

Bruno Eduardo Fernandes Mota

Modelos de infecção localizada em camundongos utilizando o *Vaccinia virus*: implicações para estudos de resposta imune do hospedeiro, terapêutica e variabilidade fenotípica destes vírus.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como pré-requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas (Opção Microbiologia).

Orientadora: Profa Dra Erna Geessien Kroon

Co-orientadora: Profa. Dra. Giliane de Souza Trindade

Belo Horizonte

Agosto/2010



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

# Modelos de infecção localizada em camundongos utilizando o *Vaccinia virus*: implicações para estudos de resposta imune do hospedeiro, terapêutica e variabilidade fenotípica destes vírus.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como pré-requisito para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas (Opção Microbiologia).

"O correr da vida embrulha tudo,  
a vida é assim: esquenta e esfria,  
aperta e daí afrouxa,  
sossega e depois desinquieta.  
O que ela quer da gente é coragem.  
O que Deus quer é ver a gente  
aprendendo a ser capaz  
de ficar alegre a mais,  
no meio da alegria,  
e ainda mais alegre  
ainda no meio da tristeza!  
A vida inventa!  
A gente principia as coisas,  
no não saber por que,  
e desde aí perde o poder de continuação  
porque a vida é mutirão de todos,  
por todos remexida e temperada.  
O mais importante e bonito, do mundo, é isto:  
que as pessoas não estão sempre iguais,  
ainda não foram terminadas,  
mas que elas vão sempre mudando.  
Afinam ou desafinam. Verdade maior.  
Viver é muito perigoso; e não é não.  
Nem sei explicar estas coisas.  
Um sentir é o do sentente, mas outro é do sentidor."

*João Guimarães Rosa, fragmento do livro Grande Sertão Veredas.*

## Agradecimentos

Talvez a tarefa mais difícil de uma tese de Doutorado não seja os quatro anos de laboratório, as disciplinas cursadas, qualificação, artigo, escrita da tese... Para mim, o mais difícil é agradecer a todos aqueles que de alguma forma participaram desta minha caminhada. E digo que não foram poucos: família, amigos, professores, cada um adicionando o seu jeito e tornando a minha tese mais do que um simples pedaço de papel que devo fazer para conseguir o diploma; esta tese é na verdade a somatória de todos os meus anos vividos na UFMG, minhas experiências dentro e fora do laboratório, profissionais ou não, alegrias e tristezas, ânimo e depressão, vontade de conquistar o mundo e vontade de ir pra casa e não sair nunca mais de lá... “O que ela quer da gente é coragem”! Já adianto para as pessoas que estão agora lendo esta parte que não citarei muitos nomes. Pode parecer injusto, mas todos aqueles que participaram desta empreitada certamente sabem o valor que eles tem para mim e não quero correr o risco de me esquecer de alguém.

Agradeço à Dra Maria Isabel Maldonado Coelho Guedes pela criteriosa revisão desta tese e ao Dr. Remo Castro Russo pela grande ajuda com a formatação das figuras.

Quando penso em minha carreira acadêmica, tudo se iniciou no Departamento de Botânica da UFMG com a professora Rosy Mary dos Santos Isaías, minha primeira orientadora. Sempre alegre e receptiva, ela nos acolheu em seu laboratório (mesmo sabendo que estávamos no primeiro período!) e nos ensinou a beleza da metodologia científica e que um bom professor está acima de todos os egos. Obrigado a todos do Laboratório de Anatomia Vegetal pela amizade e por me iniciarem na carreira científica.

Em 2002, ingressei no Laboratório de Vírus sob a orientação da professora Erna Geessien Kroon. Com seu jeito único de ser, me ensinou várias coisas que vão desde estruturas de partículas virais, estratégias de replicação de genomas, até o amor incondicional pela ciência e a dedicação incontestável ao trabalho. Obrigado Erna! À minha co-orientadora e amiga professora Giliane de Souza Trindade, que também foi fundamental nesta caminhada com sua orientação científica e pessoal e por sempre acreditar em mim desde a minha iniciação científica! Valeu Gi!

Agradeço também aos demais professores do laboratório: Professor Cláudio Antônio Bonjardim pelos conselhos, pela visão crítica da ciência e pela ajuda durante todos estes anos (já são quase dez!!!) e professor Paulo César Peregrino Ferreira, pelo

auxílio com os protocolos no laboratório (“na minha época a gente fazia tudo à mão!”), pelos conselhos científicos, pelos passes que recebi dele no futebol e pelas noites no bar do Turco!

Todo este trabalho seria impossível sem a ajuda de Ilda Gama, Maria Aparecida, Priscila Antunes, Andreza de Carvalho, Ângela Lopes e João Rodrigues dos Santos, nossos “anjos-da-guarda” do laboratório. Obrigado pelo trabalho e pelo companheirismo!

Agradeço também ao Instituto René Rachou da Fundação Oswaldo Cruz, no nome do Dr Marco Antônio da Silva Campos e o Departamento de Bioquímica e Imunologia da UFMG no nome da professora Leda Vieira Quércia, pelo auxílio no trabalho com animais. Ao professor Flávio Guimarães da Fonseca do Laboratório de Virologia Comparada pelas críticas construtivas e por sua participação neste projeto.

Ao grupo de Poxvírus (Laboratório de vírus da UFMG, Escola de Veterinária da UFMG e Instituto René Rachou/FIOCRUZ) pelo companheirismo e auxílio durante todos estes anos. Fazendo a retrospectiva destes anos, vejo porque este grupo é disparado o melhor do Brasil na área: pesquisadores competentes, trabalho em conjunto e amor pela ciência!

Ao grupo de Poxvírus do Centro de Controle e Prevenção de Doenças nos EUA, no nome da Dra Inger K. Damon, pela receptividade, carinho e acima de tudo, pela orientação científica. Agradeço também ao “Animal Research Branch” do CDC em nome de Marveia Daniel e Sandra Compton pela assistência no trabalho com animais.

Aos amigos pesquisadores que participaram de minha formação científica: Dr Daniel dos Santos Mansur, por me ensinar que a leitura é a parte mais importante do trabalho científico e ao Dr Luiz Felipe Leomil Coelho, por me ensinar que humildade e competência são características essenciais de um pesquisador. Adicionalmente, agradeço aos dois pela amizade sincera. Valeu gente!

Agradeço à “família Labvírus” por todos estes anos de companheirismo, cumplicidade e aprendizado. É simplesmente impraticável descrever tudo que vivi neste lugar, afinal são quase dez anos!!! (Tenho que repetir isso toda vez senão não acredito!). Pelos anos de trabalho na bancada com todas suas frustrações e algumas alegrias, pelas festas, pelo futebol, pelas discussões científicas, pelo cigarro e café na cantina, pelas reuniões de laboratório sempre tumultuadas, pelas viagens, pelos congressos, pelos almoços no Bodão ou no Chico, pelas “escapadas” na hora do almoço pra beber cerveja, pelo truco que terminou de forma inesperada, pelas conversas pós-expediente e

sobretudo pela amizade de todos estes anos: AMO TODOS VOCÊS, MUITO OBRIGADO POR TUDO!!!

À “família Biologia” por me ensinar que a diversidade é o que nos torna mais fortes. Conviver com pessoas tão diferentes de mim durante todos estes anos foi um aprendizado único na minha vida. À minha turma de graduação, turma Prof. Ângelo Machado, pelos inúmeros momentos inesquecíveis que passamos juntos e que ainda vamos passar. A união e companheirismo desta sala me ensinou que, antes de competidores por vagas no mercado de trabalho, somos amigos verdadeiros. Valeu moçada! Ao “galeril” do Diretório Acadêmico da Biologia. Esta tese simplesmente não existiria sem eles. Se digo que tenho quase dez anos de Laboratório, tenho quase 11 anos de D.A.!!! Foi neste ambiente alegre e descontraído que aprendi que a ciência não se faz só nos laboratórios, ela está em todo lugar (inclusive no Buteco da Bio!!!). As amizades que fiz no D.A., novas ou antigas, nunca mais serão esquecidas. Quisera eu que todo lugar no mundo fosse como este... Valeu demais galera!

À minha família: meu pai (*in memoriam*) e minha mãe por tudo, meus irmãos e cunhadas, meus tios e primos, minha vó por me ajudar a entrar na universidade. Obrigado por tudo, eu sou apenas o reflexo de vocês!

À Fernanda, que com seu jeito alegre e carinhoso, tornou minha vida mais feliz... Obrigado pelo seu companheirismo incondicional, eu nunca teria chegado até aqui sem você!

À todos aqueles que participaram da minha vida e que, de uma forma ou de outra, contribuíram de forma essencial para este trabalho. Como eu disse anteriormente, esta não é só uma tese e sim um apanhado de experiências de vida, é um retrato de quem sou hoje...

# Sumário

Lista de abreviaturas .....	VIII
Lista de Tabelas .....	X
Lista de Figuras.....	X
1. Resumo.....	12
2. Abstract .....	13
3. Introdução .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.1 -Taxonomia.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.1.1 -Família <i>Poxviridae</i> .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.1.2 -Gênero <i>Orthopoxvirus</i> (OPV) .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.2 -Características estruturais e ciclo de multiplicação .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.2.1 -Estrutura da partícula .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.2.2 -Estrutura do genoma .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.2.3 -Ciclo de multiplicação .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.3- História natural do gênero <i>Orthopoxvirus</i> .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.3.1- Evolução e distribuição geográfica atual .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.3.2- <i>Vaccinia Bovina</i> (VB).....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.4 -Interação vírus-hospedeiro .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.4.1 –Patogênese.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.4.2 -Resposta imune do hospedeiro .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.4.3 -A arte da guerra (virocamuflagem, viromimetismo e virotransdução) .....	<b>Error!</b> <b>Bookmark not defined.</b>
3.5 –Histórico: <i>Vaccinia virus</i> na medicina preventiva .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.5.1 -Vacinação contra a varíola .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.5.2 -Efeitos adversos da vacinação .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
3.5.3 -Terapêutica contra infecções por OPV .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
4. Justificativa.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
5. Objetivos .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
5.1 -Objetivos gerais.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
5.2 -Objetivos específicos.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
6. Material e Métodos.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
6.1 -Vírus e células .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
6.2 -Animais.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
6.3 –Modelos de infecção localizada .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>

6.4 –Droga terapêutica .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
6.5 -Titulação de vírus em órgãos .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
6.6 -ELISA para anticorpos anti vaccinia .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
6.7 -Testes de soroneutralização .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
6.8 -Transferência passiva de soro imune e células T.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
6.9 –Citometria de fluxo.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
6.10 –Comparação das ORFs de diferentes linhagens de VACV .	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
6.11 -Análises estatísticas .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
7. Resultados .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
7.1 -Modelo de escarificação de cauda em camundongos selvagens C57BL/6.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
7.2 –Resposta imune do hospedeiro.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
7.2.1 -Infecção em animais deficientes em mediadores inflamatórios	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
7.2.2 -Infecção em animais deficientes na imunidade adaptativa	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
7.3 – Terapêutica para infecção por amostras de VACV.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
7.3.1 –Infecção pelo VACV-WR em modelo intradérmico .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
7.3.2 – Eficácia do Imiquimod no tratamento de infecção pelo VACV-WR	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
7.3.3 - Eficácia do Imiquimod no tratamento de infecção por amostras selvagens e vacinais de VACV .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
7.4 –Diversidade genética das amostras de VACV.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
8. Discussão .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
9. Conclusões.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
10. Perspectivas .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
11. Bibliografia .....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>
12. Anexo.....	<b>Error! Bookmark not defined.</b>

## Lista de abreviaturas

$\mu$ L: microlitros.

BSA: *Bovine serum albumin*, albumina sérica bovina.

CD: *cluster differentiation*, grupos de diferenciação.

CMLV: *Camelpox virus*

CPXV: *Cowpox virus*

*crmA*: *cytokine response modifier A*, modificador da resposta de citocinas.

d.p.i.: dias pós-infecção.

eIF2  $\alpha$ : *eukariotic initiation factor 2  $\alpha$* , fator de iniciação eucarioto 2 $\alpha$ .

EV: *extracellular virions*, partículas infecciosas extracelulares.

Fc: Fração cristalizável das imunoglobulinas, formada pela porção constante das cadeias pesadas destas.

G: Gauge, medida do diâmetro e comprimento de agulhas.

g: gramas.

HHV: *human herpesvirus*, herpesvirus humano.

HIV: *human immunodeficiency virus*, vírus da imunodeficiência humana.

IFN: interferons.

Ig: imunoglobulinas.

IL: interleucinas.

iNOS: *inducible nitric oxide synthetase*, óxido nítrico sintetase induzível.

ITR: *inverted terminal repetitions*, repetições terminais invertidas.

IV: vírus imaturos.

Kpb: mil pares de base.

M: molaridade.

MEM: *Minimum Eagle Medium*, meio mínimo de Eagle.

mg/Kg: miligramas por quilograma.

mg/mL: miligramas por mililitros.

MHC: *major histocompatibility complex*, complexo principal de histocompatibilidade.

MPXV: *Monkeypox virus*

MV: *mature virions*, partículas infecciosas intracelulares.

N: normalidade.

NFκB: *nuclear factor κB*, fator de transcrição κB.

NK: *natural killers*, células matadoras naturais.

nm: nanômetros.

NO: *nitric oxide*, óxido nítrico.

OMS: Organização Mundial de Saúde.

OPV: gênero *Orthopoxvirus*.

pb: pares de base.

PBS: *phosphate buffer solution*, tampão fosfato.

PKR: *protein kinase dsRNA-dependent*, proteína quinase dependente de RNA de fita dupla.

PRR: *pattern recognition receptors*, receptores de reconhecimento de padrões moleculares.

*rag*: *recombination activator gene*, gene ativador da recombinação.

rpm: rotações por minuto.

SFB: soro fetal bovino.

Th1/2: *T helper 1/2*, perfil de ativação das células T auxiliares (CD4<sup>+</sup>).

TLR: *Toll like receptors*, receptores tipo Toll.

TNF: fator de necrose tumoral.

u.f.p.: unidades formadoras de placa.

U/mL: unidades internacionais por mililitro.

VACV: *Vaccinia virus*

VARV: *Variola virus*

VCP: *viral complement control protein*, proteína viral inibidora do complemento.

VIG: *Vaccinia immune globulin*, imunoglobulina anti vaccinia.

WV: *wrapped virion*, vírus envelopados.

## Lista de Tabelas

- Tabela 1: Espécies do gênero Orthopoxvirus (OPV), com seus respectivos hospedeiros. ....**Error! Bookmark not defined.**
- Tabela 2: Polimorfismos em genes de evasão do hospedeiro entre as amostras de VACV S2V, WR e Acambis2000. ....**Error! Bookmark not defined.**

## Lista de Figuras

- Figura 1: Microscopia eletrônica de transmissão de Vaccinia virus em coloração negativa. **Error! Bookmark not defined.**
- Figura 2: Figura esquemática do genoma dos poxvírus.....**Error! Bookmark not defined.**
- Figura 3: Esquema do ciclo de multiplicação de poxvírus.....**Error! Bookmark not defined.**
- Figura 4: Desenho esquemático ilustrando as diversas formas de evasão imune empregadas pelos poxvírus. .... 11
- Figura 5: *Mapa Mundi* mostrando a distribuição geográfica aproximada dos principais OPV (excluindo o VARV, que tinha distribuição global antes de sua erradicação)..... 23
- Figura 6: Modelo de escarificação de cauda em camundongos selvagens C57BL/6. ....**Error! Bookmark not defined.**
- Figura 7: Sinais clínicos de animais deficientes em citocinas próinflamatórias após infecção com o VACV-WR.....**Error! Bookmark not defined.**
- Figura 8: Infecção de animais imunodeficientes da linhagem *rag1*<sup>-/-</sup> com VACV-WR por \_\_\_\_\_ escarificação \_\_\_\_\_ de cauda.....49
- Figura 9: Sinais clínicos de animais *rag1*<sup>-/-</sup> infectados com o VACV-WR por escarificação de cauda. ....**Error! Bookmark not defined.**

Figura 10: Sinais clínicos e multiplicação viral em animais deficientes de células B ( $\mu$ MT)..**Error! Bookmark not defined.**

Figura 11: Infecção de animais atímicos NUDE (nu/nu) e seus correspondentes heterozigotos (nu/+) com VACV-WR por escarificação de cauda. ....**Error! Bookmark not defined.**

Figura 12: Transferência passiva de células T de animais C57BL/6 a animais rag1-/- protege completamente estes da morbidade/mortalidade causada pelo VACV neste modelo.....**Error! Bookmark not defined.**

Figura 13: Cinética da lesão em animais passivamente inoculados com células T de animais C57BL/6. ....**Error! Bookmark not defined.**

Figura 14: Funcionalidade de esplenócitos em animais rag1-/- após transferência passiva com células de animais C57BL/6.....**Error! Bookmark not defined.**

Figura 15: Inoculação com o VACV-WR em modelo murino de infecção intradérmica. ....**Error! Bookmark not defined.**

Figura 16: Imiquimod no tratamento de infecção localizada pelo vírus protótipo VACV-WR. ....**Error! Bookmark not defined.**

Figura 17: Cinética macroscópica das lesões causadas em animais Balb/c pelo vírus protótipo VACV-WR na dose de  $10^5$  u.f.p.....**Error! Bookmark not defined.**

Figura 18: Eficácia do Imiquimod no tratamento de infecção localizada pelo vírus zoonótico S2V.....**Error! Bookmark not defined.**

Figura 19: Cinética macroscópica das lesões causadas em animais Balb/c pelo vírus zoonótico S2V na dose de  $10^6$  u.f.p.....**Error! Bookmark not defined.**

Figura 20: Eficácia do Imiquimod no tratamento de infecção localizada pelo vírus vacinal Acambis2000.....**Error! Bookmark not defined.**

Figura 21: Cinética de evolução macroscópica das lesões causadas em animais Balb/c pelo vírus vacinal Acambis2000 na dose de  $10^6$  u.f.p.....**Error! Bookmark not defined.**

Figura 22: Localização das ORFs selecionadas para comparação no genoma da amostra VACV-WR. ....**Error! Bookmark not defined.**

Figura 23: Polimorfismos em genes de interação com o hospedeiro.**Error! Bookmark not defined.**

## 1. Resumo

**Palavras-chave:** *Vaccinia virus* (VACV), modelos de infecção localizada, imunidade e terapêutica.

A família *Poxviridae* contém os maiores vírus animais conhecidos, que possuem um amplo arsenal de genes dedicados à evasão do sistema imune e determinação do espectro de hospedeiros. Dentre os membros desta família, destacam-se o patógeno humano *Variola virus* (VARV) e o vírus zoonótico *Vaccinia virus* (VACV), que foi utilizado para vacinação na campanha de erradicação da varíola, além de causar surtos zoonóticos na Ásia e Brasil. A infecção por VACV, seja ela natural ou por vacinação, é adquirida através de pequenas abrasões na pele e pode levar a complicações em pacientes imunossuprimidos. Atualmente, não existem tratamentos para estas infecções.

Apesar da grande importância do VACV para a saúde pública, pouco se conhece sobre a biologia deste vírus e de sua patogênese no hospedeiro. Isto porque a maior parte dos estudos em modelos animais busca mimetizar a patogênese da varíola em humanos e emprega vias de inoculação que causam doença sistêmica, como as vias intranasal e intraperitonal. As vias localizadas, por sua vez, se assemelham mais à via de infecção natural pelo VACV e mimetizam os parâmetros clínicos e imunológicos da infecção por estes vírus zoonóticos.

Portanto, os objetivos deste trabalho foram avaliar a resposta imune à infecção primária, além de testar uma nova terapêutica para casos de infecção pelo VACV e avaliar como a diversidade genética destas amostras podem influenciar a susceptibilidade a esta droga utilizando modelos localizados de infecção em camundongos.

Os resultados obtidos mostram que tanto as células T quanto as células B são importantes no controle da infecção primária pelo VACV em modelo de escarificação de cauda. Após infecção intradérmica, o tratamento com o agonista de TLR7 imiquimod reduziu a multiplicação viral e a gravidade da lesão causadas por amostras selvagens e vacinais de VACV, mas não no caso da amostra laboratorial WR. Polimorfismos em alguns genes de interação com o hospedeiro parecem determinar esta diferença de susceptibilidade. Estes resultados possuem implicações diretas na elaboração de vacinas mais seguras e eficazes, e também no desenvolvimento de uma terapêutica no tratamento de infecções por estes vírus zoonóticos.

## 2. Abstract

**Key-words:** *Vaccinia virus* (VACV), models of localized infection, immune response and therapeutics.

The family *Poxviridae* contains the largest DNA viruses that infect animals, which possess a wide range of genes dedicated to evasion of the host immune system. Among these members, the best known are the human pathogen *Variola virus* (VARV), and the zoonotic virus *Vaccinia virus* (VACV). VACV strains were used in the global smallpox eradication campaign, and besides that, other strains from the same species are responsible for outbreaks in Asia and Brazil. Infection with VACV, natural or by means of vaccination, are acquired through direct contact and may lead to complications due to uncontrolled viral replication in immunosuppressed hosts. There is no treatment available yet and the vaccination is the only way to prevent these infections.

Despite the relevance of VACV in public health, little is known about its biology and pathogenesis. This is because most of the studies have employed models of systemic disease in laboratory animals, such as the intranasal and intraperitoneal routes of infection. The localized models, on the other hand, most closely resemble the clinical and immunological aspects of VACV natural infection.

The goals of this work were hence to employ localized models of infection with VACV in mice to study the immune response to a primary infection, besides to study the efficacy of a new drug in the treatment of these infections and evaluate if the genetic diversity of these viruses might affect their susceptibility to the treatment.

The results obtained showed that both T and B cells are crucial for full protection upon VACV infection using the tail scarification route of infection. Furthermore, the TLR7 agonist Imiquimod is efficient to treat infections with wild and vaccine strains of VACV, but not with the prototype strain WR, using intradermic inoculation in mice. Genetic analysis showed that this different susceptibility might be due to polymorphisms located in viral genes responsible for host immune evasion. Together, these data provide important insights that would be helpful to construct a safer vaccine and to develop a new therapeutic drug to treat these zoonotic infections.