

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Microbiologia
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia

Erika Sousa Guimarães

**MECANISMOS DE IMUNOEVASÃO UTILIZADOS POR POXVÍRUS QUE
INFECTAM VERTEBRADOS**

Belo Horizonte

2012

Erika Sousa Guimarães

**MECANISMOS DE IMUNOEVASÃO UTILIZADOS POR POXVÍRUS QUE
INFECTAM VERTEBRADOS**

Monografia apresentada à Universidade
Federal de Minas Gerais, como parte das exigências do
Curso de Pós-Graduação em Microbiologia para a obtenção
do título de Especialista em Microbiologia.

Orientador: Prof. Flávio Guimarães da Fonseca

Belo Horizonte

2012

Erika Sousa Guimarães

MECANISMOS DE IMUNOEVASÃO UTILIZADOS POR POXVÍRUS QUE INFECTAM VERTEBRADOS

Monografia apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, como parte das exigências do Curso de Pós-Graduação em Microbiologia para a obtenção do título de Especialista em Microbiologia.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Flávio Guimarães da Fonseca (UFMG)

Prof. Jônatas Santos Abrahão (UFMG)

Dr. André Tavares da Silva Fernandes (UFMG)

Belo Horizonte, 02 de Fevereiro de 2012.

"A mente que se abre a uma nova idéia jamais volta ao seu tamanho original"
(Albert Einstein)

RESUMO

Os poxvírus formam um complexo grupo de patógenos virais altamente bem sucedidos, capazes de infectar vertebrados e invertebrados, cuja capacidade de subverter o sistema imune vem sendo altamente estudada por sua diversidade e significância. Apesar da erradicação da varíola ter sido conquistada há mais de trinta anos, infecções por poxvírus que infectam vertebrados ainda representam um relevante problema de saúde pública mundial, levando a surtos ao redor do mundo, mortes em imunodeprimidos e ao surgimento de zoonoses e doenças sexualmente transmissíveis emergentes. O trabalho consiste de uma revisão bibliográfica para investigar, identificar e comparar os vários tipos de estratégias de modulação imunológica utilizados pelos vírus que compõe a família *Poxviridae*. Por se tratarem dos maiores entre todos os vírus que infectam animais, os vírus de DNA de genoma grande possuem um alto número de seus genes dedicados à imunomodulação do sistema imune do hospedeiro. Dessa forma, as táticas de evasão viral utilizadas pelos poxvírus são tão diversas que podem ter como alvo praticamente qualquer estágio da resposta inata e adaptativa do hospedeiro, atuando em diversos processos. O aumento do nosso entendimento a respeito dos processos imunes básicos é fundamental na identificação dos modos pelos quais vacinas, terapias gênicas e antivirais podem ser utilizados, além de estabelecimento de novas estratégias de tratamentos.

Palavras-chave: Imunomodulação. Evasão viral. Proteínas modulatórias. *Poxviridae*.

ABSTRACT

Poxviruses are a group of highly successful complex viral pathogens, capable of infecting vertebrates and invertebrates, which ability in subvert the immune system has been highly studied because of the diversity and significance. Despite the fact that smallpox was eradicated 30 years ago, poxviruses infections in vertebrates still remain as a worldwide relevant public health issue, because of the outbreaks around the world, immunodepressed deaths and the appearance of emerging zoonoses and venereal diseases. This study is a review to investigate, identify and compare the many types of modulation strategies used by viruses within the *Poxviridae* family. For being the biggest among all viruses that can infect animals, the DNA viruses with a large genome, have a high number of genes dedicated to immunomodulation of the host's immune system. Because of that, the tactics of viral evasion used by poxviruses are so diversified that virtually all stages of the innate and adaptative response of the host can be a target and are effective in many processes. The increase of our understanding about the basic immune processes is crucial in the identification of ways that vaccines, gene therapy and antivirals can be used, and also the establishment of new treatment strategies.

Key-words: Immunomodulation. Viral evasion. Modulatory proteins. *Poxviridae*.

1 INTRODUÇÃO

Os vírus são os parasitas mais abundantes no planeta, sendo capazes de infectar animais, plantas e bactérias, entre outros organismos (VANDEVENNE, SADZOT-DELVAUX e PIETTE, 2010), além de se mostrarem como um dos grupos de patógenos mais diversos com o qual o sistema imune precisa lidar.

Os poxvírus formam um complexo grupo de patógenos virais altamente bem sucedidos, classificados como vírus complexos e caracterizados por possuírem uma fita dupla linear de DNA, replicação citoplasmática, sendo os maiores vírus entre todos os vírus que infectam animais, com genoma que varia de 186 a 320 kbp (MOSS, 2001).

A família *Poxviridae* é dividida em duas subfamílias, a *Chordopoxvirinae* que agrupa os poxvírus que infectam vertebrados e a *Entomopoxvirinae*, cujas espécies de poxvírus agrupadas infectam invertebrados. A *Chordopoxvirinae* foi dividida em nove gêneros, os quais incluem os *Orthopoxvirus*, *Leporipoxvirus*, *Parapoxvirus*, *Capripoxvirus*, *Cervidpoxvirus*, *Molluscipoxvirus*, *Suipoxvirus*, *Yatapoxvirus* e *Avipoxvirus* (MOSS, 2001).

Poxvírus têm desempenhado papéis importantes durante toda a história da medicina. Em 1798 um poxvírus foi introduzido na prevenção da varíola por Edward Jenner através de um princípio que serviu como base para a formulação de uma vacina utilizada no século XX no combate à varíola, levando ao primeiro caso bem sucedido de erradicação de uma doença infecciosa. Poxvírus também desempenharam um papel importante em pesquisas microbiológicas pioneiras de visualização ao microscópio e de cultivo de células que possibilitaram a criação de técnicas moleculares modernas para criação de vetores virais recombinantes utilizados em vacinas, por exemplo (ALCAMÍ e SMITH, 1995).

Apesar da erradicação da varíola ter sido conquistada há mais de trinta anos, infecções por poxvírus ainda representam um problema de saúde pública mundial devido à preocupação em relação à utilização do vírus da varíola como potencial agente de bioterrorismo e por sua relevância como agentes causadores de doenças, incluindo zoonoses emergentes (BANDI, PAGLIACCETTI e ROBEK, 2009). Nesse sentido, as principais espécies de poxvírus são o *Variola vírus*, que anteriormente à sua erradicação, causava a varíola, responsável por um grande

número de mortes no mundo todo. O relacionado *Vaccinia virus*, vírus usado na vacina que levou à erradicação da varíola, cuja origem e hospedeiro natural são desconhecidos; o *Cowpox virus*, o *Monkeypox virus*, o *Molluscum contagiosum virus*, o *Ectromelia virus*, responsável por surtos em camundongos em laboratório, entre outros.

Doenças causadas por esses vírus são consideradas um problema mesmo atualmente. Em 2003, um surto do *Monkeypox virus*, um vírus que naturalmente infecta roedores e causa uma doença em humanos semelhante à varíola, levou à infecção de mais de setenta pessoas nos Estados Unidos (CHEN et. al, 2005). Mesmo atualmente, várias doenças causadas por poxvírus estão sendo tratadas como viroses emergentes; é o caso das infecções por *Cowpox virus* (MARTINA et. al, 2006), um poxvírus que causa uma doença epiteliotrópica, localizada, mas que pode gerar complicações em indivíduos imunodeprimidos. A virose é transmitida aos humanos acidentalmente por contato com animais domésticos infectados (VOGEL et. al, 2011). É também o caso da doença causada pelo *Molluscum contagiosum virus*, um vírus que causa pequenas lesões benignas na pele em crianças e adultos, mas pode levar a doença grave em imunodeprimidos (XIANG e MOSS, 2003). Novos poxvírus são identificados todos os anos entre a população animal e várias doenças parecem estar emergindo no mundo todo.

Essa intrínseca relação e coexistência entre os poxvírus e seus hospedeiros impuseram uma pressão evolutiva tanto nos vírus como no sistema imune do hospedeiro. Por um lado, os hospedeiros desenvolveram um sistema imune capaz de eliminar os vírus e as células infectadas, enquanto os vírus desenvolveram um conjunto de mecanismos para escapar dos potenciais danos causados pelo sistema imune (VOSSSEN et. al, 2002).

Nesse sentido, a complexidade e tamanho do genoma possibilitaram aos vírus da família *Poxviridae* o desenvolvimento de um repertório importante de genes capazes de modular a resposta do hospedeiro. Isso porque os genes localizados terminalmente no genoma desses vírus tendem a ser mais variáveis e incluem genes codificadores de fatores envolvidos na subversão do sistema imune do hospedeiro (revisto por SEET et. al, 2003). No caso dos poxvírus, genes de modulação das respostas do hospedeiro representam mais de 50% do genoma total (ALCAMI e KOSZINOWSKI, 2000). O sucesso da transmissão dos vírus, levando em conta a potência do sistema imune inato e adquirido do hospedeiro, requer a habilidade viral de evasão

e subversão dos elementos do sistema imune do hospedeiro que medeiam as respostas antivirais (JOHNSTON e McFADDEN, 2003).

As táticas de evasão viral são tão diversas que podem ter como alvo praticamente qualquer estágio da resposta inata e adaptativa do hospedeiro, atuando em diversos processos como, por exemplo, a produção de citocinas e interferons; o processo de opsonização e apoptose; a ativação de linfócitos, células NK e do sistema do complemento; além da produção de anticorpos (HAGA e BOWIE, 2005; HORST, RESSING e WIERTZ, 2011).

Proteínas imunomodulatórias codificadas por poxvírus podem ser divididas por função em três classes de estratégias distintas que receberam o nome de viromimetismo, virotransdução e virocamuflagem. A virocamuflagem é caracterizada por estratégias que tornam invisíveis quaisquer sinais associados à infecção viral como, por exemplo, a capacidade de leucócitos em reconhecer e eliminar células infectadas. Virotransdutores são proteínas intracelulares virais capazes de modular a resposta antiviral inata. O viromimetismo está associado a proteínas codificadas pelo vírus que mimetizam moléculas celulares, impedindo sua ação antiviral (JOHNSTON e McFADDEN, 2003).

O aumento da população sensível a infecções por poxvírus intensificou o interesse nas pesquisas com esses patógenos, tendo em vista que muitos aspectos de sua patogênese e da imunidade viral ainda são pobremente entendidos.

Dessa forma, mais uma vez os poxvírus emergem como um modelo de estudo de processos biológicos. O descobrimento que esses vírus possuem uma maquinaria poderosa para contra-atacar a resposta imune do hospedeiro levou à descoberta de informações cruciais no que diz respeito aos mecanismos virais de patogênese e fornecem excelentes ferramentas para o estudo do sistema imune em toda sua complexidade (ALCAMÍ e SMITH, 1995).

O aumento do nosso entendimento a respeito dos processos imunes básicos auxiliou a identificação dos modos pelos quais vacinas, terapias gênicas e antivirais podem ser utilizados, além de estabelecimento de novas estratégias de tratamentos (HORST, RESSING e WIERTZ, 2011). Com estudos mais amplos sobre o tema é provável que o potencial para uso terapêutico das proteínas imunomodulatórias cresça ainda mais (JOHNSTON e McFADDEN, 2003).

Tendo em vista a importância do tema escolhido, estudos sobre as estratégias de evasão utilizadas pelos vírus atraíram atenção considerável nos últimos anos e estão sendo o assunto de numerosas revisões.

2 JUSTIFICATIVA

A identificação das várias estratégias de evasão viral e de suas proteínas imunomodulatórias, assim como a análise de suas funções, são de importância significativa, pois levam a um melhor entendimento tanto do sistema imune do hospedeiro e seus complexos mecanismos de ação, como dos modos de ação virais.

Além disso, esses estudos fornecem pistas sobre as pressões seletivas que guiaram e guiam a co-evolução entre vírus e hospedeiros (JOHNSTON e McFADDEN, 2003), indicando quais os mecanismos do sistema imune os vírus devem subverter para se replicarem com eficiência (GOMES et al., 2011)

Por exemplo, pesquisas com proteínas imunomodulatórias fornecem bases para a identificação daquelas que podem ser utilizadas com aplicações clínicas, fornecendo novos alvos para a terapia antiviral ou potenciais drogas imunomoduladoras (DAVIS-POYNTER e FARRELL, 1996). Nesse contexto, diversas proteínas de poxvírus estão sendo utilizadas como formas para evitar rejeição em transplantes (ANDERSON, SMITH e KOTWAL, 2002) e na inibição de reações inflamatórias decorrentes de angioplastias (LIU *et. al*, 2000). A atenuação da resposta do hospedeiro pode ser aplicada ainda para modular uma resposta exacerbada do hospedeiro em diversas doenças humanas como choque séptico, alergias e artrite reumatóide (SARAIVA e ALCAMÍ, 2001). O descobrimento de proteínas modulatórias virais como, por exemplo, as proteínas de ligação a quimiocinas, possui implicações significativas em doenças infecciosas, como é o caso do HIV, doença na qual essas proteínas de ligação têm importância determinantes na transmissão e progressão da doença. Esse novo alvo de intervenção pode bloquear a infecção pelo vírus em um estágio inicial (GRAHAM *et. al*, 1997).

Outro exemplo está na identificação de mecanismos anti-apoptóticos virais que poderão ser utilizados para o desenvolvimento de fármacos para aceleração do processo apoptótico em tumores ou para inibição da apoptose em doenças como derrames e traumas neurológicos.

Além disso, estudos utilizando comparações de vírus com deleções de genes específicos e tipos selvagens, buscando definir seus papéis na resposta imune, podem levar ao descobrimento de apresentadores de antígenos mais eficientes, bons candidatos na utilização

em vacinas (GUERIN *et. al*, 2002). Vírus recombinantes também podem ser usados para definir a importância daquele gene em particular durante a patogênese viral (HAIG, 2001).

A inibição da ação de proteínas virais modulatórias pode ser outra forma de terapia, permitindo que a resposta imune inata funciona de maneira adequada, eliminando ou controlando a infecção viral (BANDI, PAGLIACCETTI e ROBEK, 2009).

3 METODOLOGIA

O presente trabalho utiliza o referencial da pesquisa bibliográfica, que define o processo de levantamento e análise do que já foi publicado sobre o tema de pesquisa escolhido, permitindo efetuar um mapeamento dos artigos científicos disponíveis sobre o tema da pesquisa (MORESSI, 2003).

O trabalho consiste de uma revisão bibliográfica que busca indagar e obter informações sobre os mecanismos de imunomodulação utilizados pelos vírus complexos de DNA que infectam vertebrados que compõe a família *Poxviridae*.

O levantamento de dados para a revisão bibliográfica foi realizado junto às publicações da área da saúde existentes na base de dados *Medline – Pubmed*. Foram selecionados artigos de periódicos já que, em geral, esses artigos tendem a apresentar resultados mais consolidados e serem mais arduamente revisados (WAZLAWICK, 2009).

Não houve limitação de data nas buscas, tendo em vista que não é de interesse excluir trabalhos importantes sobre o tema publicados pioneiramente.

Foram utilizadas as seguintes chaves de busca para a pesquisa inicial sobre o tema: *poxvirus + immune evasion mechanisms* e *poxvirus + immunomodulation*, além de *poxvirus + immune evasion strategies*. Para complementação de busca e especificação de temas também foram utilizadas buscas com as seguintes junções de palavras: *poxvirus* + o alvo da imunomodulação a ser pesquisada, por exemplo, e dentre eles: *poxvirus + citokines*.

Para apoiar a discussão dos referidos textos foi incorporada a leitura de livros que abordam informações relevantes sobre o tema.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Investigar, identificar e analisar, através de revisão literária, os vários tipos de estratégias de imunoevasão utilizadas pelas principais espécies virais capazes de infectar vertebrados existentes na família *Poxviridae*.

4.2 Objetivos específicos

- Identificar, por meio de revisão bibliográfica, os principais tipos de mecanismos de evasão utilizados por poxvírus que infectam vertebrados.
- Descrever as principais estratégias de imunoevasão encontradas nas principais espécies de poxvírus que infectam vertebrados.
- Comparar os modos e estratégias de evasão utilizadas pelas diferentes espécies poxvirais.

5 DESENVOLVIMENTO

5.1 Mecanismos de imunoevasão utilizados por poxvírus

5.1.1 Bloqueio da apresentação de antígenos através do complexo maior de histocompatibilidade (MHC)

A maioria das células nucleadas expressa moléculas de MHC, capazes de apresentar fragmentos de peptídeos antigênicos para as células efetoras do sistema imune, tais como *natural killer* (NK) e linfócitos. Esses peptídeos são produzidos durante a infecção viral, no citosol, por degradação proteossomal e são posteriormente importados para o retículo endoplasmático (RE) onde se ligam por afinidade ao complexo maior de histocompatibilidade e são transportados para a superfície celular, resultando na apresentação dos antígenos virais para as outras células. Após o reconhecimento dos peptídeos virais via MHC os linfócitos CD8 e CD4 cooperam para o reconhecimento e destruição das células infectadas e produzem citocinas inflamatórias que irão prevenir a disseminação viral.

Para evitar a ação dos linfócitos muitos vírus, especialmente os de DNA, desenvolveram mecanismos que têm como alvo a apresentação de antígenos por MHC e basicamente todos os passos do tráfego de MHC associados a peptídeos virais são alvos de estratégias de modulação. Porém, a regulação não ocorre com a mesma eficiência e da mesma maneira nos diversos vírus: a modulação de MHCI existente no *Vaccinia virus*, o vírus protótipo da família *Poxviridae*, é apenas moderada, enquanto a realizada pelo *Cowpox virus* inclui uma redução considerável no reconhecimento e transporte intracelular de MHCI (DASGUPTA *et. al*, 2007).

Os mecanismos moleculares da regulação no *Cowpox virus* foram primeiramente estudados através da identificação da proteína CPXV203. Foi demonstrado experimentalmente que essa proteína interfere com o tráfego intracelular de moléculas de MHCI, sequestrando-as nos compartimentos pré-Golgi, causando a redução de MHCI na superfície celular. Porém, foi observado que vírus com deleção desse gene ainda eram capazes de realizar modulação de MHCI (BYUN *et. al*, 2007). Posteriormente, foi descrita a presença de uma segunda proteína

com função semelhante à CPXV203, a CPXV12, porém com mecanismo de ação diferente do descrito por CPXV203. Baseado em estudos bioquímicos foi demonstrado que a proteína prejudica o carregamento peptídico, atrasando a maturação do MHCI (BYUN *et. al*, 2009). A modulação de MHCI por CPXV12 e CPXV203 contribui para a virulência de *Cowpox virus*, abalando a resposta antiviral.

A evasão viral de MHCI desempenha um papel importante no *Myxoma virus*, o agente responsável pela mixomatose, uma doença altamente letal do coelho europeu, assim como anteriormente descrito em *Cowpox virus*. O *Myxoma virus* induz uma queda na expressão de MHCI devido à presença da proteína M153R, pertencente a uma família de proteínas virais encontradas em muitos poxvírus, diretamente ligadas à retenção e degradação lisossomal de MHCI (MANSOURI *et. al*, 2003). Outros estudos mostraram que a regulação de MHCI nesses vírus também está ligada a proteínas homólogas a proteínas celulares (MV-LAP), capazes de regular e reduzir a exibição de MHCI na superfície celular. Foi demonstrado que a regulação mediada por essas proteínas resulta num decréscimo na atividade de linfócitos T citotóxicos (CTL). Esses resultados sugerem que as proteínas LAP podem interferir diretamente com os linfócitos CD8 e por isso, representam um fator chave na evasão realizada pelo *Myxoma virus* (GUERIN *et. al*, 2002).

É possível perceber que a importância do MHC de classe I na imunidade antiviral é bem estabelecida. Todavia, a importância do MHC de classe II também é documentada e o decréscimo na expressão de MCH de classe II (MHCII) induzido pelo *Vaccinia virus* em diversos tipos celulares já foi relatado (LI *et. al*, 2005). Estudos mostraram que, logo após a infecção, há uma redução na apresentação de antígenos que não ocorre apenas por apoptose celular causada pelo vírus, mas também por um mecanismo induzido pelo vírus na célula viável (REHM *et. al*, 2009). Recentemente foi esclarecido que o responsável por esses efeitos é o gene A35, capaz de interferir na associação dos peptídeos virais com o MHCII, inibindo a expressão de MHCII na superfície das células apresentadoras e a subsequente síntese de citocinas (REHM *et. al*, 2011).

5.1.2 Bloqueio do sistema do complemento

O sistema do complemento é um potente mecanismo da imunidade inata que pode ser dividido em duas vias, clássica e alternativa, e é constituído por proteínas reguladas em “cascata” cujo principal objetivo é auxiliar na contenção da invasão de patógenos, incluindo partículas virais e células infectadas por vírus (BERNET *et. al*, 2003).

O sistema do complemento é de grande importância no combate a infecções virais, já que sua ativação leva à neutralização de vírus - componentes do complemento revestem as partículas virais e estas não podem se ligar ou penetrar na célula de forma eficaz -, à fagocitose de partículas virais revestidas e à lise de células infectadas pela formação do complexo de ataque à membrana (JHA e KOTWAL, 2003). Além disso, o sistema do complemento tem papel na iniciação e amplificação da resposta inflamatória (KOTWAL, 2000).

A importância do complemento pode ser enfatizada pela diversidade de vírus descritos capazes de codificar proteínas que interagem com os componentes do sistema do complemento. Essas proteínas são chamadas de virocinas e consistem em proteínas virais que são funcionalmente e estruturalmente semelhantes às moléculas regulatórias do hospedeiro. Nos poxvírus essas proteínas receberam o acrônimo de PICE (*Poxviral inhibitor of complement enzymes*) e são enzimas capazes de inibir o complemento através de dois mecanismos de ação distintos: atividade de cofator, onde há degradação de C3b e C4b e atividade de dissociação das convertases (LISZEWSKI, 2008).

O melhor exemplo e umas das primeiras PICEs a ser documentada foi a do *Vaccinia virus*, a VCP, que foi considerada um fator de virulência para o vírus, tendo em vista que a deleção do gene que codifica a VCP resultou em considerável atenuação da patogenia do vírus em coelhos e cobaias, gerando lesões com cura mais rápida. Isso porque a liberação de VCP nas células infectadas pelo vírus é capaz de prevenir a neutralização dependente de anticorpos, potencializada pelo sistema do complemento (ISAACS, KOTWAL e MOSS, 1992).

Estudos recentes confirmaram o papel da VCP como fator de virulência para o vírus e demonstram, ainda, que o vírus é capaz de controlar a resposta imune adaptativa do hospedeiro de forma dependente do sistema complemento. Foi demonstrado que animais

infectados por cepas virais mutantes, com deleção de VCP, possuem um número maior de linfócitos no sítio da infecção, feito importante no controle da replicação viral, além de apresentarem um aumento no título de anticorpos neutralizantes contra o vírus. Portanto, a VCP limita a imunidade, reduzindo a resposta de anticorpos e modulando o acúmulo de células T CD4 e CD8 no local da infecção (GIRGIS *et. al*, 2011).

No caso do *Monkeypox virus* a proteína inibidora do complemento recebeu o acrônimo de MOVICE (*Monkeypox virus inhibitor of complement enzymes*) e também está associada com a virulência viral. Experimentos revelaram que a perda de MOVICE é relevante na redução da taxa de mortalidade causada por diferentes cepas do vírus, endêmicas de diferentes localidades na África (CHEN *et. al*, 2005).

No caso do *Variola virus* a enzima de controle do complemento recebe o acrônimo SPICE (*Smallpox inhibitor of complement enzymes*). Segundo estudos, a SPICE foi considerada ainda mais eficiente que as outras PICES, incluindo a VCP, e segundo os autores, isso provavelmente pode ser explicado pela especificidade da resposta, tendo em vista que o homem é o único hospedeiro do vírus (ROSENGARD *et. al*, 2002).

A proteína do *Ectromelia virus*, um patógeno natural de camundongos altamente virulento, a EMICE (*Ectromelia virus inhibitor of complement enzymes*), homóloga às proteínas citadas acima, foi caracterizada e sua capacidade de modulação também se estende as vias clássica e alternativa do complemento. No estudo, células infectadas pelo vírus produziram grandes quantidades da EMICE, o que impediu a neutralização do vírus pelo sistema imune do hospedeiro. Essa inibição da neutralização é potencializada porque as proteínas são liberadas antes mesmo da saída da maioria dos vírus das células infectadas e por sua conformação em dímeros, mais eficiente na ligação à superfície celular (MOULTON *et. al*, 2010).

O *Cowpox virus* também codifica uma proteína semelhante à VCP do *Vaccinia virus*, a IMP (*Inflammation modulation protein*), capaz de modular a inflamação causada pela ativação do complemento *in vivo*. Seu impacto na magnitude da resposta inflamatória pôde ser comprovado porque em ratos cujas patas foram infectadas com um vírus recombinante, sem a IMP, os danos teciduais observados foram muito maiores, assim como o nível de hemorragia, inchaço e ulceração em comparação com ratos infectados com o tipo selvagem do vírus. No

caso, a proteína é capaz de reduzir a destruição do tecido e bloquear a chegada de linfócitos, dando suporte ao crescimento da progênie viral (MILLER, SHCHELKUNOV e KOTWAL, 1997; KOTWAL, MILLER e JUSTUS, 1998).

5.1.3 Inibição e imunomodulação de citocinas

No contexto celular, citocinas ativam caminhos intracelulares que levam a um estado antiviral ou a apoptose celular, limitando a replicação viral. Num contexto orgânico, muitas citocinas induzem mecanismos que aumentam o reconhecimento do sistema imune ou as repostas que protegem o hospedeiro contra uma infecção viral, tais como processos inflamatórios. Por isso, é possível entender porque a grande maioria dos poxvírus possui mecanismos para modular a ação das citocinas (ALCAMI, 2003).

5.1.3.1. Modulação de Interleucinas

As interleucinas formam uma família de citocinas de importância determinante no combate a infecções. Várias formas de manipulação das diversas interleucinas são encontradas nos poxvírus.

Uma das primeiras formas de evasão nesse sentido foi encontrada no *Vaccinia virus* com a descoberta do gene B15R que codifica uma glicoproteína que funciona como um receptor para a interleucina 1 (IL1) e liga-se a IL1 β , mas não a IL1 α . A IL1 consiste em uma citocina pró-inflamatória que controla diversos processos iniciais da resposta imune e, segundo os autores, esse foi o primeiro exemplo de mecanismo capaz de bloquear a resposta febril, um dos principais efeitos sistêmicos mediado por IL1 que contribui para as defesas do hospedeiro. O bloqueio da IL1 mostra-se significativo tendo em vista que a deleção do gene B15R acelera o aparecimento dos sintomas da doença em camundongos infectados de forma intranasal, sugerindo que o bloqueio da IL1 β pela *Vaccinia virus* consegue modular o grau de severidade da doença (ALCAMÍ e SMITH, 1992).

O fato de o receptor viral ligar-se a IL1 β , mas não a IL1 α , sugere que apesar de todas as IL1 desempenharem um papel similar na resposta imune em alguns modelos experimentais (DINARELLO, 1994), IL1 β pode ser mais importante contra infecções virais (ALCAMÍ e SMITH, 1995), já que os vírus tendem a evoluir mecanismos de evasão apenas contra componentes do sistema imune que são efetivos contra eles.

A interleucina 10 (IL10) é uma citocina multifuncional que gera efeitos inibitórios na imunidade específica e interfere com a função de linfócitos T, sendo considerada uma interleucina de ação antiinflamatória. Até hoje um grande número de homólogos virais de IL10 foram identificados entre os poxvírus sendo o primeiro a ser identificado e, até agora, o mais bem caracterizado, encontrado no *Orf virus*, um vírus causador de lesões epiteliais e de mucosa em ovelhas e raramente transmitido ao homem (LATEEF *et. al*, 2010).

O gene viral mostra semelhança a IL10 de cabras, humanos e camundongos e parece ter importância na evasão pelo *Orf virus* por levar, segundo estudos, à redução da ativação de macrófagos e a proteção contra a resposta imune mediada por Th1 (FLEMING *et. al*, 1997).

Foi descoberta também no *Molluscum contagiosum virus* uma família de genes – MC51L, MC53L e MC54L – homólogos às proteínas do hospedeiro de ligação a interleucina 18 (IL18BP) (NOVICK *et. al*, 1999). A IL18 é uma citocina pró-inflamatória que induz a produção de IFN γ e desempenha um papel crítico na resposta por linfócitos. A aparente homologia entre os genes virais mencionados e os genes que codificam as IL18BP do hospedeiro levou à investigação das propriedades de ligação a IL18 das proteínas virais. Estes estudos revelaram que MC53L e MC54L produzem proteínas que se ligam a IL18 com alta afinidade, gerando redução da resposta inflamatória nas infecções pelo *Molluscum contagiosum virus* em humanos, já que a inativação de IL18 leva ao bloqueio de ativação de outras citocinas (XIANG e MOSS, 1999).

A expressão de proteínas virais de ligação a IL18 são particularmente relevantes em *Molluscum contagiosum virus* porque possuem um papel considerado determinante na ausência de reação inflamatória no local de replicação do vírus na pele. Porém, proteínas solúveis de ligação a IL18 também foram encontradas em *Ectromelia virus*, *Vaccinia virus* e *Cowpox virus* e são secretadas de células infectadas, levando também à modulação da resposta antiviral do hospedeiro (SMITH, BRYANT e ALCAMÍ, 1999).

5.1.3.2 Modulação do sistema Interferon

Interferons (IFNs) constituem uma família de citocinas secretadas que formam a primeira linha de defesa contra infecções virais. Eles são capazes de inibir a replicação e dispersão viral diretamente pela produção do efeito antiviral ou indiretamente, através de atividades imunorregulatórias. A família inclui interferons do tipo I (incluindo os subtipos $IFN\alpha/\beta$) que se ligam a um mesmo receptor ($IFN\alpha/\beta R$), interferons do tipo II ($IFN\gamma$) que se ligam a um receptor celular diferente ($IFN\gamma R$) e o tipo mais recentemente caracterizado, o tipo III ($IFNIII$) (BARRETT *et. al*, 2007). Também já foram descritos outros subtipos de interferons.

Várias etapas no mecanismo de ação dos interferons sofrem modulação pelos poxvírus: há limitação da produção de IFNs por células infectadas, produção de receptores homólogos de IFN e expressão de proteínas intracelulares que bloqueiam os efeitos antivirais de IFN.

No caso das estratégias para evasão do efeito antiviral duas enzimas são particularmente importantes nas infecções por poxvírus: a proteína quinase dependente de RNA (PKR) e a 2,5A - sintetase. Ambas são ativadas por RNA de dupla fita (dsRNA), comum nas infecções virais e levam ao bloqueio da síntese protéica, restringindo o espalhamento viral (SMITH, SYMONS e ALCAMÍ, 1998). O *Vaccinia virus* possui duas importantes proteínas intracelulares, produzidas por células infectadas, que bloqueiam a ação de IFN. Essas proteínas são chamadas de virotransdutoras, pois afetam indiretamente as vias mediadas por interferon de maneira intracelular. A proteína codificada pelo gene E3L se liga competitivamente ao dsRNA, prevenindo a ativação de PKR, e a proteína codificada por K3L se liga diretamente a PKR, sendo o efeito antiviral impedido em ambos os casos (SYMONS, ALCAMÍ e SMITH, 1995). A importância dessas proteínas foi comprovada através de experimentos que mostraram que cepas do *Vaccinia virus* com deleção de E3L e K3L são sensíveis à ação antiviral promovida por IFN, estando ambas ligadas à capacidade do vírus de causar doença e de infectar uma grande variedade de tipos celulares (BEATTIE, PAOLETTI e TARTAGLIA, 1995).

Também foi demonstrado através de evidências *in vivo* que a proteína E3 é altamente versátil, evitando o sistema IFN em múltiplos níveis, incluindo a inibição de RNases e redução de

dsRNA (XIANG *et. al*, 2002). Muitos outros Poxvírus também codificam múltiplos inibidores celulares que incluem homólogos de E3L e K3L (ALCAMI, 2003).

Porém, a estratégia mais comumente utilizada por poxvírus para modulação do sistema interferon é a mimetização de seus receptores (SMITH, SYMONS e ALCAMÍ, 1998). As moléculas que mimetizam os receptores celulares são chamadas de viroreceptores e podem ser tanto secretadas quanto localizadas na superfície de células infectadas. Esses receptores homólogos (IFNRs) se assemelham aos celulares, porém se ligam com mais afinidade aos IFNs, prevenindo a ligação dos mesmos aos receptores celulares, levando a neutralizando da ação das citocinas (JOHNSTON e McFADDEN, 2003).

O primeiro receptor homólogo descrito em poxvírus foi encontrado no *Myxoma virus* e trata-se de uma proteína (MT7) secretada inicialmente durante a infecção cuja capacidade de inibição da ativação de IFN γ foi demonstrada em coelhos (UPTON, MOSSMAN e McFADDEN, 1992). Também foram descritos receptores homólogos de IFN γ secretados pelas células infectadas de *Vaccinia virus*, *Cowpox virus* e *Camelpox virus*, vírus que pode levar a uma infecção generalizada em camelos (ALCAMI e SMITH, 1995). Interferons do tipo II são particularmente importantes no controle de infecções por poxvírus já que, além de induzirem um estado antiviral nas células, desempenham um papel importante na regulação da resposta inflamatória, o que explica o fato de vários vírus possuírem genes que inibem a atividade de IFN γ (VOSSEN, 2002).

Estudos mostraram que diversas cepas de *Ectromelia virus* expressam receptores homólogos para interferons dos tipos I e II, capazes de bloquear IFN γ e IFN α em ratos, porém contrariando o que se imaginava, sem que haja bloqueio de IFN β (SMITH e ALCAMÍ, 2002).

A maioria dos poxvírus causadores de doenças em vertebrados expressam receptores solúveis para IFN I e vírus como *Vaccinia virus*, *Camelpox virus* e *Cowpox virus* expressam IFN α/β R virais na superfície celular.

O tipo mais bem estudado de inibição de IFN α/β é do gene B18R, presente no *Vaccinia virus*. O gene B18R codifica uma proteína de ligação a IFNs, capaz de se ligar competitivamente aos interferons de espécies de diferentes mamíferos, incluindo humanos, coelhos e ratos, (SYMONS, ALCAMI e SMITH, 1995; COLAMONICI *et. al*, 1995). Também foi demonstrado que

além de IFN α a proteína do gene B18R é capaz de bloquear a ação de IFN β em porcos, também bloqueando a ligação ao receptor, como em outros casos (VANCOVÁ, BONNARDIERE e KONTSEK, 1998). A replicação do *Vaccinia virus* é restrita na presença de IFNs em cepas com a deleção do B18R, evidenciando a importância da proteína produzida pelo gene na infecção viral (ALCAMÍ, SYMONS e SMITH, 2000). Além do gene B18R, o *Vaccinia virus* codifica o B8R, um gene que produz uma proteína com atividade de ligação a IFN γ , capaz de bloquear a função antiviral e a função imune dos IFN simultaneamente (ALCAMÍ e SMITH, 1995).

O *Myxoma virus* codifica uma segunda proteína, a M135R de superfície celular, que mimetiza os receptores celulares de IFN α/β , bloqueando o disparo da resposta antiviral. A proteína é considerada um importante fator de virulência tendo em vista que estudos mostraram que a deleção da M135R leva a atenuação do vírus *in vivo* e ao não desenvolvimento da doença (BARRETT *et. al*, 2007).

Uma nova família de citocinas foi descoberta e recebeu o nome de interferons do tipo III e incluem IFN λ 1,2 e 3. Apesar da baixa homologia entre as estruturas genômicas dos interferons do tipo I e do tipo III, muitas características são comuns, incluindo sua capacidade de inibir a replicação viral de diversos vírus de DNA. A habilidade de proteínas virais em inibir a atividade de IFN λ já foi investigada *in vitro* e descrita em *Orthopoxvirus* para proteínas intracelulares, incluindo a E3 produzida pelo *Vaccinia virus* (BANDI, PAGLIACCETTI e ROBEK, 2010).

5.1.3.3 Modulação de Fator de Necrose Tumoral

O Fator de necrose tumoral (TNF) é uma importante citocina pró-inflamatória secretada por macrófagos e linfócitos ativados. Já foram identificados três tipos de TNF: TNF (TNF α), LT α e TNF β e todas coordenam uma similar e poderosa ação antiviral que inclui efeitos diretos a células infectadas (citólise), regulação de linfócitos, indução de apoptose e de expressão de várias outras citocinas inflamatórias, levando à inibição da replicação viral (SEET *et. al*, 2003).

A estratégia anti-TFN empregada por poxvírus melhor caracterizada envolve, como ocorre com IFNs, a produção de receptores virais homólogos (vTNFRs) que funcionam de maneira similar aos outros viroceptores, ligando-se aos TNF celulares extracelularmente e em superfície celular antes que haja ligação do mesmos aos receptores celulares, inibindo sua subsequente ativação. Os vTNFRs melhor estudados são aqueles presentes no *Myxoma virus* e em *Cowpox virus*.

O primeiro receptor homólogo descrito, para TNF, em poxvírus foi encontrado no *Shope fibroma virus* (SMITH *et. al*, 1991) e é similar ao que foi encontrado em estudos com *Myxoma virus* que descreveram um gene viral, denominado MT2, que codifica uma proteína secretada com atividade de ligação a TNF, sendo capaz de inibir em quantidade considerável a citólise celular mediada por TNF em ratos. O gene mostrou-se ser um importante fator de virulência para o vírus, tendo em vista que a deleção do mesmo leva à produção de doença atenuada e lesões de menor tamanho quando comparadas à resposta contra a infecção obtida com o tipo selvagem, com alto índice de recuperação de ratos infectados mesmo após administração de dose letal (UPTON *et. al*, 1991; XU, NASH e McFADDEN, 2000).

Após esses estudos, evidências de que outros vírus poderiam compartilhar essa capacidade modulatória vieram com a análise do genoma do *Vaccina virus* (HOWARD *et. al*, 1991) e levaram a pesquisas com diversos outros *Orthopoxvirus*.

Foi descrita a presença de vTNFRs também em *Cowpox virus*. O vírus possui duas cópias de um gene extremamente semelhante ao MT2, designado CrmB (*citokine response modifier*), que codifica uma proteína secretada capaz de se ligar tanto a LT α quanto a TNF (HU, SMITH e PICKUP, 1994). Posteriormente foram descritos ainda outros três inibidores de TNF existentes

em *Cowpox virus*: o CrmC que atua de forma semelhante a CrmB porém é capaz de se ligar a LT α , mas não TNF β (SMITH *et. al*, 1996), o CrmD, também capaz de se ligar a LT α e TNF (LOPAREV *et. al*, 1998) e o mais recentemente caracterizado, CrmE, que codifica uma proteína secretada que se liga ao TNF e não a LT α de ratos, camundongos e humanos *in vitro*, mas que só é capaz de bloquear totalmente a lise celular mediada por TNF humano (SARAIVA e ALCAMÍ, 2001).

Muitos outros poxvírus possuem genes homólogos semelhantes as Crm de *Cowpox virus*, porém a expressão das Crm varia conforme as espécies virais. *Variola virus* e *Camelpox virus* possuem um único receptor homólogo a CrmB descrito (PANUS *et. al*, 2002), enquanto *Ectromelia virus* possui um único homólogo de CrmD (LOPAREV *et. al*, 1997). Estudos com quinze cepas de *Vaccinia virus* mostraram que apenas três cepas do vírus (Lister, USSR e Evans) possuem atividade de vTNFR pela produção de homólogos de CrmC e CrmE, expressos em superfície celular ou em solução (ALCAMÍ *et. al*, 2001). A variedade de receptores homólogos apresentada pelos poxvírus ainda não está totalmente entendida.

Apesar de muitos vírus possuírem atividade de modulação de TNF, a expressão de diferentes vTNFRs em um mesmo vírus, como ocorre em *Cowpox virus*, é intrigante tendo em vista que os vírus possuem capacidade codificante limitada e já que vírus com alta virulência como *Ectromelia virus* e *Myxoma virus* possuem um único modulador de TNF descrito, como citado anteriormente. É provável que apesar de similares, os Crm atuem em diferentes estágios da resposta imune, auxiliando os vírus a escaparem eficientemente do sistema imune e contribuindo para o equilíbrio entre hospedeiro e vírus (SARAIVA e ALCAMÍ, 2001).

Adicionalmente à estratégia empregada por poxvirus, que tem como alvo direto a família de TNFs, estratégias indiretas de modulação também foram descritas, como é o caso do gene MCL159L do *Molluscum contagiosum virus* que bloqueia a ativação de uma molécula de importância fundamental na via de TNF, prejudicando a resposta inflamatória de TNF que fornece proteção contra infecções (GIL *et. al*, 2001).

5.1.3.4 Inibição e imunomodulação de quimiocinas

Quimiocinas formam uma família de proteínas que foi dividida em quatro grupos estruturais, baseados no número e no arranjo de grupos internos de cisteínas: CC (β quimiocinas), CXC (α quimiocinas), CX₃C (γ quimiocinas) e C (ALCAMÍ *et. al*, 1998), as quais são produzidas em resposta a diversos estímulos, inclusive uma infecção viral. As quimiocinas são responsáveis pela coordenação e direcionamento da ativação e migração de células imunes às áreas de infecção nos tecidos (BUGERT e DARAI, 1999), um papel de destaque na resposta inflamatória precoce. Por se tratarem de citocinas cruciais na limitação de infecções virais, a maioria dos poxvírus desenvolveu estratégias para bloquear ou modular sua atividade, geralmente promovendo a replicação viral (SEET *et. al*, 2003).

Basicamente três estratégias anti-quimiocinas são utilizadas pelos poxvírus: a) produção de homólogos de quimiocinas, b) produção de receptores homólogos e c) secreção de proteínas virais de ligação a quimiocinas (MAHALINGAM e KARUPIAH, 2000).

A primeira estratégia foi descoberta com o sequenciamento do genoma completo do *Molluscum contagiosum virus*, o que levou à identificação do primeiro homólogo de quimiocina, o gene MC148R. Este fator viral é estruturalmente semelhante às proteínas da família de β quimiocinas, atuando como um antagonista, ao ligar-se a receptores celulares sem ativá-los e, provavelmente, impedindo a resposta inflamatória *in vivo* (BUGERT *et. al*, 1997). Como o vírus não é capaz de se propagar em cultura, o papel preciso do MC148R na patogênese viral permanece incerto (LALANI, BARRETT e McFADDEN, 2000).

A segunda estratégia de modulação é descrita apenas para *Capripox virus* e *Swinepox virus*. Esses vírus são capazes de produzir proteínas que atuam como receptores homólogos de quimiocinas. Neste caso, proteínas virais firmemente ancoradas à membrana de células infectadas se ligam às quimiocinas celulares. Apesar de sua função ainda não ter sido totalmente esclarecida, tem sido especulado que essas proteínas atraem macrófagos e monócitos aumentando a replicação e espalhamento viral (KOTWAL, 2000).

A terceira estratégia consiste na produção de proteínas virais de ligação a quimiocinas. Essas proteínas não são relacionadas às quimiocinas ou aos seus receptores e funcionam

capturando as quimiocinas celulares e impedindo sua ação. As proteínas de ligação encontradas até o presente momento foram classificadas em dois grupos, levando em conta sua capacidade de ligação às quimiocinas. Proteínas do tipo I são consideradas proteínas de ligação de baixa afinidade e as do tipo II são consideradas proteínas de ligação de alta afinidade (ALACAMÍ e SMITH, 1995).

Pertencente ao primeiro tipo foi descrita a proteína MT7 do *Myxoma virus*, que se liga a quimiocinas CXC, CC e C sem restrição aparente de espécie. Essa proteína possui papel na virulência viral, tendo em vista que infecções em coelhos com o vírus mutado têm a migração de leucócitos para o foco da infecção drasticamente aumentada (SEET e McFADDEN, 2002).

Uma proteína de ligação à quimiocinas pertencente ao segundo grupo foi encontrada no *Vaccinia virus*, e também em vários outros vírus como *Cowpox virus* e *Camelpox virus*. A proteína de 35 kDa foi originalmente descrita por sua atividade de ligação de alta afinidade a quimiocinas do tipo CC e CXC, e capacidade de modular o influxo de células inflamatórias em tecidos infectados (GRAHAM *et. al*, 1997). Estudos posteriores confirmaram a habilidade dessa proteína de reduzir a migração de células *in vitro*, porém mostraram que não ocorre ligação a quimiocinas do tipo CXC ou C. Essa proteína bloqueia a interação com os receptores celulares, representando a primeira proteína solúvel identificada capaz de bloquear a atividade de quimiocinas (ALACAMÍ *et. al*, 1998). O segundo tipo de proteína de ligação também foi descrito no *Ectromelia virus*, vírus que secreta uma proteína semelhante a do *Vaccinia virus*, citada anteriormente, e que recebe o nome de E163. Essa proteína se liga com alta afinidade a quimiocinas do grupo CC e CXC, modulando sua atividade (RUIZ-ARGUELLO *et. al*, 2008). Também no *Myxoma virus* foi detectada a existência de uma proteína (codificada pelo gene MT1) que reduz o influxo de células inflamatórias ao sítio da infecção durante a fase aguda da mesma (LALANI *et. al*, 1999).

Uma nova estratégia de modulação utilizada por poxvírus foi descrita e mostrou que não só a migração de leucócitos para o sítio de infecção é afetada pela modulação de quimiocinas. Segundo estudos, células dendríticas infectadas com *Vaccinia virus* são incapazes de migrar em resposta a quimiocinas que normalmente promoveriam a movimentação dessas células para os tecidos linfóides, onde seriam responsáveis pela apresentação de antígenos virais (HUMRICH *et.*

al, 2007). Ainda não foi determinado qual gene do vírus é responsável por essa estratégia, porém, esses estudos mostram que novos tipos de modulação de quimiocinas ainda devem ser descritos (ALCAMÍ, 2007).

5.1.4 Inibição de apoptose celular

Apoptose é uma forma de morte celular programada que pode ser disparada por uma variedade de indutores, incluindo a família TNF, estresse celular (radiação, por exemplo), inibidores do ciclo celular e agentes infecciosos. A apoptose leva à eliminação de células indesejadas ou defeituosas, incluindo aquelas infectadas por vírus, sem que haja uma grande perturbação do tecido circundante (ALCAMÍ e KOSZINOWSKI, 2000). Nesses casos a apoptose é tão eficiente que pode ser considerada como parte da resposta imune inata do hospedeiro e os vírus expressam proteínas que bloqueiam a morte celular. Entretanto, a apoptose pode facilitar a disseminação viral e mecanismos virais pró-apoptóticos também já foram descritos (EVERETT e McFADDEN, 1999).

IFN e TNF são famílias de citocinas anteriormente descritas que disparam sinais intracelulares que culminam, também, na indução de apoptose. Nesse sentido, muitos dos mecanismos de modulação já descritos influenciam a morte celular programada. É o caso, por exemplo, das proteínas codificadas pelos genes E3L e K3L, presentes no *Vaccinia virus*, que ativam proteínas dependentes de RNA (PKR) resultando na indução de apoptose através do bloqueio da síntese de novas proteínas.

Um evento chave na indução de sinais para morte celular é a ativação de proteases pró-apoptóticas, chamadas de caspases. Consequentemente, essas proteases são frequentemente alvo da modulação de diversos poxvírus. A estratégia utilizada pelo *Molluscum contagiosum virus* baseia-se na produção de duas proteínas denominadas MC159 e MC160 que se ligam aos receptores celulares, prevenindo a ativação da caspase-8, uma proteína cuja ativação leva a morte celular controlada (EVERETT e McFADDEN, 2002).

Outros poxvírus inibem as caspases através da produção de proteínas que atuam como substratos suicidas. É o caso do *Cowpox virus* que inibe a produção de caspases através da produção de proteínas da família das serpinas – proteínas que agem inibindo proteases envolvidas na resposta inflamatória e na apoptose (HAIG, 2001). A serpina CrmA é capaz de bloquear a apoptose induzida por citocinas (TEWARI e DIXIT, 1995). Além disso, a CrmA é capaz de bloquear a apoptose realizada por linfócitos citotóxicos e células *natural killer*, além de inibir

também a capase-8 e caspase-1, bloqueando a apoptose em diversos caminhos (ZHOU *et. al*, 1997).

Caminhos apoptóticos ativados por radiação ultravioleta também aparentam ser importantes alvos para alguns poxvírus. O *Molluscum contagiosum virus* codifica uma peroxidase, MC066L, capaz de transformar radicais livres em água, na célula. Esse mecanismo de reação ao estresse fornece ao vírus uma vantagem seletiva, pois permite a replicação durante a exposição solar e neutraliza espécies reativas de oxigênio. Os vírus *Ectromelia virus* (BRICK *et. al*, 2000) e *Shope fibroma virus* (BRICK *et. al*, 1998) também inibem a apoptose mediada por radiação ultravioleta através das proteínas p28 e N1R, respectivamente, mas seus mecanismos de ação ainda não foram desvendados.

Mitocôndrias são importantes centros que coordenam a sinalização para apoptose. O *Myxoma virus* expressa a proteína M11L que inibe o envio de sinais de apoptose dos *checkpoints* mitocondriais. Vários mecanismos são utilizados pela M11L, um deles ocorre quando uma mudança conformacional na mitocôndria, necessária à apoptose, é impedida pela proteína (SU *et. al*, 2005).

6 CONCLUSÃO

Os vírus desenvolveram diversas formas e mecanismos críticos para a modulação do sistema imune do hospedeiro, tornando possível sua adsorção, formação de progênie viável e geração de doença, durante seu ciclo de vida.

No caso dos vírus grandes de DNA, esses mecanismos são altamente desenvolvidos e permanecem como instrumentos chave na patogenia viral. Poxvírus precisam se replicar rapidamente para assegurar a formação de progênie e garantir a transmissão para um novo hospedeiro. Dessa forma, nos vírus pertencentes à família *Poxviridae* tais instrumentos de imunomodulação são ainda mais relevantes, tendo em vista que tais vírus se replicam frente a um sistema imune ativo e altamente efetivo, uma vez que não levam a doenças crônicas ou infecções latentes.

A inibição ou subversão do sistema imune é comumente mediada por proteínas virais que possuem homologia com as proteínas que constituem o sistema imune do hospedeiro. Esse fato indica que, provavelmente, essas proteínas foram adquiridas durante a co-evolução vírus-hospedeiro. Genes virais codificadores de proteínas estruturalmente semelhantes à proteínas celulares como, por exemplo, os viroreceptores, foram adquiridos pelo genoma viral devido a sua importância, e são utilizados de maneira bem sucedida na modulação do sistema imune.

Sabemos que uma infinidade de caminhos imunológicos são modulados pelas diferentes espécies virais, sendo de especial destaque aqueles que controlam múltiplas funções na célula hospedeira.

É importante ressaltar, porém, que muitas outras etapas do sistema imune são moduladas pelos vírus. Apesar disso, poucos vírus compartilham os mesmos tipos de proteínas imunomodulatórias e sua modulação, mesmo de um caminho em comum, é feita através de proteínas e sistemas próprios ao vírus, fator que exalta a diversidade dos vírus e sua complexidade.

Muito pode ser aprendido a partir dos estudos feitos com proteínas imunomodulatórias sobre as respostas imunes e inflamatórias do hospedeiro. A identificação e análise das estratégias imunomodulatórias utilizadas pelos vírus, no contexto da infecção viral, podem levar

a um melhor entendimento do sistema imune e da interação entre os vírus e seus hospedeiros, além do conhecimento de importantes fatores de virulência virais. Isso nos ajudará no tratamento de infecções virais, no desenvolvimento de antivirais e vacinas mais eficientes, além do desenvolvimento de melhores vetores virais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCAMÍ, A. Viral mimicry of cytokines, chemokines and their receptors. **Nature Reviews Immunology**. SI, v. 3, p. 36–50, 2003.

ALCAMÍ, A. New insights into the subversion of the chemokine system by poxviruses. **European Journal of Immunology**. Espanha, v. 37, p. 880–883, 2007.

ALCAMÍ, A. et al. Blockade of chemokine activity by a soluble chemokine binding protein from vaccinia virus. **Journal of Immunology**. SI, v. 160, p. 624-633, 1998.

ALCAMÍ, A e SMITH, G. L. A soluble receptor for interleukin-1 beta encoded by vaccinia virus: a novel mechanism of virus modulation of the host response to infection. **Cell**. SI, v. 71, p. 153-167, 1992.

ALCAMÍ, A e SMITH, G. L. Vaccinia, cowpox and camelpox viruses encode soluble gamma interferon receptors with novel broad species specificity. **Journal of Virology**. SI, v, 69, p. 4633-4639, 1995.

ALCAMÍ, A e SMITH, G. L. The vaccinia virus soluble interferon-gamma receptor is a homodimer. **The Journal of general Virology**. Oxford, v. 83, p. 545-549, 2002.

ALCAMÍ, A e KOSZINOWSKI, U. H. Viral mechanisms of immune evasion. **Trends in Microbiology**. Cambridge, v. 8, p. 410-418, 2000.

ALCAMÍ, A.; SYMONS, J. A.; SMITH, G. L. The vaccinia virus soluble alpha/beta interferon (IFN) receptor binds to cell surface and protects cells from the antiviral effects of IFN. **Journal of Virology**. SI, v. 74, p. 11230-11239, 2000.

ANDERSON, J. B.; SMITH, S. A.; KOTWAL, G. J. Vaccinia virus complement control protein inhibits hyperacute xenorejection. **Transplantation Proceedings**. S.I, v. 34, p. 1083–1085, 2002.

BANDI, P.; PAGLIACCETTI, N. e ROBEK, M. D. Inhibition of type III interferon activity by Orthopoxvirus immunomodulatory proteins. **Journal of Interferon and Citokine Research**. Connecticut, v. 30, p. 123-134, 2010.

BARRETT, W. J. M135R Is a Novel Cell Surface Virulence Factor of Myxoma Virus. **Journal of Virology**. Canadá, v. 81, n. 81, p. 106-114, 2007.

BEATTIE, E.; PAOLETTI, E e TARTAGLIA, J. Distinct patterns of IFN sensitivity observed in cells infected with vaccinia K3L- and E3L- mutant viruses. **Virology**. S.I, v.210, p.254–263, 1995.

BERNET, J. et al. Viral mimicry of the complement system. **Journal of Biosciences**. SI, v. 28, p. 249-264, 2003.

BRICK, D. J. et al. Shope fibroma virus RING finger protein NIR binds DNA and inhibits apoptosis. **Virology**. SI, v. 249, p. 42-51, 1998.

BRICK, D. J. et al. Ectromelia virus virulence factor p28 acts upstream of caspase-3 in response to UV light-induced apoptosis. **Journal of General Virology**. SI, v. 81, p. 1087-1097, 2000.

BUGERT, J. J e DARAI, G. Poxvirus Homologues of Cellular Genes. **Virus Genes**. Alemanha, v. 21, p. 111-113, 2000.

BULLER, R. M. et al. Efficacy of oral active ether lipid analogs of cidofovir in lethal mousepox model. **Virology**. SI, v. 318, p. 474-481, 2004.

BYUN, M. et al. Cowpox virus exploits the endoplasmic reticulum retention pathway to inhibit MHC class I transport to the cell surface. **Cell Host Microbe**. St. Louis, v. 2, p. 306-315, 2007.

BYUN, M. et al. Two mechanistically distinct immune evasion proteins of cowpox virus combine to avoid antiviral CD8 T cells. **Cell Host Microbe**. SI, v. 19, p. 422-432, 2009.

DABBAGH, K. et al. Local blockade of allergic airway hyperreactivity and inflammation by the poxvirus-derived pan-CC-chemokine inhibitor. **Journal of Immunology**. S.I. v. 165, p. 3418–3422, 2000.

CHEN, N. et al. Virulence differences between monkeypox virus isolates from West Africa and the Congo basin. **Virology**. SI, v. 319, p. 176-184, 2005.

COLAMONICI, O. R. et al. Vaccinia virus B18R gene encodes a type I interferon-binding protein that blocks interferon alpha transmembrane signaling. **The Journal of Biological Chemistry**. Estados Unidos, v. 270, p. 15974-15978, 1995.

DASGUPTA, A. et al. Cowpox virus evades CTL recognition and inhibits the intracellular transport of MHC class I molecules. **Journal of Immunology**. Estados Unidos, v. 178, p. 1654-1661, 2007.

DAVIS-POYNTER, J. N; FARREL, E. H. Masters of deception: A review of herpesvirus immune evasion strategies. **Immunology and Cell Biology**. Austrália, v. 74, p. 513-522, 1996.

EVERETT, H e McFADDEN, G. Apoptosis: an innate immune response to virus infection. **Trends in Microbiology**. SI, v. 7, p. 160-165, 1999.

EVERETT, H e McFADDEN, G. Poxviruses and apoptosis: a time to die. **Current Opinion in Microbiology**. SI, v. 5, p. 395-402, 2002.

FLEMING, S. B. et al. A homolog of interleukin-10 is encoded by the poxvirus Orf virus. **Journal of Virology**. SI, v. 85, p. 55-69, 1997.

GRAHAM, K. A. et al. The T1/35kDa family of poxvirus-secreted proteins bind chemokines and modulate leukocyte influx into virus-infected tissues. **Virology**. SI, n. 229, p. 12-24, 1997.

GIL, J. et al. MC159L protein from the poxvirus molluscum contagiosum virus inhibits NFkappa B activation and apoptosis induced by PKR. **The Journal of general Virology**. SI, v. 82, p. 3027-34, 2001.

GIRGIS, M. N. et al. The Vaccinia virus complement control protein modulates adaptive immune responses during infection. **Journal of Virology**. Filadélfia, v. 85, p. 2547-2556, 2011.

GUERIN, J. L. et al. Myxoma virus leukemia-associated protein is responsible for major histocompatibility complex class I and Fas-CD95 down-regulation and defines scrapins, a new group of surface cellular receptor abductor proteins. **Journal of Virology**. SI, v.76, p. 2912-2923, 2002.

HAGA, I. R.; BOWIE, A. G. Evasion of innate immunity by vaccinia virus. **Parasitology**. Irlanda, v.130, p. 11-25, 2005.

HAIG, D.M. Subversion and piracy: DNA viruses and immune evasion. **Research in Veterinary Science**. SI, v. 70, p. 205-219, 2001.

HORST, D.; RESSING, M. E.; WIERTZ, E. J. Exploiting human herpesvirus immune evasion for therapeutic gain: potential and pitfalls. **Immunology and Cell Biology**. Utrecht, v.89, p. 359-366, 2011.

HU, F. Q.; SMITH, C. A.; PICKUP, D. J. Cowpox virus contains two copies of an early gene encoding a soluble secreted form of the Type II TNF receptor. **Virology**. SI, v. 204, p. 343–56, 1991.

HUMRICH, J. Y. et al. Vaccinia virus impairs directional migration and chemokine receptor switch of human dendritic cells. **European Journal of Immunology**. SI, v. 37, p. 880–883, 2007.

JOHNSTON, J.B.; McFADDEN, G. Poxvirus Immunomodulatory Strategies: Current Perspectives. **Journal of Virology**. Canadá, v. 77, n. 11, p. 6093-6100, 2003.

ISAACS, S. N.; KOTWAL, G. J. e MOSS, B. Vaccinia virus complement-control proteins preventes antibody-dependent complement-enhanced neutralization of infectivity and contributes to virulence. **Proceedings of the Natural Academy of Science of United States of America**. USA, v. 89, p. 628-632, 1992.

JHA, P and KOTWAL, G. Vaccinia complement control protein: Multi-functional protein and a potential wonder drug. **Journal of biosciences**. Louisville, v. 28, p. 265-271, 2003.

KOTWAL, G. J. Poxviral mimicry of complement and chemokine system components: what's the end game? **Immunology Today**. USA, v. 21, p. 242 – 248, 2000.

KOTWAL G. J; MILLER C. G; JUSTUS D. E. The inflammation modulatory protein of cowpox virus drastically diminishes the tissue damage by down-regulating infiltration of lymphocytes. **Molecular and Cell Biochemistry**. SI, v. 185 (1-2), p. 39-46, 1998.

LALANI, A. S. et al. Role of the myxoma virus soluble CC-chemokine inhibitor glycoprotein, M-T1, during myxoma virus pathogenesis. **Virology**. SI, v. 256, p. 233–45, 1999.

LALANI, A. S.; BARRETT, J. W.; McFADDEN, G. Modulating chemokines: more lessons from viruses. **Immunology Today**. California, v. 21, p. 100-106, 2000.

LATEEF, Z. et al. The chemokine-binding protein encoded by the poxvirus orf virus inhibits recruitment of dendritic cells to sites of skin inflammation and migration to peripheral lymph nodes. **Cellular Microbiology**. SI, v. 12, p. 665–676, 2010.

LI, P. et al. Disruption of MHC Class II-restricted antigen presentation by Vaccinia virus. **The Journal of Immunology**. SI, v. 175, p. 6481-6488, 2005.

LISZWESKY, M. K. et al. Smallpox inhibitor of complement enzymes (SPICE): regulation of complement activation on cells and mechanism of its cellular attachment. **Journal of Immunology**. SI, v. 181, p. 4199-4207, 2008.

LIU, L. Y. et. al. The viral anti-inflammatory chemokinebinding protein M-T7 reduces intimal hyperplasia after vascular injury. **Journal of Clinical Investigation**. S. I. v. 105, p. 1613 – 1621, 2000.

LOPAREV, V. N. A third distinct tumor necrosis factor receptor of orthopoxviruses. **Proceedings of the Natural Academy of Science of United States of America**. USA, v. 95, p. 3786-3791, 1998.

MAHALINGAM, S and KARUPIAH, G. Modulation of chemokines by poxvirus infections. **Current opinion in Immunology**. Austrália, v. 12, p. 409-412, 2000.

MANSOURI, M. et. al. The PHD/LAP-domain protein M153R of myxoma virus is a ubiquitin ligase that induces the rapid internalization and lysosomal destruction of CD4. **Journal of Virology**. SI, v77, p1427–1440, 2003.

MARTINA, B. E. et al. Cowpox virus transmission from rats to monkeys, the Netherlands. **Emerging Infectious diseases**. SI, v. 12 (6), p. 1005–1007, 2006.

MILLER, C.G.; SHCHELKUNOV, S. N.; KOTWAL, G. J. The cowpox virus- encoded homolog of the vaccinia virus complement control protein is an inflammation modulatory protein. **Virology**. SI, p. 229: 126, 1997.

MOLINO, A. C.; FLEISCHER, A. B. and FELDMAN, S. R. Patient demographics and utilization of health care services for molluscum contagiosum. **Pediatric Dermatology**. SI, v. 21 (6), p. 628–632, 2004.

MORESSI, E. **Metodologia de Pesquisa**. Brasília, SI, 2003.

MOSS, B. **Poxviridae: the viruses and their replication**. Fields virology. New York, v. 22, p. 2637-2671, 1996.

MOSS, B. **Poxviridae: the viruses and their replication**. Fields virology. Filadélfia, 4ed, p. 2849-2883, 2001.

MOULTON, A. E. et al. Ectromelia virus inhibitor of complement enzymes protects intracellular mature virus and infected cells from mouse complement. **Journal of Virology**. Missouri, v. 84, p. 9128-9139, 2010.

NOVICK, D. et al. Interleukin-18 Binding Protein: A Novel Modulator of the Th1 Cytokine Response. **Immunity**. SI, v. 10, p. 127-136, 1999.

PANUS, J. F. et al. Cowpox virus encodes a fifth member of the tumor necrosis factor receptor family: a soluble, secreted CD30 homologue. **Proceedings of the Natural Academy of Science of United States of America**. USA, v. 99, p. 8348-53, 2002.

REHM, E. K. et al. Vaccinia virus decreases major histocompatibility complex (MHC) class II antigen presentation, T-cell priming, and peptide association with MHC class II. **Immunology**. USA, v. 128, p. 381-392, 2009.

REHM, E. K. et al. Vaccinia virus A35R inhibits MHC class II antigen presentation. **Virology**. USA, v. 397, SI, 2011.

ROSENGARD, M. A. et al. Variola virus immune evasion design: expression of a highly efficient inhibitor of human complement. **Proceedings of the Natural Academy of Science of United States of America**. SI, v.99 (13), p. 8808-13, 2002.

RUIZ-ARGUELLO, M. B. et al. An Ectromelia Virus Protein That Interacts with Chemokines through their Glycosaminoglycan Binding Domain. **Journal of Virology**. Espanha, v. 82, n. 2, p. 917-926, 2008.

SARAIVA, M e ALACAMÍ, A. CrmE, a novel soluble tumor necrosis factor receptor encoded by poxviruses. **Journal of Virology**. SI, v. 75, p. 226-33, 2001.

SEET, B. T. et al. Poxviruses and immune evasion. **Annual Review of Immunology**. Canadá, v. 21, p. 377-423, 2003.

SEET, B. T. e McFADDEN, G. Viral chemokine-binding proteins. **Journal of Leukocyte Biology**. Canadá, v. 72, p. 24-34, 2002.

SMITH, G. L.; SYMONS, J. A. e ALCAMÍ, A. Poxviruses: interfering with interferon. **Semin. Virol.** SI, v. 8, p. 409-418, 1998.

SMITH, V. P.; BRYANT, N. A. e ALCAMÍ, A. Ectromelia, vaccinia and cowpox viruses encode secreted interleukin-18-binding proteins. **Journal of general Virology**. SI, v. 81, p. 1223-1230, 2000.

SMITH, C. A. et al. Cowpox virus genome encodes a second soluble homologue of cellular TNF receptors, distinct from CrmB, that binds TNF but not LT α . **Virology**. SI, v. 223, p. 132-47, 1996.

SU, J. et al. Myxoma Virus M11L Blocks Apoptosis through Inhibition of Conformational Activation of Bax at the Mitochondria. **Journal of Virology**. Canadá, v. 80, n.3, p. 1140-1151, 2006.

SYMONS, J. A.; ALCAMÍ, A e SMITH, G. L. Vaccinia virus encodes a soluble type I interferon receptor of novel structure and broad species specificity. **Cell**. SI, v. 81, p. 551-560, 1995.

TEWARI, M.; DIXIT V. M. Fas-and tumor necrosis factor- induced apoptosis is inhibited by the poxvirus crmA gene product. **The Journal of Biological Chemistry**. SI, v. 270(7), p. 3255-60, 1995.

UPTON, C. et al. Myxoma virus expresses a secreted protein with homology to the tumor necrosis factor receptor gene family that contributes to viral virulence. **Virology**. SI, v. 184, p. 370-82, 1991.

VANCOVÁ, I.; BONNARDIERE, C and KONTESEK, P. Vaccinia virus protein B18R inhibits the activity and cellular binding of the novel type interferon- δ . **Journal of General Virology**. SI, v. 79, p. 1647-1649, 1998.

VANDEVENNE, P.; SADZOT-DELVAUX, C.; PIETTE, J. Innate immune response and viral interference strategies eveloped by Human Herpesviruses. **Biochemical Pharmacology**, S.I, v. 80, p. 1955-1972, 2010. ‘

VOGEL, S. et al. The Munich Outbreak of Cutaneous Cowpox Infection: Transmission by Infected Pet Rats. **Acta Dermato-venereologica**. Alemanha, v. 91, SI, 2011.

VOSSSEN. et al. Viral immune evasion: a masterpiece of evolution. **Immunogenetics**. Amsterdã, v.54, p. 527-542, 2002.

XIANG, Y and MOSS, B. IL-18 binding and inhibition of interferon g induction by human poxvirus-encoded proteins. **Medical Sciences**. USA, v. 96, p. 11537-11542, 1999.

XIANG, Y. et al. Blockade of Interferon Induction and Action by the E3L Double-Stranded RNA Binding Proteins of Vaccinia Virus. **Journal of Virology**. SI, v. 76, n. 10, p. 5251-5259, 2002.

XIANG, Y and MOSS, B. Molluscum Contagiosum Virus Interleukin-18 (IL-18) Binding Protein Is Secreted as a Full-Length Form That Binds Cell Surface Glycosaminoglycans through the C-Terminal Tail and a Furin-Cleaved Form with Only the IL-18 Binding Domain. **Journal of Virology**. SI, v. 77, n. 4, p. 2623-2630, 2003.

XU, X. M.; NASH, P. e McFADDEN, G. Myxoma virus expresses a TNF receptor homolog with two distinct functions. **Virus Genes**. Canadá, v. 21, p. 97-109, 2000.

ZHOU, Q. et al. Target protease specificity of the viral serpin CrmA. Analysis of five caspases. **Journal of Biological Chemistry**. SI, v. 272, p. 7797-7800, 1997.

WAZLAWICK, R. S. **Metodologia de Pesquisa para Ciência da Computação**, Editora Elsevier, 2009.