National Institute of Health*), à partir do vetor de clonagem pGEM-4z (2746 pb). O pLW-44 possui, além do esqueleto estrutural do plasmídio pGEM-4z, duas regiões flangeadoras (MVA flanco 1 e MVA flanco 2), um promotor tardio do vírus *Vaccinia*, p11, que se localiza logo após a região flangeadora 1 e que controla a expressão do gene que codifica para a proteína GFP, uma região MCS (múltiplos sítios de clonagem, do inglês *multiple cloning sites*) que possui locais de clivagem para as enzimas de restrição *SmaI*, *Sall* e *PstI*, onde podem ser clonados possíveis genes de interesse, e um promotor forte, mH5 (precoce/tardio em tandem), do *Vaccinia vírus*, que controla a expressão dos genes inseridos nesta região MCS.

As regiões flangeadoras MVA 1 e 2, presentes no pLW44, são homólogas á uma região existente no vírus MVA denominada de sítio de deleção III. Essa similaridade permite a recombinação homóloga entre as regiões de flanco presentes no plasmídio e as regiões geneticamente homólogas presentes no vírus, dirigindo o cassete de expressão contendo o gene exógeno para esse locus.

Santos e Da Fonseca (2010) clonaram o gene da luciferase no MCS do pLW44 e, também clonaram o gene da Luciferase acrescido de um peptídeo sinal de endereçamento ao



RE, HASS (*Hemagglutinin Secretion Signal*) (**Figura 15**), proveniente do *Influenza A virus* H3N2, gerando dois plasmídios de transferência. O peptídeo sinal está localizado junto à sequência da proteína hemaglutinina no genoma do H3N2 e tem sido utilizado com sucesso na construção de outros vetores recombinantes (DE ANDRADE *et al.*, 2007; RESENDE *et al.*, 2008).

## MKTIIALSYIFCLVFA

**Figura 15: Peptídeo Sinal HASS.** Sequência de aminoácidos do sinal de endereçamento proveniente do *Influenza A virus* H3N2.

Além de construir os plasmídios de transferência, em seu trabalho, Santos e Da Fonseca (2010) iniciaram a construção dos vírus MVA-GFP-Luc e MVA-GFP-HASS-Luc, dando início ao processo de seleção dos vírus recombinantes com auxílio da expressão de GFP, com intuito de isolar os vírus MVA recombinantes dos vírus selvagens. No entanto, a obtenção dos vírus recombinantes não foi concluída. Assim, em continuidade ao projeto iniciado anteriormente, foi concluída a seleção, amplificação, purificação e titulação dos vírus recombinantes e posterior análise do estresse do retículo endoplasmático em células infectadas com esses vírus.

### 4.2.2 – Iniciadores

Para a amplificação do gene da Luciferase foram utilizados os mesmos iniciadores externos (EXT-Luc-F-SalI, EXT-Luc-HASS-F-SalI e EXT-Luc-R-PstI) desenhados por SANTOS & da FONSECA (2010) e foram baseados em sequências depositadas no Genbank. Em um dos iniciadores senso foram adicionados os códons do peptídeo sinal de endereçamento ao RE, HASS. Vale a pena ressaltar que sítios de restrição para as enzimas SalI e PstI foram acrescentados para que a clonagem no plasmídeo de transferência, pLW44, pudesse ocorrer. Para que o sequenciamento fosse completo, foram construídos iniciadores internos (INT-Luc-F e INT-Luc-R) que amplificam a região central do gene (TABELA 1). Além disso, iniciadores (pLW44-F e pLW44-R) específicos para as regiões flanqueadoras presentes no plasmídeo receptor pLW44, também foram utilizados na detecção e sequenciamento desse gene.

TABELA 1 – Iniciadores e suas respectivas sequências para amplificação do gene da Luciferase e ou análise do inserto.

Iniciadores	Sequência de nucleotídeos (5' → 3')
EXT-Luc-F-SalI	GGGG <b>TCGAC</b> ATGGAAGACGCCAAAAAC
EXT-Luc-HASS-F-SalI	GGGGTCGACATGGAAGACGCCAAAAAC GGGG <b>TCGAC</b> ATGAAGACTATCATTGCTTTGAGCTACATTTTCTGTCTGGTTTTCG CCGAAGACGCCAAAAAC
EXT-Luc-R-PstI	GGG <b>CTGCAG</b> TTACAATTTGGACTTTCCG
INT-Luc-F	TCACATCTCATCTACCTCCCG
INT-Luc-R	GTAGCCATCCATCCT TGT CA
pLW44-F	CCCGACAACCACTACCTGAG
pLW44-R	TGGGCTCCTTATACCAAGC

Em vermelho está o sítio de restrição para a enzima SalI; em azul para a enzima PstI; em verde está a sequência do peptídeo sinal HASS.

#### 4.2.3 – Sequenciamento (SANGER *et al.*, 1977; Dye Enamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBace – GE Healthcare)

Foram sequenciados os plasmídios de transferência usados na geração dos rMVAS. O sequenciamento foi realizado em sequenciador automático capilar Mega Bace1000 (GE HEALTHCARE), através do método de dideoxi (SANGER *et al.*, 1977). Foi utilizado o Kit DYEnamic™ ET Dye Terminator (MegaBACE™), seguindo as instruções do fabricante.

Cerca de 300 ng de cada plasmídio e 5 pmol de iniciadores internos senso ou anti-senso (Tabela 1) foram utilizados em cada reação de sequenciamento. Essa reação foi feita em placa de 96 poços, em Termociclador Eppendorf 96-well Mastercycler® epgradient e nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C por 2 segundos, seguida de 36 ciclos de 25 segundos a 95°C, 15 segundos a 50°C e 3 minutos a 60°C. As reações foram submetidas à precipitação com acetato de amônio e lavadas com etanol de acordo com as instruções do Kit DYEnamic™ ET Dye Terminator, para eliminação dos dideoxinucleotídios marcados não incorporados, e, finalmente, o DNA foi homogeneizado em tampão de amostra.

#### 4.2.4 – Análise das Sequências Nucleotídicas

Os cromatogramas obtidos foram analisados com o auxílio da plataforma “Electropherogram quality analysis” (<http://asparagin.cenargen.embrapa.br/phph/>). Tal plataforma analisa as seqüências geradas pelo seqüenciador automático atribuindo a cada uma delas valores de qualidade, que são determinados pelo programa Phred. As seqüências referentes aos vetores são retiradas e a seqüência consenso é feita por meio do programa CAP3 Sequence Assembly Program (HUANG e MADAN, 1999; <http://pbil.univ-lyon1.fr/cap3.php>).

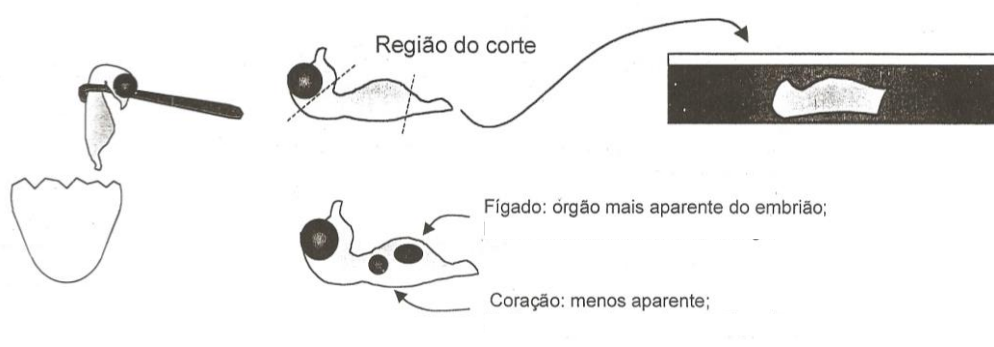
De posse da seqüência consenso, análises manuais foram realizadas com o objetivo de verificar se o gene para a proteína Luciferase estava em condições adequadas para a expressão. Para isso, os programas BLAST (Basic Local Alignment Search Tool - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) e MultiAlin (<http://bioinfo.genopole-toulouse.prd.fr/multalin/multalin.html>) foram utilizados.

#### 4.2.5 – Produção de Células Fibroblásticas de Embriões de Galinha (CEFs)

Os vírus rMVA foram selecionados e multiplicados em cultivo primário de células de fibroblasto de embrião de galinha (CEF).

Para a produção do cultivo primário de CEFs, os ovos embrionados com 10 dias de postura foram higienizados com etanol 70%. Após a higienização, os ovos foram colocados em uma bandeja com o lado afinado disposto para baixo, e a parte superior da casca do ovo é quebrada com auxílio de uma pinça. A casca é removida até a linha da câmara de gás e as membranas foram retiradas expondo o embrião. O embrião foi removido (afastando os outros anexos) pelo pescoço e colocado em uma placa de petri contendo meio mínimo essencial autoclavável (MEM – M0769, SIGMA) incompleto, ou seja, sem a adição de soro fetal bovino (SFB) e suplementado com NaHCO<sub>3</sub> a 0,225%, 2 mM L-glutamina, penicilina (100 U/mL), estreptomicina (100 µg/mL) e anfotericina B 0,4%. A cabeça, os membros superiores e inferiores e os órgãos internos dos embriões (coração, fígado, pulmões) foram retirados com auxílio de uma tesoura e pinça. Em seguida, os embriões foram transferidos e mantidos em

outra placa de petri contendo meio MEM incompleto para liberação do sangue. Os embriões foram misturados na placa de petri para a liberação da maior quantidade possível de sangue (**Figura 16**).



**Figura 16** – Representação esquemática que ilustra a retirada dos embriões dos ovos. Além disso, é mostrada também a posição do corte e os órgãos a serem retirados.

Após esse procedimento, os embriões foram triturados através da passagem da carcaça por uma seringa de 10 mL, sem agulha, para dentro de um erlenmeyer contendo cerca de 3 mL de solução de tripsina/EDTA (136 mM NaCl; 5 mM KCl; 55 mM glicose; 69 mM NaHCO<sub>3</sub>; 0,5 g p/v de tripsina 1:250 -Difco; 0,5 mM EDTA; vermelho de fenol a 1%) por embrião.

Após um período de incubação a 37°C por 15 minutos sob agitação, a ação da tripsina era interrompida adicionando-se igual volume de meio MEM com 10% de SFB (CULTILAB, Brasil), NaHCO<sub>3</sub>, Penicilina (100 U/mL), Estreptomicina (100 µg/mL), Novamin (40 µg/mL) e antimicótico (Anfotericina B a 0,4%) (meio completo). Em seguida, essa suspensão foi lentamente filtrada em um béquer com gaze e a solução filtrada centrifugada a 2.500 rpm por 10 minutos (NÜVE - NF 800R rotor RA200) e o sobrenadante descartado. O sedimento de células, então, foi suspenso em meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM – D7777, SIGMA) (suplementado com NaHCO<sub>3</sub> a 0,225%, 2 mM L-glutamina, penicilina [100 U/mL], estreptomicina [100 µg/mL] e anfotericina B 0,4% p/v) com 10% de SFB e alíquotas desta suspensão adicionadas a garrafas de 75 cm<sup>2</sup>. As garrafas foram incubadas a 37°C em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> (Thermo Scientific Forma<sup>®</sup> Series II 3111 Water-Jacket CO<sub>2</sub> Incubator) até atingirem uma confluência e os subcultivos feitos por no máximo 2 vezes e em intervalos de no máximo 3 dias.

#### 4.2.6 – Repique Celular

As garrafas contendo células (CEFs) produzidas, como descrito no item 4.2.5, eram repicadas por no máximo 2 vezes, para garantir a manutenção de culturas celulares viáveis para os experimentos de infecção viral.

O meio DMEM nas garrafas era descartado, e a monocamada lavada com solução salina fosfatada e tamponada (PBS) 1X (1,5 mM NaCl; 40 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH 7,2). Em seguida, cerca de 5 mL de solução de tripsina/EDTA (136 mM NaCl; 5 mM KCl; 55 mM glicose; 69 mM NaHCO<sub>3</sub>; 0,5 g p/v de tripsina 1:250 -Difco; 0,5 mM EDTA; vermelho de fenol a 1%) era adicionada às garrafas de 75 cm<sup>2</sup> para soltar completamente a monocamada celular. A ação da tripsina é neutralizada com PBS contendo 10% SFB.

A suspensão celular era transferida para um tubo Falcon de 50 mL e centrifugada durante 5 minutos a 3.500 rpm (NÜVE - NF 800R rotor RA200). O sobrenadante era descartado e o sedimento de células suspenso em meio DMEM completo (DMEM – D7777, SIGMA) (suplementado com NaHCO<sub>3</sub> a 0,225%, 2 mM L-glutamina, penicilina [100 U/mL], estreptomicina [100 µg/mL] e anfotericina B 0,4% p/v) com 10% de SFB. Em cada garrafa foi colocado até 5 mL da suspensão celular (dependendo da quantidade de células obtidas), sendo ainda adicionado mais 10 mL de meio DMEM completo (suplementado com NaHCO<sub>3</sub> a 0,225%, 2 mM L-glutamina, penicilina [100 U/mL], estreptomicina [100 µg/mL] e anfotericina B 0,4% p/v) com 10% de SFB. Em seguida, as garrafas foram incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> (Thermo Scientific Forma<sup>®</sup> Series II 3111 Water-Jacket CO<sub>2</sub> Incubator) à 37 °C durante 48 horas.

#### 4.2.7 – Seleção dos Vírus Recombinantes

Os vírus MVA recombinantes foram selecionados por sucessivos ensaios de purificação de placa. Para isso, 500 µL de cada amostra eram submetidos a três ciclos de sonicação em banho de gelo e utilizados para infectar monocamadas de CEFs em placas de 6 cavidades, sendo um poço reservado para controle de célula, no qual eram acrescentados 500 µL de DMEM (DMEM – D7777, SIGMA) (suplementado com NaHCO<sub>3</sub> a 0,225%, 2 mM L-

glutamina, penicilina [100 U/mL], estreptomicina [100 µg/mL] e anfotericina B 0,4% p/v) com 2,5% de SFB. Diferentes diluições das amostras de vírus selecionadas eram feitas e utilizadas para infectar CEFs em sucessivas passagens das amostras virais para obter clones cada vez mais isolados. A adsorção era executada a 37°C em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> (Heal Force® HF160W Water-Jacketed CO<sub>2</sub> Incubator) com homogeneização constante durante 1 hora. Em seguida, as monocamadas eram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) 1X (1,5 mM NaCl, 40 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,2) e adicionada uma solução contendo agarose 1% e meio MEM 1X (GIBCO) suplementado com 2,5% de SFB, antibióticos e glutamina. As placas eram novamente incubadas (Heal Force® HF160W Water-Jacketed CO<sub>2</sub> Incubator) a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO<sub>2</sub> por 48 horas. Após esse período, as células eram observadas ao microscópio de fluorescência (Microscópio invertido Olympus IX71) para visualização de focos de fluorescência verde nas monocamadas, devido à expressão do gene da GFP. Nos locais em que foram detectados focos de fluorescência, as células eram coletadas com auxílio de ponteiros e transferidas para tubos de microcentrífuga contendo 500 µL de DMEM (DMEM – D7777, SIGMA) completo com 2,5% de SFB. Essa suspensão era congelada e descongelada três vezes em refrigerador -70°C e banho maria a 37°C, respectivamente, para lise das células infectadas e liberação do vírus. Finalmente, ela era armazenada a -80°C.

#### 4.2.8 – Amplificação dos Vírus Recombinantes

As suspensões virais obtidas no processo de seleção foram congeladas e descongeladas por três vezes a -80°C e em banho de água a 37°C, respectivamente, e submetidas a três ciclos de sonicação em banho de gelo para prosseguir com a amplificação viral. Os clones dos vírus rMVA-GFP-Luc e rMVA-GFP-HASS-Luc selecionados foram amplificados por meio de passagens seguidas em placas de 12 e 6 cavidades e em garrafas de 25 cm<sup>2</sup>, 75 cm<sup>2</sup> e 150 cm<sup>2</sup> para se obter um título viral adequado. Em cada recipiente utilizado para amplificação os volumes das soluções e reagentes foram diferentes. Basicamente, fizemos diluições das amostras de vírus selecionadas e utilizamos para infectar CEFs. A adsorção ocorreu em meio DMEM (DMEM – D7777, SIGMA) completo (suplementado com NaHCO<sub>3</sub> a 0,225%, 2 mM L-glutamina, penicilina [100 U/mL], estreptomicina [100 µg/mL] e anfotericina B 0,4% p/v) com 2,5% de SFB a 37°C com homogeneização constante de 1 hora em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> (Heal Force® HF160W Water-Jacketed CO<sub>2</sub> Incubator). Após isso, foi adicionado um

volume específico de DMEM (DMEM – D7777, SIGMA) completo com 2,5% de SFB e as placas/garrafas deixadas nas mesmas condições por mais 48 horas. Posteriormente o conteúdo foi raspado, centrifugado e o sedimento ressuspensionado em DMEM completo com 2,5% de SFB.

#### 4.2.9 – Detecção do Gene para a Proteína Recombinante Luciferase

Para detectar o gene para a proteína Luciferase no vírus recombinante, monocamadas de CEF em placas de 6 cavidades foram infectadas com 500 µL do vírus MVA-GFP-Luc ou MVA-GFP-HASS-Luc. Uma cavidade de cada placa foi reservada para controle de células, sendo acrescentado 500 µL de meio DMEM (DMEM – D7777, SIGMA) completo com 2,5% de SFB. A adsorção foi executada a 37°C, em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> (Heal Force® HF160W Water-Jacketed CO<sub>2</sub> Incubator) e com homogeneização constante durante 1 hora. Após a adsorção, as monocamadas de células foram lavadas, duas vezes, com PBS 1X e, em seguida, adicionado, em cada cavidade, 2 mL de meio DMEM completo com 2,5% de SFB. As placas foram incubadas a 37°C, em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 48 horas (Heal Force® HF160W Water-Jacketed CO<sub>2</sub> Incubator).

Após as 48 horas, as monocamadas de células foram raspadas, com o auxílio de raspadores de silicone, e as soluções resultantes, centrifugadas por 2 minutos a 14.000 rpm (microcentrifuga Eppendorf 5415R). Os sedimentos foram suspensos em 250 µL de meio DMEM completo e as suspensões virais obtidas, utilizadas para a extração de DNA.

A extração de DNA foi realizada adicionando 250 µL de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (PCI) na proporção de 25:24:1 nas amostras previamente aquecidas a 99°C por 15 minutos. Após 20 minutos, as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 15 minutos à 4°C (microcentrifuga Eppendorf 5415R). Os sobrenadantes foram coletados e adicionado 10% do volume de acetato de sódio 3M pH 5,5 e 2,5 vezes o volume de etanol absoluto. As amostras foram novamente centrifugadas a 13.000 rpm por 20 minutos à 4°C (microcentrifuga Eppendorf 5415R) e o sedimento lavado com etanol 70% por duas vezes. Após as lavagens, o sedimento foi suspenso em 30 µL de H<sub>2</sub>O. O DNA obtido foi quantificado por espectrofotometria (espectrofotômetro ND-1000, NanoDrop, EUA) e a sua integridade verificada por eletroforese em gel de agarose 0.8%.

Os DNAs acima foram utilizados como molde em reações de PCR. Nessas reações utilizamos 2  $\mu\text{L}$  da DNA das amostras virais; 0,6  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (25 mM); 2  $\mu\text{L}$  de tampão 10X (500 mM KCl, Triton X100 a 1%, 100 mM Tris pH 8,3); 0,2  $\mu\text{L}$  de enzima Taq polimerase 8 (3 U/ $\mu\text{L}$ ); 0,2  $\mu\text{L}$  de iniciador senso (10  $\mu\text{M}$ ); 0,2  $\mu\text{L}$  de iniciador anti-senso (10  $\mu\text{M}$ ); 0,4  $\mu\text{L}$  de dNTPs (10 mM) e  $\text{H}_2\text{O}$  até o volume final de 20  $\mu\text{L}$ .

Os ciclos de amplificação ocorreram da seguinte forma: desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto; pareamento a 55°C por 30 segundos; extensão a 72°C por 3 minutos; e um passo final de extensão a 72°C por 10 minutos.

Os produtos amplificados, juntamente com um marcador de tamanho molecular, foram fracionados por eletroforese em gel de agarose 1% em TBE 1X (89 mM Tris base, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA pH 8), acrescido de 0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de brometo de etídio a um potencial elétrico constante de 100 V. Os géis foram visualizados em transiluminador ultravioleta e fotografados.

Após a detecção do gene para a proteína Luciferase, não foram conduzidos experimentos para o sequenciamento do mesmo, uma vez que inserido no genoma viral, pouco provável de ocorrer mutações de sentido trocado ou sem sentido já que esses vírus possuem mecanismos de reparo de DNA (GAMMON & EVANS, 2009).

#### 4.2.10 – Purificação Viral

Os sedimentos virais obtidos da amplificação (item 4.2.6) foram descongelados e transferidos para um tubo Falcon de 50 mL.

Os sedimentos foram suspensos em 8,0mL de Tris-HCL (10 mM, pH 8,0), homogeneizados no vortex e centrifugados a 2.500 rpm por 15 minutos à 4 °C (NÜVE - NF 800R rotor RA200). O sobrenadante foi coletado e transferido para um tubo Falcon deixado em banho de gelo. O sedimento obtido foi suspenso em 10 mL de Solução de Lise ( $\text{MgCl}_2 10^{-3}$  M, Tris-HCL  $10^{-2}$  pH 7,6, KCl  $10^{-2}$  M) e deixado no gelo por 10 minutos. Após os 10 minutos, o sedimento foi homogeneizado em Douncer (homogenizador de vidro) (aproximadamente 60 manipulações). O sobrenadante foi coletado e misturado ao anterior.



O sedimento foi suspenso em 8,0 mL de Solução de Lise e deixado por 10 minutos em banho de gelo. Após os 10 minutos, o sedimento foi homogeneizado em Douncer (aproximadamente 60 manipulações). O fluido foi coletado e centrifugado a 2.500 rpm por 15 minutos à 4 °C (NÜVE - NF 800R rotor RA200). O sobrenadante foi coletado e misturado aos anteriores, mantidos em banho de gelo. Quantidade final: 8,0 mL sobrenadante Tris-HCl + 10 mL sobrenadante Solução de Lise + 8,0 mL sobrenadante Solução de Lise = 26 mL.

Em um tubo de centrífuga contendo aproximadamente 10 mL do colchão de Sacarose 36% foi adicionada a suspensão viral (26 mL) lentamente pelas bordas do tubo. Os tubos foram equilibrados e centrifugados a 14.000 rpm por 2 horas à 4 °C (ultracentrífuga Sorvall OTD-Combi rotor AH629).

#### 4.2.11 – Titulação Viral

A suspensão viral foi inicialmente submetida à sonicação em banho de gelo em 3 ciclos de 30 segundos, com intervalos de 30 segundos entre cada ciclo. Foram feitas diluições seriadas dessa suspensão em meio MEM incompleto, sendo utilizados 500 µL de cada diluição para infectar as respectivas monocamadas de CEF em uma placa de 6 cavidades. Um poço da placa foi reservado para controle de célula, sendo acrescentados 500 µL de MEM incompleto. A adsorção foi feita a 37°C, em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> e com homogeneização constante durante 1 hora. Em seguida, as monocamadas de células foram lavadas com PBS 1X e acrescentados 2 mL de MEM contendo SFB a 2,5% em cada poço. A placa era incubada a 37°C em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 48 horas. Assim, após 2 dias de infecção, as placas foram analisadas no microscópio de fluorescência (*Microscópio invertido* Olympus **IX71**), onde focos de fluorescência verde fluorescente foram contados.

O título viral, número de unidades virais formadoras de placas (UFP) por mL, será expresso pelo número médio de focos verdes observados nos poços com a maior diluição onde esses focos forem observados e o número de focos será multiplicado pelo inverso da diluição por mL, e pelo fator de correção para 1 mL.

#### 4.2.12 – Detecção do mRNA para a proteína Luciferase

Para detectar o mRNA para a proteína Luciferase sintetizada pelo vírus recombinante, monocamadas de CEF foram infectadas com uma m.o.i. de 10 e as placas foram incubadas a 37°C, em uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas.

Após as 24 horas, as monocamadas de células foram raspadas, com o auxílio de raspadores de silicone, e as soluções resultantes foram centrifugadas por 2 minutos a 14.000 rpm (microcentrifuga Eppendorf 5415R). Os sedimentos foram suspensos com 250 µL de meio MEM completo e as suspensões virais obtidas foram utilizadas para a extração de RNA.

O RNA foi extraído adicionando 750 µL de TRIzol<sup>®</sup> (Invitrogen) às suspensões virais e incubando as misturas por 5 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 10 minutos a 4°C (microcentrifuga Eppendorf 5415R) e os sobrenadantes foram coletados, adicionados 250 µL de clorofórmio e incubados por 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 15 minutos a 4°C (microcentrifuga Eppendorf 5415R). Após separação das fases, a fase aquosa foi transferida para microtubos contendo 500 µL de isopropanol, as misturas foram cuidadosamente homogeneizadas, por inversão, e incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, para precipitação do RNA total, os microtubos foram centrifugados a 14.000 rpm por 10 minutos a 4°C (microcentrifuga Eppendorf 5415R). Os sobrenadantes foram desprezados e os sedimentos foram lavados com etanol 70% por duas vezes. Os sedimentos de RNA obtidos foram suspensos em 20 µL de H<sub>2</sub>O e quantificados por espectrofotometria (espectrofotômetro ND-1000, NanoDrop, EUA).

As reações de transcrição reversa foram realizadas em termociclador Gradient Thermal Cycler (Biocycler MJ96+/MJ96G), sendo que 5 µg do RNA juntamente com 20 pmol do iniciador oligo-dT<sub>15</sub> foram inicialmente incubados a 70°C por 5 minutos e, em seguida, a 4°C por mais 5 minutos. Posteriormente, foram adicionados 4 µL de tampão da enzima ImProm-II<sup>™</sup> 5X (Promega); 2,4 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM); 1 µL de dNTPs (10 mM); 0,5 µL RNAsin (Ribonuclease Inhibitor – Promega) (40 U/µL); 1 µL de transcriptase reversa ImProm-II<sup>™</sup> (Promega) e H<sub>2</sub>O DEPC até o volume final de 20 µL. As reações foram mantidas a 25°C por 5 minutos, a 42°C por 60 minutos e, a seguir, a 70°C por 15 minutos.

Alíquotas dos cDNAs obtidos foram, então, submetidos à amplificação por PCR e o restante estocado a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

As reações de PCR foram realizadas da mesma forma que no item 4.2.9. Os produtos obtidos foram separados em gel de agarose 1% em TBE 1X, acrescido de  $0,5\ \mu\text{g/mL}$  de brometo de etídio a um potencial elétrico constante de 100 V. Os géis foram visualizados em transiluminador ultravioleta e fotografados.

#### 4.2.13 – Células Fibroblásticas de Embriões de Camundongo (MEFs)

Fibroblastos congelados, de embrião de camundongo selvagem ou deficiente para PERK foram cedidos gentilmente pelo Prof. Aristóbolo Mendes da Silva (Departamento de Morfologia, ICB/UFMG). Essas células foram obtidas de embriões desses camundongos com 13.5 dias e, imortalizadas com o antígeno T grande do vírus símio SV-40 (RON & HARDING, 2003).

MEFs-WT (5<sup>a</sup> passagem) e MEFs-PERK-KO (21<sup>a</sup> passagem) foram descongeladas em banho-maria a  $37^{\circ}\text{C}$ , imediatamente após o descongelamento as células foram transferidas para garrafas T25 com 5 mL de meio completo contendo 10% SFB e incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  com atmosfera úmida e contendo 5% de  $\text{CO}_2$  (Thermo Scientific Forma<sup>®</sup> Series II 3111 Water-Jacket  $\text{CO}_2$  Incubator) até atingir mais de 90% de confluência (cerca de 24 a 48 horas).

Após atingir a confluência almejada, o meio foi descartado e as células lavada 3 vezes com PBS 1X. Então 1 mL de solução de tripsina foi adicionada para soltar completamente a monocamada celular. A ação da tripsina foi neutralizada com DMEM contendo 10% SFB e a suspensão celular transferida para um tubo Falcon de 50 mL e centrifugada durante 5 minutos a 3.500 rpm (NÜVE - NF 800R rotor RA200). O sobrenadante, descartado e o sedimento de células suspenso em meio DMEM completo com 10% de SFB. Em garrafas T75, foi colocado a suspensão celular e meio DMEM completo com 10% de SFB para um volume final de 15 mL. Em seguida, as garrafas foram incubadas em estufa de  $\text{CO}_2$  à  $37^{\circ}\text{C}$  até atingir mais de 90% de confluência (cerca de 24 a 48 horas). Novamente as células foram repicadas e transferidas para garrafas T150 e incubadas sobre as mesmas condições. Após 48 horas de incubação foi adicionado 5 mL de solução de tripsina e a ação da tripsina foi neutralizada com DMEM contendo 10% SFB, a suspensão celular foi transferida para um tubo Falcon de 50 mL e centrifugada durante 5 minutos a 3.500 rpm. O sobrenadante, descartado e o

sedimento de células suspenso em SFB contendo 10% de DMSO. Aliquotas dessa suspensão foram congeladas a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.2.14 – Extração de Proteínas Totais (WCE)

Para extração de proteínas totais de MEFs e CEFs infectadas com os vetores recombinantes, monocamadas dessas células foram infectadas com diferentes MOI, após 24 horas de incubação a  $37^{\circ}\text{C}$  em uma atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$ , as células foram lavadas em PBS 1X gelado por duas vezes em seguida foi adicionado tampão de lise para obtenção de extrato protéico (50 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, Fluoreto de Sódio 10 mM, Glicerol 10%, 0.1 mM EDTA, 10 mM b-glicerofosfato) contendo inibidores de proteases (PMSF, Ortovanadato de sódio, Leupeptina, Pepstatina, Aprotinina). A monocamada foi raspada e o extrato celular bruto transferido para tubos de microcentrífuga de 1,5 mL, incubados no gelo por 15 minutos, sendo vortexado a cada 5 minutos e finalmente centrifugados (microcentrífuga Eppendorf 5415R) a  $10,000 \times g$  por 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . O sobrenadante foi coletado e transferido para um novo tubo de microcentrífuga, sendo o sedimento descartado. Aliquotas de cada extrato foram dosadas em ensaios de Bradford e trinta microgramas de cada extrato foram fracionados por SDS-PAGE.

#### 4.2.15 – Quantificação das proteínas (Método de Bradford)

O método de Bradford consiste em interação das proteínas com o corante BG-250 presente no reagente de Bradford, que faz com que esse corante absorva fortemente luz a comprimento de onda de 595nm.

As quantificações foram feitas em placas de 96 poços, na qual a cada poço foram adicionados 200 $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  Mili-Q, 50 $\mu\text{L}$  do Reagente de Bradford (BioRad, EUA) e 2 $\mu\text{L}$  de amostra ou dos padrões. A absorbância é medida em leitor de microplacas a 595nm, e os resultados eram comparados com uma curva padrão de BSA de valores conhecidos (1mg/mL, 0,5mg/mL, 0,25mg/mL, 0,125 mg/mL e 0,0625 mg/mL).

#### 4.2.16 – Fracionamento de proteínas em gel de poliacrilamida/SDS-PAGE

O fracionamento de proteínas para uso em ensaios de western-blot e análises da marcação metabólica foram feitos em gel de poliacrilamida. O gel é composto por duas fases, sendo uma superior com concentração 3,9% de acrilamida, denominada gel de empilhamento, que serve para as proteínas alinharem no mesmo nível no gel de eletroforese; e outra inferior com concentração 10% de acrilamida, chamada gel de separação, na qual as proteínas separaram-se de acordo com o seu peso/tamanho molecular.

O gel de separação foi feito adicionando-se água destilada, Tris 1,5M pH 8,8, Acrilamida/Bis 30%, SDS 20%, APS 10% e TEMED. A mistura era adicionada entre as placas do kit Mini-Protean<sup>®</sup> (Bio-Rad) até cerca de 1 cm abaixo de onde se encaixa o pente, e esperava-se polimerizar. O gel de empilhamento era feito tal como o gel de separação, mudando somente a concentração dos reagentes para obter o gel numa porcentagem de acrilamida desejada, e após o preparo, a mistura era adicionada sobre o gel de separação. Acrescentou-se o pente para formar as canaletas e aguardada a polimerização.

Antes de submetidas, as amostras eram aquecidas a 95°C por 10 minutos e só então eram aplicadas no gel juntamente com o tampão de amostra 2X (240mM Tris-HCl pH6,8; 0,8% SDS; 200mM Beta-mercaptoetanol; 4% glicerol; 0,02% azul de bromofenol). Os géis eram colocados na cuba do kit Mini-Protean<sup>®</sup> em tampão de corrida (0,25M Tris; 1,9M Glicina; 1% SDS) e aplicada uma voltagem de 60V até as bandas se alinharem no limite entre as duas fases do gel. Em seguida aplicava-se 120V até as bandas chegarem ao final do gel.

#### 4.2.17 – Ensaios de Western-blot

Após o fracionamento, as amostras eram transferidas para membranas de decafluoreto de polivinil – PVDF (GE Healthcare, Armesham Hybond<sup>TM</sup>-P) durante 1 hora e 30 minutos a um potencial elétrico constante de 90 V. Em seguida, era realizado o bloqueio para evitar marcação inespecífica, deixando a membrana por 1 hora à temperatura ambiente ou *overnight* a 4°C em tampão de bloqueio 2,5% [ 2,5% (p/v) de leite desnatado em pó em TTBS 1X (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl e Tween-20 a 0,1%)]. Em seguida as membranas foram lavadas com tampão de bloqueio 0,5% por três vezes, 10 minutos cada. A marcação com o anticorpo primário policlonal anti-luc (Promega) foi feita usando diferentes intervalos de

tempo, que variaram desde 1 hora à temperatura ambiente a mais de 16 horas a 4°C usando diluições que foram de 1:200 a 1:10000. Posteriormente, as membranas eram novamente lavadas com tampão de bloqueio 0,5% por três vezes, 10 minutos cada. A reação com os anticorpos secundários (anticorpos anti-IgG de cabras conjugados a peroxidase, Abcam<sup>®</sup>) ocorreu durante 1 hora à temperatura ambiente e, foi seguida de 3 lavagens com tampão de bloqueio 0,5%. Por último, as membranas foram reveladas utilizando métodos colorimétricos (4CN) e quimioluminescentes (Kit ECL<sup>™</sup> Plus Western Blotting Detection System, GE Healthcare). Neste ultimo caso também era utilizado o filme Amersham Hyperfilm ECL (GE Healthcare), conforme instruções do fabricante.

#### 4.2.18 – Plasmídio pGL3 *control vector*

O plasmídio pGL3-Control Vector (5256 pb) (Promega) cedido gentilmente pelo prof. Aristobolo Mendes da Silva foi usado como controle nesse trabalho, fornece uma base para análises quantitativas de fatores que potencialmente regulam a expressão gênica. Esses fatores podem ser *cis-acting*, como os promotores e *enhancers* ou, *trans-acting*, como vários fatores de ligação ao DNA. Os plasmídeos pGL3 possuem como esqueleto o plasmídeo pGL2 Luciferase Reporter Vectors, que foi redesenhado para aumentar a expressão e contém uma região codificadora para Luciferase de vagalume (*Photinus pyralis*) otimizada para o monitoramento da atividade transcricional em células eucarióticas transfectadas (**Figura 17**). O ensaio desse repórter é rápido, sensível e quantitativo. Em adição, esse contém numerosas características ajudando na caracterização estrutural das sequências reguladoras.

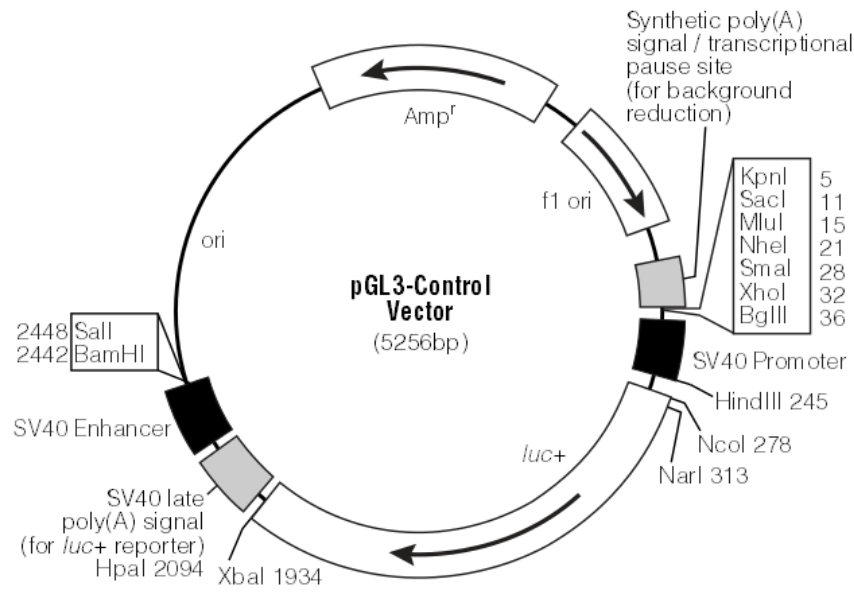


Figura 17: Representação esquemática do plasmídeo pGL3-Control Vector. Amp<sup>R</sup>: β-lactamase; ori: origem de replicação bacteriana; *luc+*: Luciferase; MCS: sítio múltiplo de clonagem

#### 4.2.19 – Obtenção do plasmídeo em pequena escala (Mini-preparações de DNA plasmidial)

Para amplificação dos plasmídios (pGL3), bactérias gram negativas *Escherichia coli* da linhagem XL10-Gold<sup>®</sup> *ultracompetent cells* (Stratagene), preparadas de acordo com o protocolo descrito por SAMBROOK e colaboradores (2001).

Assim, cerca de 2 μL do plasmídeo foram adicionados a 100 μL de bactérias XL10-Gold quimiocompetentes e imediatamente incubados em banho de gelo por 30 minutos.

Posteriormente, as células foram submetidas a um choque térmico a 42 °C por 45 segundos e logo após, colocadas por 2 minutos no gelo novamente. Em seguida, foram adicionados 500 μL de meio Luria-Bertani (LB) sem antibiótico (Bacto-triptona a 1% p/v; extrato de levedura a 0,5% p/v; 171 mM NaCl) e as bactérias foram incubadas a 37°C (New Brunswick Scientific Classic Series C24 incubator/shaker), sob agitação de 250 rpm, por 1 hora (HANAHAN *et al.*, 1991). A cultura bacteriana resultante foi centrifugada a 14.000 rpm (microcentrifuga Eppendorf 5415C) por 1 minuto e o sedimento homogeneizado em 100 μL de LB. A suspensão foi inoculada em placas de Petri contendo LB-ágar (Bacto-triptona a 1% p/v; extrato de levedura a 0,5% p/v; 171 mM NaCl e 1,5% de ágar) suplementado com ampicilina

(100 µg/mL), as placas foram incubadas a 37°C (Fanem - modelo 051) e o crescimento bacteriano foi observado após 16 horas (SAMBROOK *et al.*, 2001).

Algumas colônias crescidas nas placas, oriundas do processo de transformação, foram inoculadas em 1 mL de meio LB 1X contendo ampicilina (100 µg/mL) e incubadas a 37°C com agitação de 250 rpm (microcentrifuga Eppendorf 5415C) por aproximadamente 2 horas. A verificação da presença do inserto foi feita por PCR, na qual 2 µL da cultura bacteriana foram utilizados como molde em reações com perfil idêntico às descritas no item 4.2.9. Os produtos amplificados obtidos foram fracionados em gel de agarose 0.8% em TBE 0,5X, acrescido de 0,5 µg/mL de brometo de etídio a um potencial elétrico constante de 100 V. Os géis foram visualizados em transiluminador ultravioleta e fotografados. Alíquotas das culturas identificadas como positivas para a presença do inserto foram congeladas em glicerol a 40% v/v a -70°C.

Algumas colônias positivas para o gene da luciferase, foram inoculadas em 10 mL de meio LB 1X contendo ampicilina (100 µg/mL) e incubadas a 37°C (New Brunswick Scientific Classic Series C24 incubator/shaker) com agitação de 250 rpm por aproximadamente 16 horas. Após esse período foram feitas alíquotas das culturas que foram congeladas em glicerol a 40% v/v a -80°C.

Em seguida, o restante das culturas foi utilizado para obtenção de DNA plasmidial em pequena escala, empregando-se o Kit Wizard Plus SV Miniprep (Promega-EUA), conforme instruções do fabricante. O DNA obtido foi quantificado por espectrofotometria (espectrofotômetro ND-1000, NanoDrop, EUA) e a sua integridade foi verificada por eletroforese em gel de agarose 0.8% em TBE 0,5X, acrescido de 0,5 µg/mL de brometo de etídio (Invitrogen) a uma voltagem constante de 80 V. O DNA plasmidial dos vetores foram estocados a -20°C.

#### 4.2.20 – Ensaios de atividade da proteína repórter Luciferase

Para análise da atividade da Luciferase, placas de 12 poços monocamadas de células CEFs foram infectadas com os rMVAs (MVA-HASS-Luc ou MVA-Luc) ou como controle, foram transfectadas com o plasmídeo pGL3 *control vector* (Promega). Para isso, 1 mL de uma solução contendo “complexos de DNA/lipofetamina” foi adicionado a uma cavidade da placa. Os “complexos de DNA/lipofetamina” foram preparados, misturando uma solução contendo 2 µg de pGL3 *control vector* e 50 µL de Opti-MEM com uma segunda solução contendo 5 µL



de lipofetamina e 50  $\mu\text{L}$  de Opti-MEM, sendo o volume completado para 1 mL com Opti-MEM. As células foram cobertas pela solução com os complexos de lipofetamina e incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$ , em uma atmosfera de 5% de  $\text{CO}_2$  por 5 horas. Após esse período, o meio das células foi descartado e as mesmas lavadas com PBS, sendo retirado o máximo de solução possível. Em seguida as células foram lisadas por 15 minutos a TA com 200 $\mu\text{L}$  de *reporter lysis buffer* 1x (Promega) sob homogenização. Após a lise, o lisado foi transferido para um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL e centrifugados a 13.000 rmp por 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Para o ensaio da atividade da luciferase, 20  $\mu\text{L}$  do lisado foram adicionados a cada poço de uma placa FluoroNunc<sup>TM</sup> de noventa e seis poços, seguido da adição de 40  $\mu\text{L}$  do substrato luciferina de *Photinus pyralis* (reagente LAR II do kit DLR) e homogeneizado por pipetagem. A leitura foi feita em luminômetro (Lumicount Packard BioSciences) pelo programa Reader (Packard BioSciences) e os resultados expressos em *Relative Light Units* (RLU). Para a normalização dos dados, foi quantificado a concentração de proteínas pelo método de Bradford e dividido os valores de RLU pela concentração de proteínas por  $\mu\text{L}$  de lisado.

### **4.3 – Análise da ocorrência de estresse do retículo endoplasmático (RE)**

#### **4.3.1 – RT-PCR-RFLP**

Para definir os eventos de sinalização ao nível do estresse do RE desencadeados pelos vetores recombinantes, foi analisada a atividade da proteína cinase IRE1 investigando o processamento de seu substrato (XBP-1) e a influencia de PERK sobre esse processo.

IRE1 é uma endonuclease que cliva um intron residual de 26 nucleotídeos presente no mRNA do fator de transcrição XBP-1 (CALFON *et al.*, 2002). Para avaliar se ocorria ativação da cinase IRE1, o RNA total era obtido das células e posteriormente transcrito reversamente à primeira fita de cDNA na presença de oligo-dT<sub>15</sub>, dNTPs e transcriptase reversa MMLV-RT (200U, SuperScript III). A reação ocorreu a  $42^{\circ}\text{C}$  por 60 minutos, seguida de inativação da enzima MMLV-RT a  $65^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos. Um décimo da reação de cDNA foi utilizado para a amplificação por RT-PCR de um segmento de 600-pb do fator de transcrição XBP-1 com os iniciadores MUXBP-3S (5'-AAACAGAGTAGCAGCGCAGACTGC-3') e MUXBP-2AS (5'-GGATCTCTAAACTAGAGGCTTGGTG-3') nas seguintes condições:  $94^{\circ}\text{C}/4'$  seguido

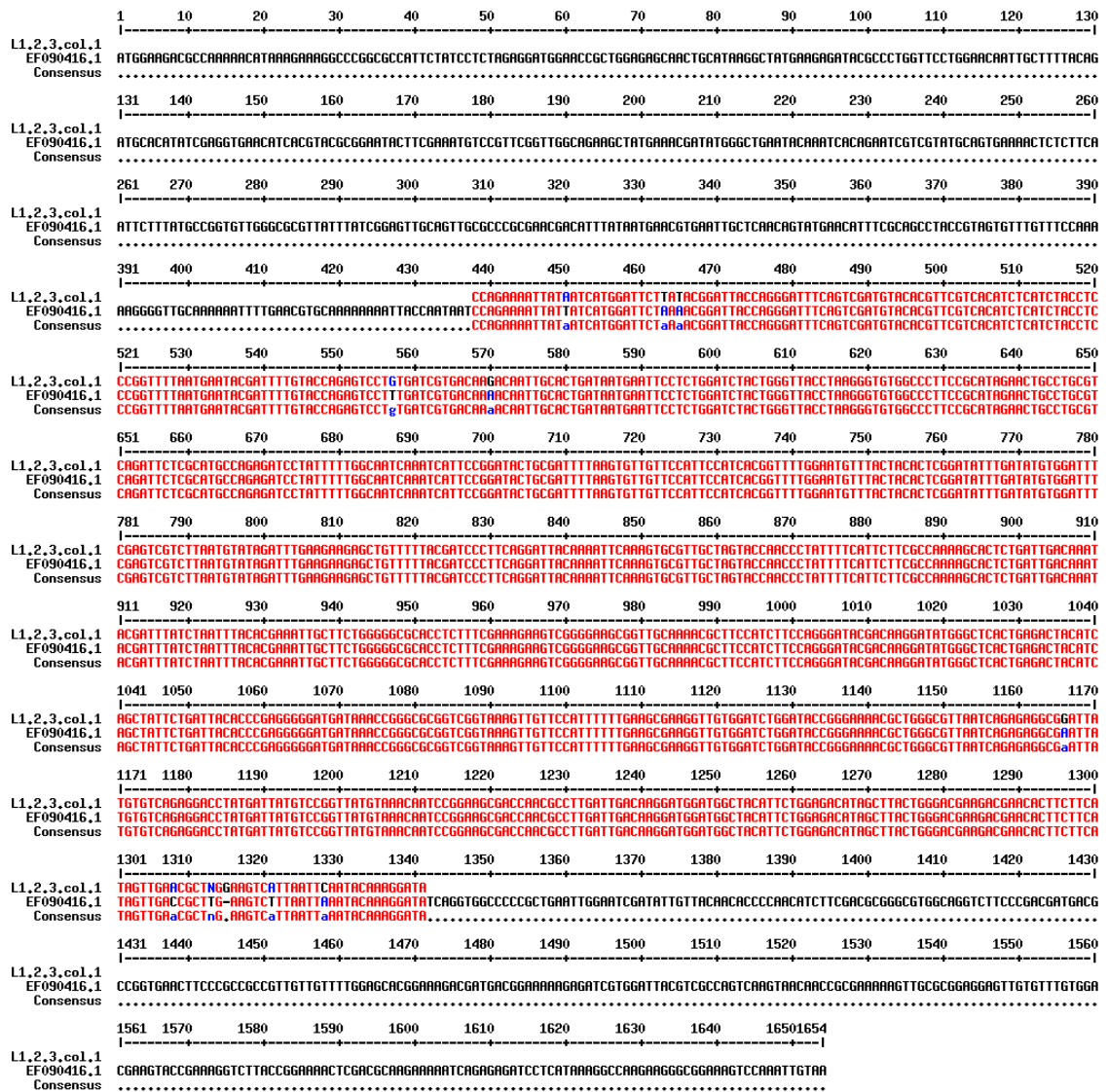
de 35 ciclos de 94°C/10", 68°C/30", 72°C/30", e extensão final a 72°C/10'. Finalmente, um terço do volume da reação de RT-PCR era submetido à digestão enzimática com PstI a 37°C por 3 horas. No íntron processado de 26 nucleotídeos do mRNA de XBP-1 existe um sítio de restrição para a enzima PstI. Portanto, a amplificação por PCR de segmentos de XBP1 a partir de células que sofreram estresse do RE, não continham esta sequência, o que nos permitiu diferenciar o mRNA de XBP1 processado do não processado, após a digestão enzimática do produto de PCR com PstI e fracionamento em gel de agarose 1,4%. Como controles positivos da indução do processamento de XBP-1, utilizamos agentes que causam estresse no RE como BFA ou DTT nos experimentos.

## V – RESULTADOS

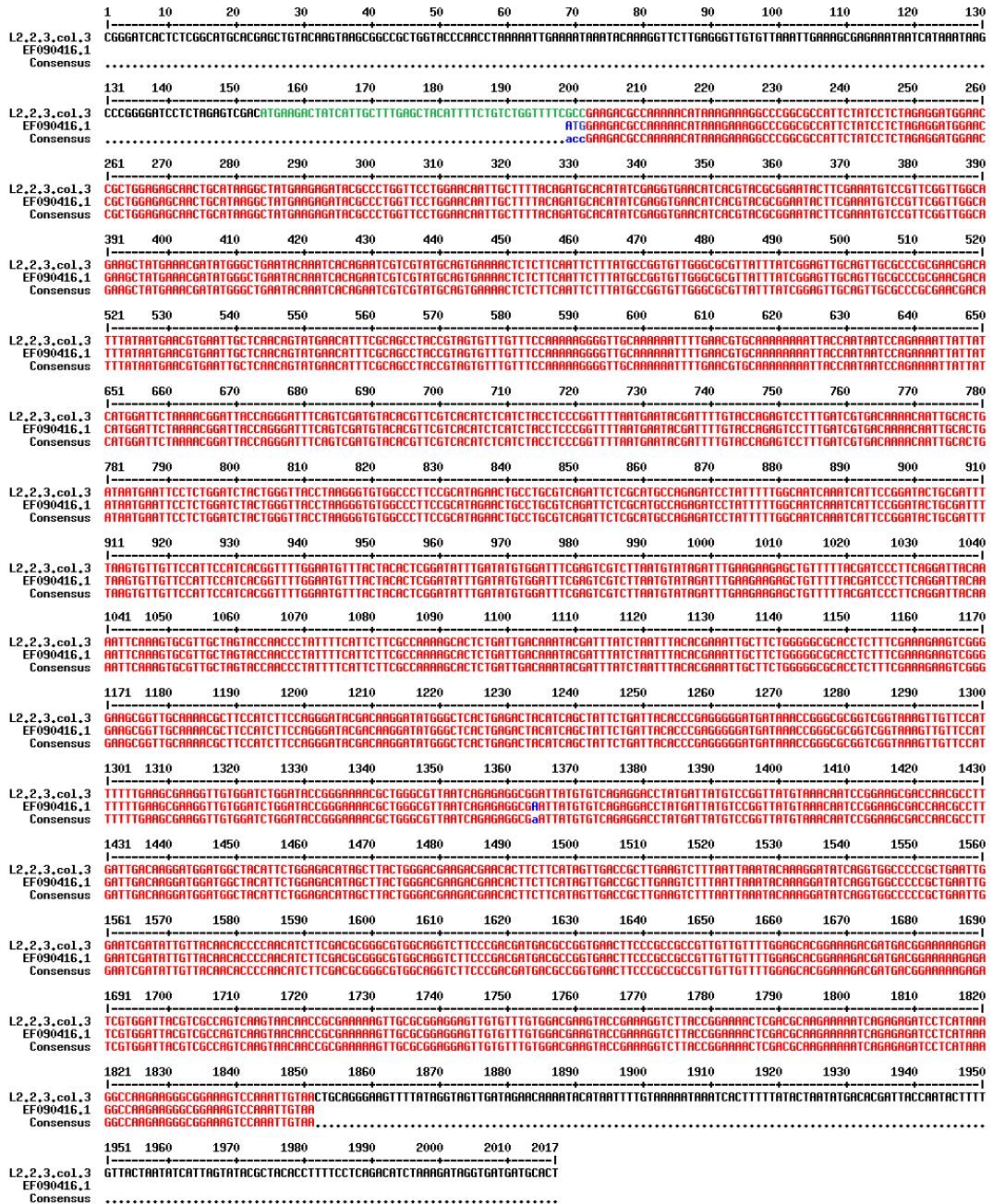
### 5.1 – Sequenciamento e Análise das Sequências pLW44-HASS-Luc e pLW44-Luc

Para verificar se houve mutações na sequência da Luciferase durante o processo de construção dos plasmídios, os clones desses plasmídios foram sequenciados. Por dificuldades técnicas no sequenciamento de todo inserto na época da construção, os plasmídios foram submetidos a novos sequenciamentos após o início da construção dos vírus recombinantes.

Após análise dos cromatogramas, sequências consenso geradas foram avaliadas com o intuito de verificar se o gene para a proteína Luciferase estava em condições adequadas para a expressão. As sequências consenso foram alinhadas com a amostra controle EF090416.1, depositada no banco de dados GenBank. Os resultados dos sequenciamentos nos permitiram concluir que as amostras apresentavam o gene da Luciferase sem mutações que implicassem em mudança de aminoácido (**FIGURA 18 e 19**) e, por isso, teriam plenas condições para expressar a proteína.



**FIGURA 18:** Alinhamento entre a sequência do gene da Luciferase clonado no pLW44 e a sequência controle EF090416.1. O alinhamento foi realizado pelo software "Multialin" disponível online em <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>, e revisado manualmente. Os 1653 nucleotídeos correspondentes ao gene da Luciferase obtiveram 99,33% de similaridade com a sequência controle EF090416.1. As sequências em comum estão em vermelho enquanto os nucleotídeos em preto correspondem a sequências ainda não lidas em sequenciador ou com ausência de similaridade. Os nucleotídeos em azul correspondem a baixa similaridade. Os pontos (.) indicam falta de identidade e os traços (-) indicam ausência de reconhecimento de nucleotídeos.

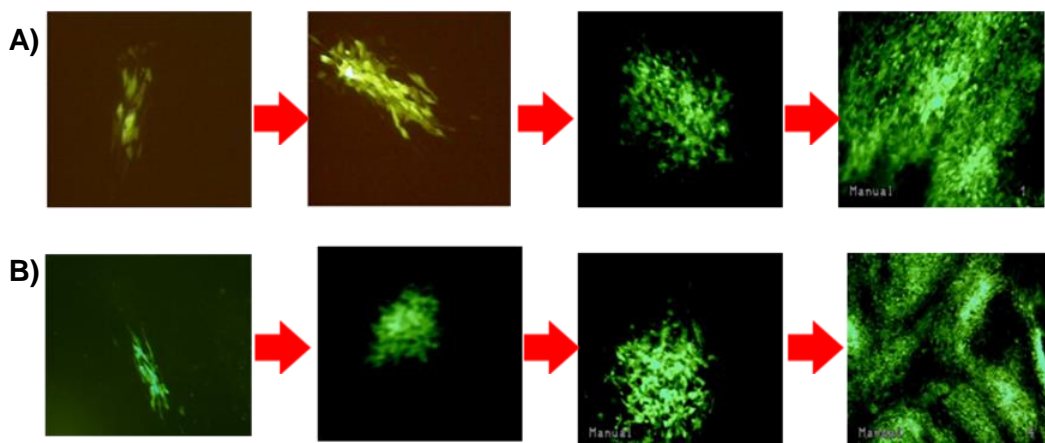


**FIGURA 19:** alinhamento entre a sequência do gene da Luciferase, adicionado do peptídeo sinal HASS, clonado no plasmídeo pLW44, e a sequência controle EF090416.1. O alinhamento foi realizado pelo software “Multalin” disponível online em <http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>, e revisado manualmente. Dos 1701 nucleotídeos totais, os primeiros 48 são referentes ao sinal de endereçamento HASS, os 1653 restantes correspondem ao gene da Luciferase e obtiveram praticamente 100% de similaridade com a sequência controle EF090416.1. As sequências em comum estão em vermelho enquanto os nucleotídeos em preto correspondem às sequências do plasmídeo pLW44. Em verde estão os nucleotídeos relativos ao peptídeo sinal HASS. Os pontos (.) indicam falta de identidade. Os nucleotídeos em azul diferem dos sequenciados.

## 5.2 – Produção dos Vírus Recombinantes

A seleção dos MVA recombinantes ocorre com base na expressão do gene repórter GFP, uma vez que o MVA e respectivos recombinantes não geram placas de lise em monocamadas celulares, o que dificultaria a seleção de clones recombinantes na ausência deste indício marcador. Cabe observar o aumento do tamanho dos clones à medida que as seleções são realizadas, o que indica a diminuição da competição entre os clones recombinantes e eventuais contaminantes selvagens.

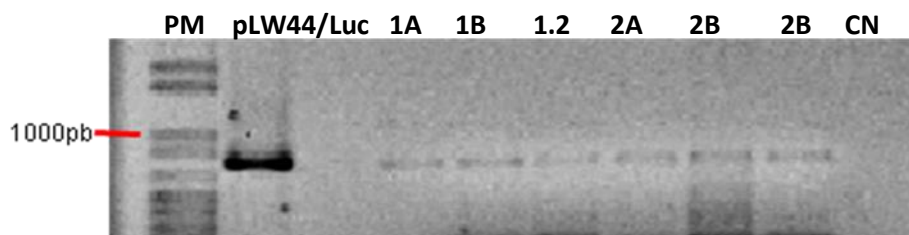
Na **FIGURA 20** estão mostrados os resultados do processo de seleção dos vírus recombinantes.



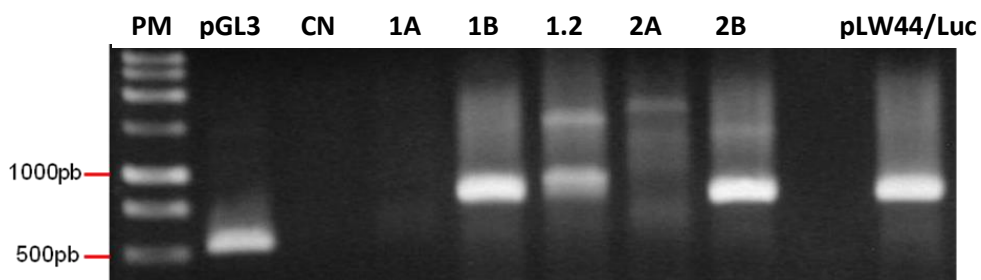
**Figura 20 – Rodadas de seleção dos vírus recombinantes.** Fotografias dos clones coletados durante as rodadas de seleção dos vírus recombinantes (aumento de  $400\times$ , tamanho). Em (A), fotografias que mostram o crescimento em tamanho de clones do MVA-GFP-Luc obtidos durante as passagens sucessivas em placa. Em (B), fotografias que mostram o crescimento em tamanho de clones do MVA-GFP-HASS-Luc semelhante aos obtidos para o vírus sem o peptídeo sinal.

### 5.3 – Detecção do Gene para a Proteína Luciferase

Por meio de vários experimentos para extração do DNA e PCR, o gene para a proteína Luciferase foi detectado em células infectadas com os vírus recombinantes, confirmando, a presença do inserto no genoma viral (**Figura 21 e 22**). Estes resultados são representativos de todos os experimentos feitos para detectar a presença deste inserto no genoma do vírus.



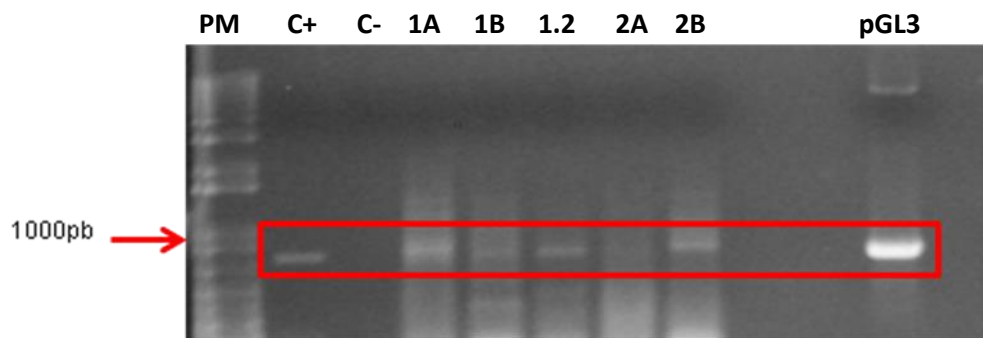
**Figura 21: Amplificação do DNA codificador para a proteína Luciferase com os iniciadores INT-Luc-F e INT-Luc-R.** Visualização após fracionamento eletroforético em gel de agarose 0,8% e TBE 0,5X dos produtos da PCR. Fotografia com padrão de cores invertida pelo software Image J – version 1.47 (RASBAND, W. – NIH). PM, padrão de tamanho molecular 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen); pLW44/Luc, controle positivo; CN, controle negativo; 1A, 1B e 1.2, MVA-GFP-Luc; 2A e 2B, MVA-GFP-HASS-Luc



**Figura 22: Nested PCR. Amplificação do DNA codificador para a proteína Luciferase com os iniciadores pLW44-F e pLW44-R seguido de amplificação com os iniciadores INT-Luc-F e INT-Luc -R.** Visualização após fracionamento eletroforético em gel de agarose 0,8% e TBE 0,5X dos produtos da PCR. PM, padrão de tamanho molecular 1Kb DNA Ladder (Promega); 1A, 1B e 1.2, MVA-GFP-Luc; 2A e 2B, MVA-GFP-HASS-Luc; pLW44/Luc e pGL3, controles positivos; CN, controle negativo;

## 5.4 – Detecção do mRNA para a proteína Luciferase

Além da detecção do gene para a proteína Luciferase, foi feita a detecção do mRNA para essa proteína em células infectadas pelos vírus recombinantes, como análise da confirmação da transcrição dos genes exógenos pelas construções virais. Como observado, as construções foram capazes de gerar mRNAs específicos para os genes recombinantes corroborando os dados obtidos a partir do DNA e indicando que a proteína recombinante Luciferase pode estar sendo expressa (**Figura 23**).



**Figura 23: Amplificação do cDNA codificador para a proteína Luciferase com os iniciadores INT-Luc -F e INT-Luc-R.** Visualização após fracionamento eletroforético em gel de agarose 0,8% e TBE 0,5X dos produtos da PCR. PM, padrão de tamanho molecular 1Kb DNA Ladder (Promega); C+, controle positivo correspondente a infecção com MVA selvagens e transfecção com pLW44/Luc; C-, controle negativo; 1A, 1B e 1.2, MVA-GFP-Luc; 2A e 2B, MVA-GFP-HASS-Luc.

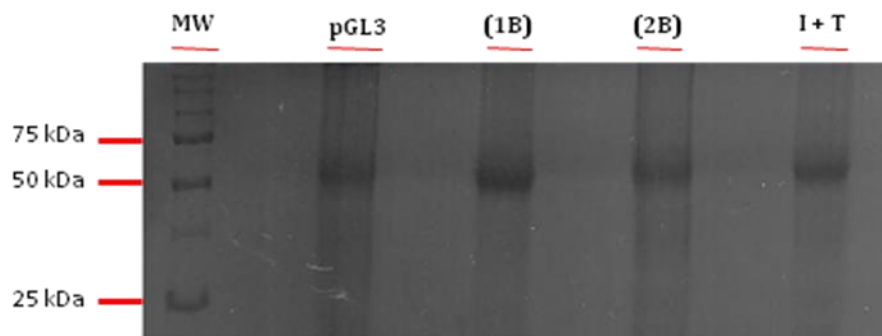
## 5.5 – Detecção da expressão da proteína Luciferase

Para detectar a expressão da proteína Luciferase, extratos protéicos de células infectadas com os vírus MVA-GFP-HASS-Luc e MVA-GFP-Luc foram submetidos ao ensaio de Western Blot.

Inicialmente, foi utilizado um anticorpo comercial da Promega (anticorpo policlonal contra Luciferase de vagalumes produzido em cabra) como anticorpo primário. No entanto,



não foi possível detectar a expressão da proteína Luciferase utilizando esse anticorpo, inclusive nos controles. Como alternativa para a detecção, os extratos protéicos foram fracionados em gel de poliacrilamida e o gel corado com azul de coomassie (**Figura 24**). Embora a especificidade do método seja prejudicada, neste caso, é possível observar a super-expressão, em células infectadas pelos vírus recombinantes, de uma massa protéica de mesmo peso molecular daquela observada quando da produção de proteínas direcionadas pela transfecção de células com o plasmídeo pGL3. Estas massas protéicas têm o tamanho esperado para a proteína Luciferase (~62kDa) e sugerem que ambas as construções virais expressam a proteína, assim como as células transfectadas com o plasmídeo controle pGL3 (SHERF & WOOD, 1994).



**Figura 24: Detecção da proteína Luciferase.** Visualização após fracionamento eletroforético em gel de poliacrilamida 12% dos extratos protéicos de células infectadas com os vírus rMVA, transfectadas com o pGL3 control plasmid ou infectadas com MVA-wt e transfectadas com o pLW44/Luc (I+T). Fotografia com padrão de cores invertida pelo software Image J – version 1.47 (RASBAND, W. – NIH). MW, padrão de tamanho molecular; 1B, MVA-GFP-Luc; 2B, MVA-GFP-HASS-Luc.

## 5.6 – Avaliação dos níveis de expressão da proteína Luciferase

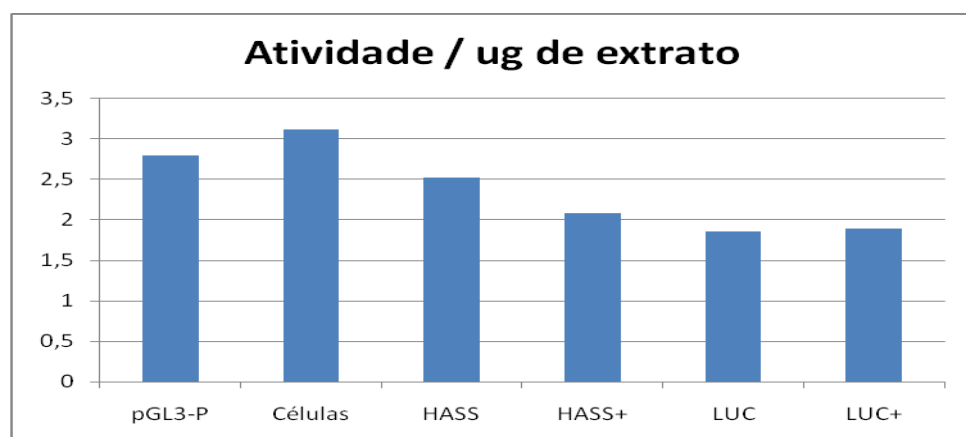
Para detectar os níveis de expressão da proteína Luciferase, extratos protéicos de células infectadas com diferentes m.o.i dos vírus MVA-GFP-HASS-Luc e MVA-GFP-Luc ou transfectadas com o plasmídeo controle pGL3 foram submetidos a ensaios repórteres que avaliam a atividade enzimática da proteína luciferase na presença de seu substrato. Adicionalmente, um extrato obtido de CEFs infectadas com MVA e transfectadas com o plasmídeo de transferência pLW44/Luc também foi usado no ensaio como controle positivo.

Demonstrou-se nesse ensaio que a proteína repórter Luciferase foi significativamente expressa nas células infectadas e com níveis comparáveis aos do controle positivo pGL3 (TABELA 2 e FIGURA 25), o qual possui uma versão modificada do gene Luc (Luc+) capaz de exercer uma atividade até quatro vezes maior que o gene Luc, dependendo do tipo celular (SHERF & WOOD, 1994).

TABELA 2 – Análise da atividade enzimática da luciferase em CEFs após 48 horas de infecção e ou transfecção.

Amostra	P-Luc	$\mu\text{g}/\mu\text{L}$	em 20 $\mu\text{L}$	Atividade / $\mu\text{g}$ de extrato*
pGL3-P	109	1,95	39	2,794872
Células	93	1,49	29,8	3,120805
MVA+pLW44/luc	3414	1,46	29,2	116,9178
HASS	89	1,76	35,2	2,528409
HASS+	67	1,61	32,2	2,080745
LUC	67	1,8	36	1,861111
LUC+	67	1,77	35,4	1,892655

\* A captura de fótons foi feita por 3 segundos com o fotomultiplicador de 600V e um ganho de 1. HASS e LUC = m.o.i 1; HASS+ e LUC+ = m.o.i 10.

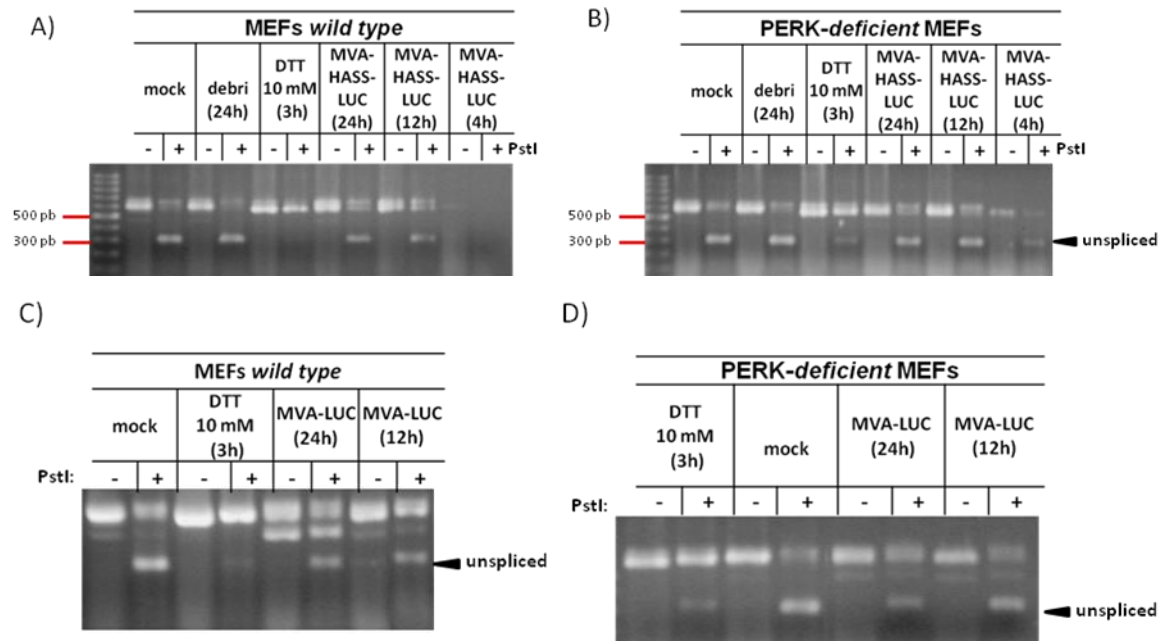


**Figura 25: Representação gráfica dos dados obtidos na análise da atividade enzimática da luciferase em CEFs.** Os extratos celulares foram coletados e as atividades das luciferases determinadas pela captura da luminescência em luminômetro. Os resultados foram normalizados pela razão da atividade da luciferase em relação à quantidade de proteínas por grama de extrato. **pGL3-P**: extrato de células transfectadas com o plasmídeo controle; **Células**: células não infectadas, mock; **HASS**: células infectadas com vírus recombinante expressando luciferase endereçada ao RE com m.o.i 1; **HASS+**: células infectadas com vírus recombinante m.o.i 10; **LUC**: células infectadas com vírus recombinante expressando luciferase sem o peptídeo sinal com m.o.i 1; **LUC+**: células infectadas com vírus recombinante m.o.i 10.

Foi observado uma suposta contaminação no controle celular, no entanto, esse dado não foi confirmado em microscopia de epifluorescência e, provavelmente é um artefato causado por excesso de luminescência no poço adjacente ao do controle celular na placa onde foi realizado o ensaio, devido a super atividade enzimática em células infectadas com MVA e transfectadas com o plasmídeo de transferência pLW44/Luc. A atividade enzimática foi cem vezes maior que a observada no controle pGL3 (TABELA 2). Isso é devido a expressão da proteína a partir do plasmídeo transferência que possui vantagens sobre a expressão genômica.

### **5.7 – Análise do processamento do fator de transcrição XBP-1 durante infecção pelos MVA recombinantes**

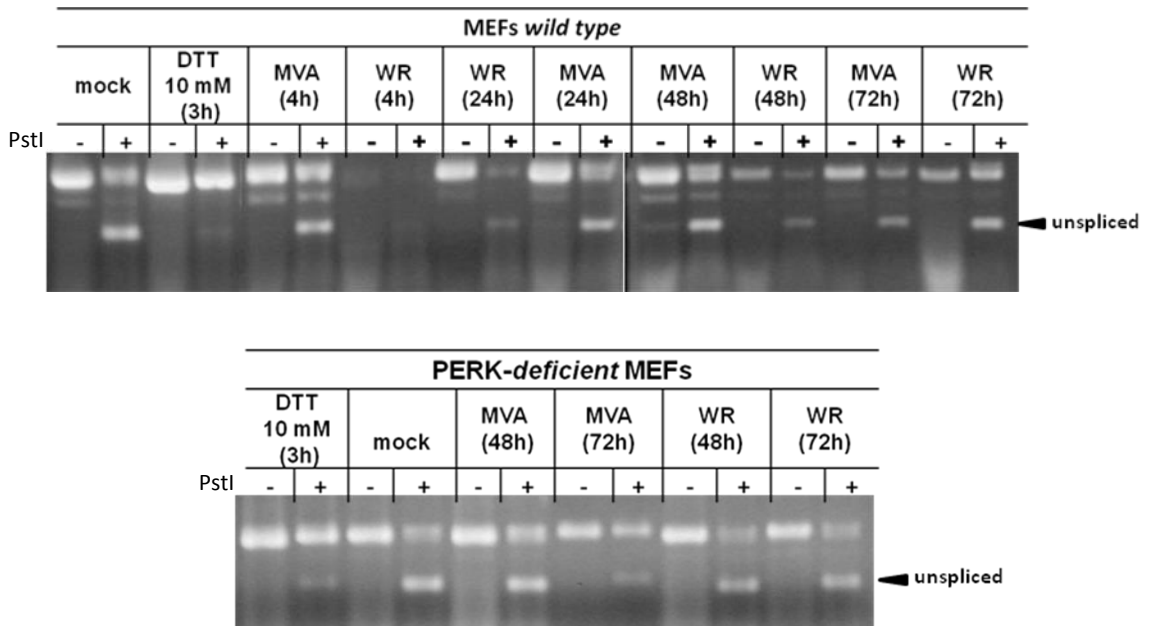
A fim de avaliar a possível ativação do braço IRE1 da via UPR por VACV e a influencia do braço PERK sobre o IRE1, foi investigado o processamento do fator de transcrição XBP-1 das células hospedeiras em diferentes intervalos de tempo após a infecção. Como esperado, o sobrenadante de cultura (debri) não é capaz de gerar uma resposta contra o estresse do RE. Além disso, também não ocorrem grandes alterações nos níveis de XBP-1 processado em células MEFs selvagens ou deficientes para PERK infectadas tanto com o MVA-HASS-LUC quanto com o MVA-LUC em nenhum dos intervalos de infecção avaliados (**FIGURA 27**), indicando, nestes casos, que a resposta ao estresse do retículo não é ativada nestas células. Contrariamente, somente a forma alterada do mRNA (spliced), ocorre nas células tratadas com indutor específico de estresse (DTT).



**Figura 27: Análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição do DNA (PCR-RFLP) de células infectadas com os rMVAs.** Visualização após fracionamento eletroforético em gel de agarose 1,4% e TBE 0,5X dos amplicons após digestão com a enzima de restrição PstI. Em **A** e **C**, perfil de fibroblastos de embrião de camundongo tratados infectados com os vírus recombinantes expressando luciferase endereçada ou não ao RE. Em **B** e **D**, são apresentados os perfis obtidos de fibroblastos de embrião de camundongo PERK deficientes infectados com os vírus recombinantes expressando luciferase endereçada ou não ao RE. **Mock**, controle de células; **DTT**, controle positivo usando o agente indutor de estresse Ditioneitol;

## 5.8 – Análise do processamento do fator de transcrição XBP-1 durante infecção pelos VACVs

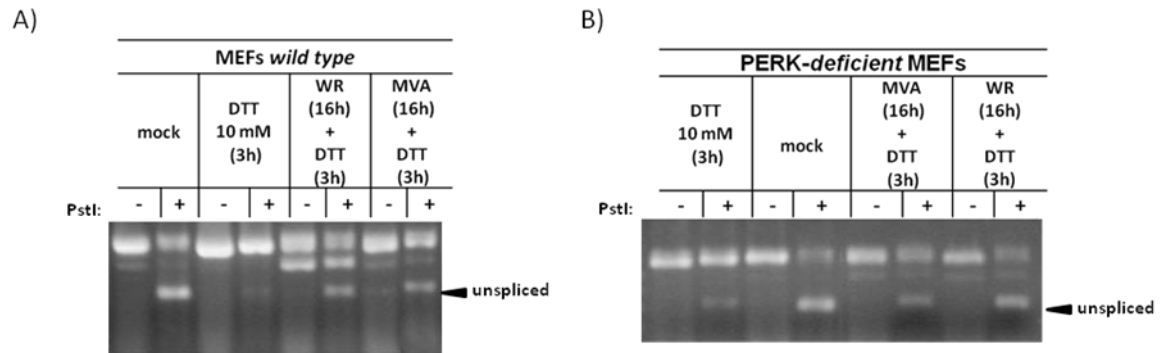
Os resultados dos experimentos prévios sugerem que os MVA recombinantes possuem mecanismos de escape dessa resposta ao estresse do RE. Diante disto, conduzimos experimentos para avaliar se a amostra replicativa VACV-WR, protótipo da família, e o MVA selvagem também seriam capazes de inibir uma resposta de estresse do RE. Como demonstrado na **figura 28**, independente da expressão da proteína heteróloga luciferase, MEFs infectadas com o vírus MVA apresentam o mesmo perfil de processamento do mRNA do fator de transcrição XBP-1 observado durante a infecção com os vírus recombinantes. Nessa mesma figura é demonstrado que semelhante aos vírus MVA, a amostra VACV-WR também não desencadeia o processamento do mRNA de XBP-1 durante o seu ciclo de infecção em fibroblastos selvagens ou PERK deficientes.



**Figura 28:** Análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição do DNA (PCR-RFLP) de células infectadas com diferentes linhagens de VACV. Visualização após fracionamento eletroforético em gel de agarose 1,4% e TBE 0,5X dos amplicons após digestão com a enzima de restrição PstI. Mock, controle de células; DTT, Ditionitrito; WR, Vaccinia Vírus Western Reverse.

## 5.9 – Efeito da infecção por VACV sobre o processamento do fator de transcrição XBP-1

Adicionalmente aos experimentos para investigar o processamento do XBP-1 durante o ciclo de infecção, verificamos a capacidade dos VACV em suprimir o processamento de XBP-1 em células infectadas, mesmo quando essas são tratadas com agentes indutores de estresse. Para isso, MEFs WT e deficientes para PERK foram infectadas com os VACVs (MVA e WR) por um intervalo de 16 horas e tratadas com 10 mM DTT por um período de 3 horas. Como demonstrado na **figura 29**, foi observado que a infecção por VACVs causa inibição do processamento do fator XBP-1 em células tratadas com o agente redutor DTT, que induz significativamente o processamento desse fator de transcrição na ausência de infecção.



**Figura 29: Análise do polimorfismo dos fragmentos de restrição do DNA (PCR-RFLP) de células infectadas com VACV e tratadas com indutor de estresse do RE.** Visualização após fracionamento eletroforético em gel de agarose 1,4% e TBE 0,5X dos amplicons após digestão com a enzima de restrição PstI. Mock, controle de células; DTT, Ditionitrotol; WR, Vaccínia Vírus Western Reverse.

## VI – DISCUSSÃO

O presente estudo teve como principal objetivo investigar a interação do vírus MVA com células hospedeiras principalmente no que tange à via de sinalização UPR. A base racional do objetivo foi a avaliar se a produção excessiva de proteínas recombinantes direcionadas ao retículo endoplasmático, geradas a partir do vetor vacinal, poderia desencadear vias de estresse do RE e afetar negativamente a produção destas proteínas. Para tal, foram gerados MVAs recombinantes expressando a proteína luciferase de vaga-lume endereçada ou não ao RE e, sobre o controle de um promotor forte. A formulação destes diferentes vírus se objetivou, ainda, estabelecer se o endereçamento de proteínas heterólogas para o RE em construções virais seria capaz de ativar ou inibir mecanismos de resposta ao estresse relacionados à via de sinalização UPR.

O sequenciamento dos plasmídios pLW44/Luc e pLW44/HASS-Luc mostrou uma substituição sinônima ocorrida nos nucleotídeos 1364 do clone pLW44 L2.2.3 colônia 3, todavia não altera a função e estrutura do polipeptídeo final, já que o aminoácido incorporado continuou sendo uma arginina. As poucas mutações que ocorreram no clone L1.2.3 colônia 1 podem ser devido a erros de alinhamento e, podem ser corrigidas com a análise de toda a sequência.

A seleção dos vírus recombinante permitiu uma diminuição da competição e forneceu condições ideais para a expansão dos clones virais. A presença do inserto no genoma viral foi confirmada por ensaios de PCR, onde foi possível amplificar um fragmento de DNA correspondente ao gene Luciferase usando diferentes variações da técnica. Em conjunto, os resultados fornecem uma forte evidência da presença do inserto nas amostras de DNA purificados de células infectadas com os vírus recombinantes. Além da confirmação da presença do inserto, foi possível averiguar por meio de RT-PCR que o gene Luc presente no genoma viral, está sendo transcrito e produzindo mRNAs nessas células.

O perfil eletroforetico de extratos protéicos de células infectadas com os vírus recombinantes, mostrou a presença de uma banda de peso molecular similar ao esperado para a proteína Luciferase (~62kDa) e sugere a expressão normal desse polipeptídeo. Não foi possível detectar a proteína Luciferase usando o anticorpo comercial da Promega® (anticorpos policlonais contra a Luciferase de Vagalumes). Os níveis de expressão da proteína Luciferase

foram avaliados por meio de ensaios enzimáticos, onde foi observada a expressão significativa da proteína exógena com níveis comparáveis aos do controle. Em suma, apesar da impossibilidade de detecção da proteína recombinante produzida pelo vetor viral MVA usando anticorpo específico, o conjunto dos dados nos permite concluir que as construções foram corretamente obtidas.

Uma vez obtido os vírus com sucesso, foi avaliado o processamento do fator de transcrição XBP-1, molécula que atua a jusante na cascata de sinalização do principal sensor da via de resposta ao estresse do RE, o IRE1. Este é o membro mais evolutivamente conservado da via UPR, presente em quase todos os eucariotos (exceto protozoários) (HOLLIEN, 2013). Nossos resultados indicam, de forma inequívoca e inédita que a via é modulado pelos rMVAs. Adicionalmente, os resultados mostram que além dos vírus MVA expressando a proteína luciferase, vírus MVA selvagens, bem como VACV-WR são capazes de modular a sinalização via esse sensor mesmo na presença concomitante de um forte indutor de estresse do RE, o DTT. Os VACV assim como todos os poxvírus, são vírus grandes e complexos que possuem diversas proteínas responsáveis por interferir com respostas “antivirais” da célula hospedeira capazes de limitar a replicação viral (PRICE *et al.*, 2013). Como os vírus frequentemente distorcem processos cito-fisiológicos do hospedeiro para seu próprio benefício é possível que os VACVs ativem mecanismos celulares inibidores de IRE1, tais como: hiperfosforilação (RUBIO *et al.*, 2011); mudanças conformacionais (KORENNYKH *et al.* 2011); degradação mediada por sinoviolina (GAO *et al.*, 2008); expressão de BI-1 (LISBONA *et al.*, 2009).

Alternativamente ou concomitantemente, é possível que os VACVs, assim como os CMVs, possuam proteínas que interajam com o sensor e impeça o processamento do fator XBP-1. No entanto, diferente da infecção por CMVs onde ocorre ativação do eixo IRE1/XBP-1 durante os estágios precoces e inibição nos estágios posteriores do ciclo de replicação viral (STAHL *et al.*, 2013), os VACVs não apresentam processamento de XBP-1 em nenhum estágio de infecção, mesmo com altos títulos virais. Esse resultado indica que a inibição logo no início do ciclo de replicação pode ser em função da expressão de genes precoces do VACV.



Futuramente, pretendemos averiguar qual(is) proteína viral é responsável por esse fenótipo e adicionalmente investigar o potencial terapêutico desta(s) nas diversas enfermidades associadas ao estresse do RE.

## VII – CONCLUSÕES

Neste estudo fomos capazes de gerar com sucesso vírus recombinantes, baseados na plataforma MVA, expressando a proteína Luciferase de Vaga-lume endereçadas ou não ao RE. Apesar de não termos conseguido detectar a proteína com o uso do anticorpo anti-luciferase comercial, o conjunto dos dados, incluindo a detecção do mRNA para a proteína recombinante e também da atividade de Luciferase em células infectadas pelos vetores, nos permite ser assertivos em relação ao sucesso da obtenção das referidas construções.

Ademais, nossos resultados demonstram que a infecção por rMVA expressando proteínas heterólogas, independente do endereçamento destas ao RE, não desencadeiam ativação da via de resposta ao estresse do RE, UPR, em particular o braço IRE1/XBP-1. O mesmo pode ser dito para MVA selvagens e outros VACV (como o Western Reverse - WR). Além de não apresentar o braço IRE1/XBP-1 ativado, células infectadas por esses vírus são capazes de impedir o processamento do fator XBP-1 em condições de estresse. Embora tenham sido hipotetizados mecanismos de evasão de respostas ao estresse celular, os VACV nunca foram testados nesse contexto e o nosso estudo é o primeiro a demonstrar esse fenótipo.

Investigações adicionais são necessárias para elucidar o mecanismo pelo qual os vírus interferem com essa sinalização e compreender todo impacto que o ciclo de infecção dos VACV causa sobre a ativação dessas vias e vice e versa.

## VIII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS A. K.; LICHTMAN A. H. **Cellular and Molecular Immunology**. Londres: Elsevier, 2008.

ABRAHÃO, J. S.; GUEDES, M. I. M.; TRINDADE, G. S.; DA FONSECA, F. G.; CAMPOS, R. K.; MOTA, B. F.; LOBATO, Z. I. P.; SILVA-FERNANDES, A. T.; RODRIGUES, G. O. L.; LIMA, L. S.; FERREIRA, P. C. P.; BONJARDIM, C. A.; KROON, E. G. One More Piece in the VACV Ecological Puzzle: Could Peridomestic Rodents Be the Link between Wildlife and Bovine Vaccinia Outbreaks in Brazil?. **Plos One**, v. 4, p. e7428, 2009.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J. *et al.* **Molecular biology of the cell**. 4<sup>th</sup> edition. New York: Garland Science, 2002.

ANTOINE, G.; SCHEIFLINGER, F.; DORNER, F.; FALKNER, F. G. The Complete Genomic Sequence of the Modified Vaccinia Ankara Strain: Comparison with Other Orthopoxviruses. **Virology**, 244. p. 365-396. March, 1998.

AUSUBEL, F. M.; BRENT, R.; KINGSTON, R. E. *et al.* (Eds). **Currents Protocols in Moleculas Biology**. John Wiley & Sons, Ringbou edition, 2003.

BARRY, G; FRAGKLOUDIS, R; FERGUSON, M. C; LULLA, A; MERITS, A; KOHL, A; FAZAKERLEY, J. K. Semliki Forest Virus-Induced Endoplasmic Reticulum Stress Accelerates Apoptotic Death of Mammalian Cells. **J. Virol.** July, vol. 84 no. 14 7369-7377, 2010.

BERNALES, S; PAPA, F. R; WALTER, P. Intracellular signaling by the unfolded protein response. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v.22, p.487-508. 2006.

BHAUMIK, S.; GAMBHIR, S. S.; Optical imaging of Renilla luciferase reporter gene expression in living mice. **PNAS**. v. 99, n. 1, pp. 377-382, 2002.

BORSA, M. Avaliação da ativação da via UPR (*Unfolded Protein Response*) em células de indivíduos HIV positivos sob diferentes esquemas terapêuticos. 2012. 86f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Biociências) – Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis. 2012.

BURIKHANOV, R; ZHAO, Y; GOSWAMI, A; QIU, S; SCHWARZE, S. R; RANGNEKAR, V. M. The tumor suppressor Par-4 activates an extrinsic pathway for apoptosis. **Cell**. Jul 23;138(2):377-88, 2009.

BURNETT, H. F; AUDAS, T. E; LIANG, G; LU, R. R. Herpes simplex virus-1 disarms the unfolded protein response in the early stages of infection. **Cell Stress Chaperones**. Jul;17(4):473-83, 2012.

CALFON, M., ZENG, H., URANO, F., TILL, J.H., HUBBARD, S.R., HARDING, H.P., CLARK, S.G. and RON, D. IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. **Nature**, 415, 92-96. 2002

- CHIAM, R.; EMMA, S.; MAAN, S. *et al.* Induction of Antibody Responses to African Horse Sickness Virus (AHSV) in Ponies after Vaccination with Recombinant Modified Vaccinia Ankara (MVA). **PLoS ONE**. v. 4, June, 2009.
- CONTI, E.; FRANKS, N.P.; BRICK, P. Crystal structure of firefly luciferase throws light on a superfamily of adenylate-forming enzymes. **Structure**, v. 4, n. 3, 287-298, 1996.
- COX, J. S; WALTER, P. A novel mechanism for regulating activity of a transcription factor that controls the unfolded protein response. **Cell**. Nov 1;87(3):391-404, 1996.
- DA FONSECA, F. G.; KROON, E. G.; NOGUEIRA, M. L.; DE SOUZA TRINDADE, G. Zoonotic vaccinia virus outbreaks in Brazil. **Future Virology**, v. 6, p. 697-707, 2011.
- DAMON, I. K. Poxviruses. In: KNIPE, D. M. (Ed.) *et al.* **Fields Virology**. Fifth Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, 2007. cap. 75, p. 2947-2996.
- DE ANDRADE, B. P.; GAZZINELLI, R. T.; DEL VAL, M.; BRUNA-ROMERO, O. Protective immunization against murine cytomegalovirus infection using adenoviruses and poxviruses expressing hepatitis B virus chimeras. **International Microbiology**. v. 10, pp. 261-269, 2007.
- DE SILVA, F.S.; LEWIS, W.; BERGLUND, P.; KOONIN, E.V.; MOSS, B. Poxvirus DNA primase. **Proc Natl Acad Sci U S A.**;104(47):18724-9, 2007.
- DE WET, J.R.; WOOD, K.V.; DE LUCA, M.; HELINSKI, D.R.; SUBRAMANI, S. Firefly Luciferase Gene: Structure and Expression in Mammalian Cells. **Molecular and Cellular Biology**, v. 7, n. 2, 725-737, 1987.
- DELALOYE, J.; ROGER, T.; STEINER-TARDIVEL, Q-G. *et al.* Innate Immune Sensing of Modified Vaccinia Virus Ankara (MVA) Is Mediated by TLR2-TLR6, MDA-5 and the NALP3 Inflammasome. **PLoS Pathogens**. Jun. 2009.
- DENG, J; LU, PD; ZHANG, Y; SCHEUNER, D; KAUFMAN, RJ; SONENBERG, N; HARDING, HP; RON, D. Translational repression mediates activation of nuclear factor kappa B by phosphorylated translation initiation factor 2. **Molecular and Cellular Biology** 24: 10161–10168. 2004.
- DREXLER, I.; STAIB, C.; SUTTER, G. Modified Vaccinia virus Ankara as antigen delivery system: how can we best use its potential? **Current opinion in Biotechnology**, v. 15, n. 6, p. 506-512, October 2004.
- EARL, P. L.; COTTER, C.; MOSS, B. *et al.* Design and evaluation of multi-gene, multi-clade HIV-1 MVA vaccines. **Vaccine**, v. 27, n. 42, p. 5885-5895, May 2009.
- ERTL, H. Novel Vaccines to Human Rabies. **PLoS Negl. Trop. Dis.** v. 3, i. 9. e515, September 2009.
- FERGUSON, B. J.; MANSUR, D. S. ; PETERS, N. E. ; REN, H. ; Smith, G. L. . DNA-PK is a DNA sensor for IRF-3-dependent innate immunity. **eLife**, v. 1, p. e00047-e00047, 2012.

FINBERG R. W.; WANG J. P.; KURT-JONES E. A. Toll like receptors and viruses. **Rev Med Virol.** v.17, n.1, p.35-43, 2007

GALINDO, I; HERNÁEZ, B; MUÑOZ-MORENO, R; CUESTA-GEIJO, M. A; DALMAU-MENA, I; ALONSO, C. The ATF6 branch of unfolded protein response and apoptosis are activated to promote African swine fever virus infection. **Cell Death Dis.** Jul 5; 3:e341, 2012.

GAO, B.; LEE, S.M.; CHEN, A.; ZHANG, J.; ZHANG, D. D.; KANNAN, K.; ORTMANN, R. A.; FANG, D. Synoviolin promotes IRE1 ubiquitination and degradation in synovial fibroblasts from mice with collagen-induced arthritis. **EMBO Rep** 9: 480–485, 2008.

GARBER, D. A.; O'MARA, L. A.; ZHAO, J. *et al.* Expanding the Repertoire of Modified Vaccinia Ankara-Based Vaccine Vectors via Genetic Complementation Strategies. **PLoS ONE.** v. 4, May., 2009.

GARCÍA, M. A.; GIL, J.; VENTOSO, I.; GUERRA, S.; DOMINGO, E.; RIVAS, C.; ESTEBAN, M. Impact of Protein Kinase PKR in Cell Biology: from Antiviral to Antiproliferative Action. **Microbiology and Molecular Biology Reviews.** v. 70, n. 4, pp. 1032-1060, 2006.

GARCÍA, M. A.; MEURS, E. F.; ESTEBAN, M. The dsRNA protein kinase PKR: Virus and cell control. **Biochimie.** 89:799-811, 2007.

GARDNER, B. M; WALTER, P. Unfolded proteins are Ire1-activating ligands that directly induce the unfolded protein response. **Science** 333: 1891-1894, 2011.

GEIBEN-LYNN, R.; GREENLAND, J. R.; FRIMPONG-BOATENG, K. *et al.* Kinetics of Recombinant Adenovirus Type 5, Vaccinia Virus, Modified Vaccinia Ankara Virus, and DNA Antigen Expression In Vivo and the Induction of Memory T-Lymphocyte Responses. **Clin. Vaccine Immunol.** v. 15, n. 4, pp. 691-696. April, 2008.

GOLDSBY, R. A.; KINDT, T. J.; OSBORNE, B. A.; KUBY, J. **Immunology.** 5<sup>th</sup> ed. NY: W.H. Freeman & Co, 2002.

GRANDPRE, L. E.; DUKE-COHAN, J. S.; EWALD, B. A.; DEVOY, C.; BAROUCH, D. H.; LETVIN, N. L.; REINHERZ, E. L.; BADEN, L. R.; DOLIN, R.; SEAMAN, M. S. Immunogenicity of recombinant Modified Vaccinia Ankara following a single or multi-dose vaccine regimen in rhesus monkeys. **Vaccine.** 27:1549-56, 2009.

GREINER, S.; HUMRICH, J. Y.; THUMAN, P.; SAUTER, B.; SCHULER, G.; JENNE, L. The highly attenuated vaccinia virus strain modified virus Ankara induces apoptosis in melanoma cells and allows bystander dendritic cells to generate a potent antitumoral immunity. **Clin Exp Immunol.** 146:344-353, 2006.

GUDMUNDSDOTTER, L.; NILSSON, C.; BRAVE, A. *et al.* Recombinant Modified Vaccinia Ankara (MVA) effectively boosts DNA-primed HIV-specific immune responses in humans despite pre-existing vaccinia immunity. **Vaccine,** v. 27, n. 33, p. 4468-4474, May 2009.

GUERRA, S.; LÓPEZ-FERNÁNDEZ, L. A.; CONDE, R.; PASCUAL-MONTANO, A.; HARSHMAN, K.; ESTEBAN, M. Microarray Analysis Reveals Characteristic Changes of

Host Cell Gene Expression in Response to Attenuated Modified Vaccinia Virus Ankara Infection of Human HeLa Cells. *Journal of Virology*. v. 78, n. 11, pp. 5820-5834, 2004.

HARDING, H.P.; ZHANG, Y.; BERTOLOTTI, A.; ZENG, H.; RON, D. Perk Is Essential for Translational Regulation and Cell Survival during the Unfolded Protein Response. *Molecular Cell*, v. 5, n. 5, 897-904, 2000.

HARDING, H. P.; ZHANG, Y.; RON, D. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature*, 397, 271-274. 1999.

HE, B. Viruses, endoplasmic reticulum stress, and interferon responses. *Cell Death and Differentiation*. 13:393-403, 2006.

HETZ, C; GLIMCHER, L. H. Fine-Tuning of the Unfolded Protein Response: Assembling the IRE1a Interactome. *Mol Cell*, 34: 1–11. 2009.

HETZ, C; MARTINO, F; RODRIGUEZ, D; GLIMCHER, L. H. The Unfolded Protein Response: Integrating stress signals through the stress sensor IRE1 $\alpha$ . *Physiological Reviews*. 91:1219-43, 2011.

HINTHONG, O.; JIN, X.; SHISLER, J. Characterization of wild-type and mutant vaccinia virus M2L proteins' abilities to localize to the endoplasmic reticulum and to inhibit NF- $\kappa$ B activation during infection. *Virology*. 373(2): 248-262, 2008.

HINNEBUSCH, A.G. The eIF-2 $\alpha$  kinases: regulators of protein synthesis in starvation and stress. *Seminars in Cell Biology*, v. 5, n. 6, 417-426, 1994.

HOOPER, P. L; HIGHTOWER, L. E; HOOPER, P. L. Loss of stress response as a consequence of viral infection: implications for disease and therapy. *Cell Stress Chaperones*; v.17(6):647-55, 2012.

HOLLIEN, J. Evolution of the unfolded protein response. *Biochim Biophys Acta*.;1833(11):2458-63, 2013.

HOSOI, T.; OSAWA, K. Endoplasmic reticulum stress in disease: mechanisms and therapeutic opportunities. *Clinical Science*. 118: 19-29, 2010.

HU, W.; HOFSTETTER, W.; GUO, W.; LI, H.; PATAER, A.; PENG, H. H.; GUO, Z. S.; BARTLET, D. L.; LIN, A.; SWISHER, S. G.; FANG, B. JNK-deficiency enhanced oncolytic vaccinia virus replication and blocked activation of double-stranded RNA-dependent protein kinase. *Cancer Gene Therapy*. 15:616-624, 2008.

HUSSAIN, S. G.; RAMAIAH, K. V. A. Endoplasmic reticulum: Stress, signalling and apoptosis. *CURRENT SCIENCE*. v. 93, n. 12, pp. 1684-1696, 2007.

HUTCHINGS, C. L.; BIRKETT, A. J.; MOORE, A. C. *et al.* Combination of Protein and Viral Vaccines Induces Potent Cellular and Humoral Immune Responses and Enhanced Protection from Murine Malaria Challenge. *Infection and Immunity*. v. 75, n. 12, pp. 5819–5826. Dec. 2007.

JACKSON, R. J.; HELLEN, C. U. T.; PESTOVA, T. V. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Molecular Cell Biology*. v. 10, pp. 113-127, Feb., 2010.

JINDAL, S; YOUNG, R. A. Vaccinia virus infection induces a stress response that leads to association of Hsp70 with viral proteins. *J Virol*. Sep;66(9):5357-62, 1992.

KATSAFANAS, G. C.; MOSS, B. Linkage of Transcription and Translation within Cytoplasmic Poxvirus DNA Factories Provides a Mechanism to Coordinate Viral and Usurp Host Functions. *Cell Host Microbe*. 2(4): 221–228, oct., 2007.

KORENNYKH, A. V; EGEEA, P.F; KOROSTELEV, A. A; FINER-MOORE, J; STROUD, R. M; ZHANG, C; SHOKAT, K. M; WALTER, P. Cofactor-mediated conformational control in the bifunctional kinase/RNase Ire1. *BMC Biol*. V. 9(48), 2011.

KORENNYKH, A.; KOROSTELEV, A. A.; EGEEA, P. F.; FINER-MOORE, J.; STROUD, R. M.; ZHANG, C.; SHOKAT, K. M.; WALTER, P. Structural and functional basis for RNA cleavage by Ire1. *BMC Biology*, v. 9(48), 2011.

KREIJTZ, J. H. C. M.; SUEZER, Y.; DE MUTSERT, G. *et al.* Preclinical evaluation of a modified vaccinia virus Ankara (MVA)-based vaccine against influenza A/H5N1 viruses. *Vaccine*, v. 27, n. 33, p. 4468-4474, May 2009.

LANGLAND, J. O.; JACOBS, B. L. The Role of the PKR-Inhibitory Genes, E3L and K3L, in Determining Vaccinia Virus Host Range. *Virology*. 299: 133-141, 2002.

LEFKOWITZ, E.J.; WANG, C.; UPTON, C. Poxviruses: past, present and future. *Virus Res*, v.117, n.1, p. 105-118, 2006

LEHMANN, M. H.; KASTENMULLER, W.; KANDEMIR, J. D. *et al.* Modified Vaccinia virus Ankara Triggers Chemotaxis of Monocytes and Early Respiratory Immigration of Leukocytes by Induction of CCL2 Expression. *Journal of Virology*. v. 83, n. 6, pp. 2540-2552. Mar., 2009.

LEE, Y. H; GIRAUD, J; DAVIS, R. J; WHITE, M. F. c-Jun N-terminal kinase (JNK) mediates feedback inhibition of the insulin signaling cascade. *Journal Biological Chemistry* 278: 2896-2902. 2003.

LEE, D. Y.; LEE, K.; LEE, H. J.; KIM, D. H.; NOH, Y. H.; YU, K.; JUNG, H.; LEE, S. A.; LEE, J. Y.; YOUN, Y. C.; JEONG, Y.; KIM, D. A.; LEE, W. B.; KIM, S. S. Activation of PERK Signaling Attenuates Ab-Mediated ER Stress. *PLoS ONE*. v. 5, i. 5, 2010.

LEE, D. Y.; SUGDEN, B. The LMP1 oncogene of EBV activates PERK and the unfolded protein response to drive its own synthesis. *Blood*, 111(4), p. 2280-9, 2008.

LEI, K.; DAVIS, R. J. JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proc Natl Acad Sci*. 100: 2432–2437, 2003.

- LI, J.; NI, M.; LEE, B.; BARRON, E.; HINTON, D. R.; LEE, A. S. The unfolded protein response regulator GRP78/BiP is required for endoplasmic reticulum integrity and stress-induced autophagy in mammalian cells. *Cell Death and Differentiation*. 15: 1460-1471, 2008.
- LI, P.; WANG, N.; ZHOU, D. et al. Disruption of MHC Class II-Restricted Antigen Presentation by Vaccinia Virus. *The Journal of Immunology*. 2005.
- LISBONA, F.; ROJAS-RIVERA, D.; THIELEN, P.; ZAMORANO, S.; TODD, D.; MARTINON, F.; GLAVIC, A.; KRESS, C.; LIN, J. H.; WALTER, P.; REED, J. C.; GLIMCHER, L. H.; HETZ, C. BAX Inhibitor-1 Is a Negative Regulator of the ER Stress Sensor IRE1 $\alpha$ . *Molecular Cell*, v. 33, Issue 6, pp. 679-691, 2009.
- LIN, J. H.; LI, H.; ZHANG, Y.; RON, D.; WALTER, P. Divergent Effects of PERK and IRE1 Signaling on Cell Viability. *PLoS ONE*. v. 4, i. 1, 2009.
- LYNCH, H. E.; RAY, C. A.; OIE, K. L.; POLLARA, J. J.; PETTY, I. T. D.; SADLER, A. J.; WILLIAMS, B. R. G.; PICKUP, D. J. Modified vaccinia virus Ankara can activate NF- $\kappa$ B transcription factors through a double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR)-dependent pathway during the early phase of virus replication. *Virology*. 391(2): 177-186, 2009.
- MACKETT, M.; SMITH, G. L. Vaccinia Virus Expression Vectors. *J. gen. Virol.* v. 67, pp. 2067-2082. 1986.
- MANCHE, L.; GREEN, S.R.; SCHMEDT, C.; MATHEWS, M.B. Interactions between Double-Stranded RNA Regulators and the Protein Kinase DAI. *Molecular and Cellular Biology*, v. 12, n. 11, 5238-5248, 1992.
- MARICINIAK, S.J.; RON, D. Endoplasmic Stress Signaling in Disease. *Physiological Reviews*, v. 86, n. 4, 1133-1149, 2006
- MARTINEZ, J.; HUANG, X.; YANG, Y. Toll-like receptor 8-mediated activation of murine plasmacytoid dendritic cells by vaccinia viral DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v. 107, pp. 6442-6447. April, 2010.
- McFADDEN, G. Poxvirus Tropism. *Nature Reviews, Microbiology*, v. 3, n. 3, 201-213, 2005.
- MEN, R.; WYATT, L.; TOKIMATSU, I. et al. Immunization of rhesus monkey with a recombinant of modified vaccinia virus Ankara expressing a truncated envelope glycoprotein of dengue type 2 virus induced resistance to dengue type 2 virus challenge. *Vaccine*, v. 18, n. 27, p. 3113-3122, July 2000.
- MERCER, J.; KNÉBEL, S.; SCHMIDT, F. I. et al. Vaccinia virus strains use distinct forms of macropinocytosis for host-cell entry. *PNAS*. v. 107, n. 20, p. 9346-9351, May 2010.
- MEYER, H.; SUTTER, G.; MAYR, A. Mapping of deletions in the genome of the highly attenuated vaccinia virus MVA and their influence on virulence. *Journal of General Virology*, v. 72, n. 5, p. 1031-1038. May 1991.
- MOGENSEN, T. H. Pathogen Recognition and Inflammatory Signaling in Innate Immune Defenses. *Clinical Microbiology Reviews*. v. 22, n. 2, pp. 240-273. Apr., 2009.



MORI, K. Signaling pathways in the unfolded protein response: development from yeast to mammals. **J Biochem.** 146(6):743-50. 2009.

MORI, K; KAWAHARA T. *et al.* Signalling from endoplasmic reticulum to nucleus: transcription factor with a basic-leucine zipper motif is required for the unfolded protein-response pathway. *Genes Cells*, v.1, n.9, Sep, p.803-17. 1996.

MOSS, B. *Poxviridae: The Viruses and their Replication* In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Eds). **Fields Virology**. Fifth Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, 2007. cap. 74, p. 2905-2946.

MOSS, B. Vaccinia Virus and Other Poxviruses as Live Vectors In: LEVINE, M. M. *et al.* **New Generation Vaccines**. Fourth Edition. Informa Healthcare, New York, 2010. cap. 33, p. 340-351.

MURPHY, F. A.; GIBBS, E. P. J.; STUDDERT, M. J.; HORZINEK, M. C. **Veterinary Virology**. Third Edition. San Diego: Academic Press, 1999.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiología Médica**. Quinta Edición, Madrid: Elsevier, 2006. cap. 55, p. 565-571.

MYSKIW, C.; ARSENIO, J.; BOOY, E. P.; HAMMET, C.; DESCHAMBAULT, Y.; GIBSON, S. B.; CAO, J. RNA species generated in vaccinia virus infected cells activate cell type-specific MDA5 or RIG-I dependent interferon gene transcription and PKR dependent apoptosis. **Virology**. 413: 183-193, 2011.

NAKAGAWA, T., ZHU, H., MORISHIMA, N., LI, E., XU, J., YANKNER, B.A. and YUAN, J. Caspase-12 mediates endoplasmic-reticulum-specific apoptosis and cytotoxicity by amyloid-beta. **Nature**, 403, 98-103. 2000.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. 4<sup>th</sup> ed. NY: W. H. Freeman & Co, 2005.

NISHITOH, H. CHOP is a multifunctional transcription factor in the ER stress response. **J Biochem.** 151 (3): 217-219. 2012.

NÖRDER, M.; BECKER, P. D.; DREXLER, I.; LINK, C.; ERFLE, V.; GUZMÁN, C. A. Modified Vaccinia virus Ankara Exerts Potent Immune Modulatory Activities in a Murine Model. **PLoS ONE**. v. 5, June, 2010.

OBER, B. T.; BRÜHL, P.; SCHMIDT, M. *et al.* Immunogenicity and Safety of Defective Vaccinia Virus Lister: Comparison with Modified Vaccinia Virus Ankara. **Journal of Virology**. v. 76, n. 15, pp. 7713-7723. Aug. 2002.

OYADOMARI, S; MORI, M. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. **Cell Death Differ.** Apr;11(4):381-9. 2004.

OURMANOV, I.; KUWATA, T.; GOEKEN, R. Improved Survival in Rhesus Macaques Immunized with Modified Vaccinia Virus Ankara Recombinants Expressing Simian Immunodeficiency Virus Envelope Correlates with Reduction in Memory CD4<sup>+</sup> T-Cell Loss

and Higher Titers of Neutralizing Antibody. **Journal of Virology**. v. 83, n. 11, pp. 5388-5400. June 2009.

PASQUAL, G; BURRI, D. J; PASQUATO, A; DE LA TORRE, J. C; KUNZ, S. Role of the host cell's unfolded protein response in arenavirus infection. **J Virol**. Feb;85(4):1662-70, 2011.

PATIL, S. D.; RHODES, D. G.; BURGESS, D. J. DNA-based Therapeutics and DNA Delivery Systems: A Comprehensive Review. **The AAPS Journal**. v. 7, a. 9, pp.61-77. 2005.

PETERS, N. E., FERGUSON, B. J., MAZZON, M., FAHY, A. S., KRYSZTOFINSKA, E., ARRIBAS-BOSACOMA, R., PEARL, L. H., REN, H.; SMITH, G. L. A mechanism for the inhibition of DNA-PK-mediated DNA sensing by vaccinia virus. **PLoS Pathog** 8. 2013.

PEÑA, J; HARRIS, E. Early Dengue Virus Protein Synthesis Induces Extensive Rearrangement of the Endoplasmic Reticulum Independent of the UPR and SREBP-2 Pathway. **PLoS ONE** 7(6): e38202, 2012.

PER'ERY & MATHEW. Viral Conquest of the Host Cell. In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Eds). **Fields Virology**. Fifth Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, 2007. cap. 7, p. 170-209.

PRESCOTT, L. M.; HARLEY, J. P.; KLEIN, D. A. **Microbiology**. 5<sup>th</sup> ed. McGraw-Hill Science, 2002.

PRICE, P. J. R.; TORRES-DOMÍNGUEZ, L. E.; BRANDMÜLLER, C.; SUTTER, G.; LEHMANN, M. H. Modified Vaccinia virus Ankara: Innate immune activation and induction of cellular signalling. **Vaccine**, v. 31, p. 4231– 4234, 2013

PRIEUR. E.; GILBERT, S. A.; SCHNEIDER, J. *et al.* A Plasmodium falciparum candidate vaccine based on a six-antigen polyprotein encoded by recombinant poxviruses. **PNAS**. v. 101, n. 1, pp 290-295. Jan. 2004.

RAMIREZ, J. C. GHERARDI, M. ESTEBAN, M. Biology of Attenuated Modified Vaccinia Virus Ankara Recombinant Vector in Mice: Virus Fate and Activation of B- and T-Cell Immune Responses in Comparison with the Western Reverse Strain and Advantages as a Vaccine. **Journal of Virology**. v. 74, n. 2, p.923-932. Jan. 2000.

RASHEVA, V. A.; DOMINGOS, P. M.; Cellular responses to endoplasmic reticulum stress and apoptosis. **Apoptosis**. 14: 996-1007, 2009.

RICHARDSON, J. S.; YAO, M. K.; TRAN, K. N. *et al.* Enhanced Protection against Ebola Virus Mediated by an Improved Adenovirus-Based Vaccine. **PLoS ONE**. v. 4, April, 2009.

ROCHA, Carolina Damas *et al.* Recombinant viruses as tools to induce protective cellular immunity against infectious diseases. **International Microbiology**, v. 7, n. 2, p.83-94, June 2004.

RODRIGUEZ, D; ZAMORANO, S; LISBONA, F; ROJAS, D; CUBILLOS-RUIZ, J; ARMISEN, R; HENRIQUEZ, D; URRRA, H; CHENG, E; LETEK, M; VAISAR, T;

IRRAZABAL, T; GONZALEZ-BILLAULT, C; LETAI, A; PIMENTEL-MUIÑOS, F; KROEMER, G; HETZ, C. BH3-only proteins are part of a regulatory network that control the sustained signaling of the Unfolded Protein Response sensor IRE1. **EMBO J.** 31(10):2322-35, 2012.

RON, D; WALTER, P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.8, n.7, Jul, p.519-29. 2007.

RUTKOWSKI, D. T.; ARNOLD, S. M.; MILLER, C. N.; WU, J.; LI, J.; GUNNISON, K. M.; MORI, K.; AKHA, A. A. S.; RADEN, D.; KAUFMAN, R. J. Adaptation to ER Stress Is Mediated by Differential Stabilities of Pro-Survival and Pro-Apoptotic mRNAs and Proteins. **PLoS Biology**. v. 4, i. 11, 2006.

RUTKOWSKI, D. T.; KAUFMAN, R.J. A trip to the ER: coping with stress. **Trends Cell Biol** v.14, p. 20-28, 2004.

SCHEUNER, D; KAUFMAN, R. J. The unfolded protein response: a pathway that links insulin demand with beta-cell failure and diabetes. **Endocr Rev.** May;29(3):317-33, 2008.

SCHRÖDER, M.; KAUFMAN, R. J. Divergent Roles of IRE1 $\alpha$  and PERK in the Unfolded Protein Response. *Current Molecular Medicine*. 6, 5-36, 2006.

SCHNIERLE, B. S.; SUEZER, Y.; SUTTER, G. Recombinant poxivirus vaccines in biomedical research. In: MERCER, A. A.; SCHMIDT, A.; WEBER, O. (Eds.). **Poxviruses**. Basel: Birkhäuser Verlag, 2007. cap. 15, p. 311-328.

SHERF, B.A; WOOD, K.V. Firefly luciferase engineered for improved genetic reporting. *Promega Notes* 49, 14–21, 1994

SHEN, J; SNAPP, E. L; LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J; PRYWES, R. Stable Binding of ATF6 to BiP in the Endoplasmic Reticulum Stress Response. **Mol Cell Biol.** Feb; 25(3):921-32. 2005

SHEN, Y.; POST, L. Viral Vectors and Their Applications In: KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. M. (Eds). **Fields Virology**. Fifth Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, USA, 2007. cap. 16, p. 540-565.

STAHL S, BURKHART JM, HINTE F, TIROSH B, MOHR H.; ZAHEDI, R. P.; SICKMANN, A.; RUSZICS, Z.; BUDT, M.; BRUNE, W. Cytomegalovirus Downregulates IRE1 to Repress the Unfolded Protein Response. **PLoS Pathog** 9(8): e1003544, 2013.

SUNG, S. C; CHAO, C. Y; JENG, K. S; YANG, J. Y; LAI, M. M. The 8ab protein of SARS-CoV is a luminal ER membrane-associated protein and induces the activation of ATF6. **Virology**. May 10;387(2):402-13, 2009.

SUTTER, G.; MOSS, B. Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 89, pp. 10847-10851. November, 1992.

SUZUKI, T.; USUDA, S.; ICHINOSE, H.; INOUE, S. Real-time bioluminescence imaging of a protein secretory pathway in living mammalian cells using *Gaussia* luciferase. **FEBS Letters**. 581: 4551-4556, 2007.

SMITH, G. L. Genus Orthopoxvirus: Vaccinia Virus. In: MERCER, A. A.; SCHMIDT, A.; WEBER, O. (Eds.). **Poxviruses**. Basel: Birkhäuser Verlag, 2007. cap. 1, p. 1-46.

SMITH, G. L.; BENFIELD, C. T. O.; MALUQUER DE MONTES, C.; MAZZON, M.; EMBER, S. W. J.; FERGUSON, B. J.; SUMNER, R. P. Vaccinia virus immune evasion: mechanisms, virulence and immunogenicity. **J Gen Virol**. Vol. 94, pp. 2367-2392, Nov. 2013.

TABAS, I; RON, D. Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. **Nat Cell Biol**. Mar;13(3):184-90. 2011

TAM, B. A.; MERCADO, E. L.; HOFFMANN, A.; NIWA, M. ER Stress Activates NF- $\kappa$ B by Integrating Functions of Basal IKK Activity, IRE1 and PERK. **Plos One**, 7(10), p. e45078, 2012.

TAKAYANAGI, S; FUKUDA, R; TAKEUCHI, Y; TSUKADA, S; YOSHIDA, K. Gene regulatory network of unfolded protein response genes in endoplasmic reticulum stress. **Cell Stress Chaperones**. Jan;18(1):11-23. 2013.

TCHILIAN, E. Z.; DESEL, C.; FORBES, E. K. *et al.* Immunogenicity and Protective Efficacy of Prime-Boost Regimens with Recombinant  $\Delta$ ureC *hly*<sup>+</sup> *Mycobacterium bovis* BCG and Modified Vaccinia Virus Ankara Expressing *M. tuberculosis* Antigen 85A against Murine Tuberculosis. **Infection and Immunity**. v. 77, n. 2, p. 622-631. Feb. 2009.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8<sup>a</sup> edição. Porto Alegre: Artmed, 2005.

TRINDADE, G.; GUEDES, M. ; DRUMOND, B.; MOTA, B.; ABRAHÃO, J.; LOBATO, Z.; GOMES, J.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; NOGUEIRA, M.; KROON, E.; DA FONSECA, F. Zoonotic Vaccinia Virus: Clinical and Immunological Characteristics in a Naturally Infected Patient. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, p. e37-e40, 2009.

UNTERHOLZNER, L.; BOWIE, A. G. The interplay between viruses and innate immune signaling: Recent insights and therapeutic opportunities. **Biochemical Pharmacology**. 75:589-602, 2008.

VERSTEEG, G. A; VAN DE NES, P. S; BREDENBEEK, P. J; SPAAN, W. J. M. The Coronavirus Spike Protein Induces Endoplasmic Reticulum Stress and Upregulation of Intracellular Chemokine mRNA Concentrations. **J Virol.** Oct; 81(20): 10981–10990, 2007.

WALTER, P; RON, D. The unfolded protein response: from stress pathway to homeostatic regulation. **Science.** Nov. 334: 1081–1086. 2011.

WANG, X; OLBERDING, K. E; WHITE, C; LI, C. Bcl-2 proteins regulate ER membrane permeability to luminal proteins during ER stress-induced apoptosis. **Cell Death Differ.** Jan; 18(1): 38–47, 2011.

WEYER, J.; RUPPRECHT, C.E.; NEL, L.H. Poxvirus-vectores vaccines for rabies – A review. **Vaccine**, v. 27, n. 21, pp. 7198-7201, 2009.

WILLIAMS, B.R.G. PKR; a sentinel kinase for cellular stress. **Oncogene**, v. 18, n. 45, 6112-6120, 1999.

WILLIAMS, B.R.G. Signal Integration via PKR. **Science STKE**, v. 89, re. 2, 1-10, 2001.

WILLIS, K. L.; LANGLAND, J. O.; SHISLER, J. L. Viral Double-stranded RNAs from Vaccinia Virus Early or Intermediate Gene Transcripts Possess PKR Activating Function, Resulting in NF-κB Activation, When the K1 Protein Is Absent or Mutated. **The Journal of Biological Chemistry.** v. 286, n. 10, pp. 7765-7778, 2011.

WILKINS, C.; GALE Jr, M. Recognition of viruses by cytoplasmic sensors. **Current Opinion in Immunology.** 22:41-47, 2010.

WOEHLBIER, U; HETZ, C. Modulating stress responses by the UPRosome: a matter of life and death. **Trends Biochem Sci.** 36(6):329-37. 2011.

WYATT, L. S.; EARL, P. L.; VOGT, J. *et al.* Correlation of immunogenicities and in vitro expression levels of recombinant modified vaccinia virus Ankara HIV vaccines. **Vaccine.** v. 24, n. 26(4), pp. 486-493. Jan., 2008.

XU, C.; BAILLY-MAITRE, B.; REED, J. C. Endoplasmic reticulum stress: cell life and death decisions. **The Journal of Clinical Investigation.** v. 115, n. 10, pp. 2656-2664, 2005.

XU, Ren-Huan *et al.* Direct Presentation Is Sufficient for an Efficient Anti-Viral CD8<sup>+</sup> T Cell Response. **PLoS Pathogens.** v. 6, Feb., 2010.

YOSHIDA, H; MATSUIT; YAMAMOTO, A; OKADA, T; MORI, K. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. **Cell**, v.107, n.7, Dec 28, p.881-91. 2001.

YOUSEFI, I. Selective activation of Unfolded Protein Response (UPR) by herpes simplex virus type 1 (HSV-1) in permissive and non permissive cells. 2011. 76f. Thesis (Master Science in Veterinary Microbiology) - University of Saskatchewan, Saskatoon. 2011.

ZHANG, L; WANG, A. Virus-induced ER stress and the unfolded protein response. **Front Plant Sci** 3: 293. 2012