

TESE DE DOUTORADO**Prevenção e controle do *Vaccinia virus* no
Brasil: padronização de um sistema
prime-boost para imunização e
determinação de seus hospedeiros
naturais**

Tese apresentada ao
Departamento de Microbiologia do
Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Minas
Gerais, como requisito parcial à
obtenção do título de Doutor em
Microbiologia

Orientadora: Profa. Erna Geessien Kroon

**UFMG
2010**

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	1
1.1. Família <i>Poxviridae</i>	1
1.1.1. Classificação	1
1.1.2. Morfologia	2
1.1.3. Estrutura do Genoma	3
1.1.4. Ciclo de multiplicação dos Poxvírus	5
1.2.1. Gênero <i>Orthopoxvirus</i> (OPV)	9
1.2.2. Ocorrência Mundial dos OPV	9
1.2.2.1. <i>Variola virus</i> e <i>Monkeypox virus</i>	9
1.2.2.2. <i>Cowpox virus</i>	12
1.2.2.3. <i>Vaccinia virus</i>	13
1.3. Ocorrência de VACV no Brasil	15
1.4. Espectro de Hospedeiros de OPV	20
1.5. Vias de Infecção e Patogênese dos poxírus	23
1.6. Vias de Eliminação	24
1.7. Estabilidade das Partículas Virais sob Condições Ambientais	26
1.8. Estratégias imunomodulatórias dos poxvírus	28
1.9. Desenvolvimento de imunógenos contra <i>Orthopoxvirus</i>	29
1.9.1. Vacinas de vírus vivos	29
1.9.2. Vacinas de vírus recombinantes	32
1.9.3. Vacinas de vírus inativados e o imunógeno BAV	33
1.9.4. Vacinas de DNA e proteínas contra OPV: glicoproteínas mais promissoras	34
II. JUSTIFICATIVA	36
III. OBJETIVOS	39
3.1. Objetivo Geral	39
3.2. Objetivos Específicos	39
IV. MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1. Sistemas Celulares	41
4.1.1. Células Vero	41
4.1.2. Fibroblastos Embrionários de Galinha (CEF)	41
4.1.3. Membrana corioalantóide de ovos embrionados	42

4.2. Vírus	42
4.2.1. Origem das amostras	42
4.2.2. Multiplicação viral em cultura celular	43
4.2.3. Purificação viral	43
4.2.4. Multiplicação da amostra viral BAV em membrana corioalantóide de ovos embrionados	44
4.2.5. Purificação da amostra viral BAV multiplicada em membrana corioalantóide de ovos embrionados	45
4.2.6. Titulação viral	45
4.2.7. Ensaio de imunofluorescência	46
4.2.8. Ensaio de infectividade viral	46
4.3. Ensaio de soroneutralização e inibição da formação de cometas	47
4.4. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	48
4.5. Sequenciamento e análise das seqüências de DNA	50
4.6. Determinação de hospedeiros e reservatórios naturais de VACV	50
4.6.1. Expedições de campo: características das áreas visitadas	50
4.6.2. Captura de roedores e coleta de espécimes clínicos	53
4.6.3. Caracterização biológica e molecular de amostras de VACV isoladas de roedores capturados em áreas acometidas pela vaccínia bovina	57
4.6.3.1. Teste de virulência dos isolados virais em camundongos Balb/c	58
4.6.4. Análise de coleções de soros de espécies de vertebrados silvestres ou mantidos em cativeiro	59
4.7. Padronização de um sistema <i>prime-boost</i> de vacinação contra OPV	61
4.7.1. Imunógeno inativado BAV	61
4.7.1.1. Inativação por b-propiolactona (Thornton, 1980 - modificado)	61
4.7.1.2. Inativação térmica de BAV	61
4.7.1.3. Testes de inativação	62
4.7.2. Vacina de DNA: B5R e H3L	63
4.7.3. Preparo dos imunógenos para vacinação	64
4.7.4. Avaliação da resposta imune pós-vacinação	65
4.7.5. Desafio de camundongos vacinados	65
4.8. Clonagem e expressão das proteínas B5R e H3L em sistema procarioto	66
4.8.1. Clonagem de B5R e H3L em pQE9	66
4.8.2. Cromatografia de afinidade	68

4.8.3. Caracterização da proteína – PAGE	69
4.9. Transferência Western	69
4.10. ELISA anti-OPV utilizando B5R e H3L recombinantes	70
FLUXOGRAMA DE TRABALHO	72
V. RESULTADOS	73
5.1. Determinação de hospedeiros e reservatórios naturais de VACV	71
5.1.1. Análise de roedores e espécimes clínicos	71
5.1.1.2. Caracterização biológica e molecular dos isolados MARV	76
5.1.1.2.1. Ensaio de imunofluorescência e de infectividade viral	76
5.1.1.2.2. Isolados MARV: inoculação em MCA e PCR para a detecção de genes específicos de OPV	80
5.1.1.2.3. Sequenciamento, comparação e análises filogenéticas dos isolados MARV	82
5.1.1.3. Testes de virulência e eliminação de MARV em camundongos Balb/c	88
5.1.2. Análise de coleções de soro de espécies de vertebrados silvestres ou mantidos em cativeiro	92
5.1.2.1. Caracterização sorológica	92
5.1.2.2. Caracterização molecular das amostras do Tocantins	95
5.2. Padronização de um sistema <i>prime-boost</i> de vacinação contra OPV	97
5.2.1. Cinética da inativação térmica da amostra viral BAV	97
5.2.2. Teste de inativação da amostra BAV	98
5.2.3. Avaliação da expressão protéica das proteínas B5R e H3L clonadas nos vetores vacinais	98
5.2.4. Testes de desafio intranasal	100
5.2.5. Teste de resposta humoral: soroneutralização e inibição de cometas	106
5.2.6. ELISA anti-OPV utilizando as proteínas B5R e H3L como antígeno	110
5.2.6.1. Construção dos plasmídios pQE9-B5R e pQE9-H3L	110
5.2.6.1. Expressão, purificação e análise de B5R e H3L recombinantes	114
5.2.6.2. ELISA IgG anti-B5R ou anti-H3L utilizando proteínas recombinantes	119
VI. DISCUSSÃO	123
VII. CONCLUSÕES	135
VIII. PERSPECTIVAS	137
IX. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	138

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Morfologia e estrutura dos poxvírus.	3
FIGURA 2: Representação esquemática das características estruturais e funcionais do genoma do <i>Vaccinia virus</i> .	4
FIGURA 3: Diagrama do ciclo de multiplicação dos poxvírus.	7
FIGURA 4: Eletromicrografia de transmissão de IMV, IEV e EEV.	8
FIGURA 5: Lesões pustulares típicas de varíola na face e membros inferiores.	10
FIGURA 6: Lesões faciais causadas por infecção de CPXV após contato com roedor selvagem	13
FIGURA 7: Peito e abdômen de uma criança de 2 anos com lesões generalizadas provocadas por VACV, causada por <i>eczema vaccinatum</i> .	14
FIGURA 8: Estados onde amostras brasileiras de VACV foram isoladas.	17
FIGURA 9: Lesões causadas por amostras de VACV	18
FIGURA 10: Representação esquemática de algumas proteínas imunomodulatórias codificadas por poxvírus.	29
FIGURA 11: Painel ilustrando os locais onde as armadilhas para roedores foram posicionadas nas propriedades rurais visitadas.	54
FIGURA 12: Relação dos sistemas de vacinação utilizados neste estudo.	66
FIGURA 13: Ensaio de imunofluorescência de células BSC-40 infectadas com MARV-M, MARV-H, MARV-B ou VACV-WR.	78
FIGURA 14: Ensaio de fenótipo de placa e curva de ciclo único de MARV-M, MARV-H, MARV-B e VACV-WR em células BSC-40.	79
FIGURA 15: Isolados MARV: inoculação em MCA e PCR de genes específicos de OPV.	81
FIGURA 16: Alinhamento das sequências dos genes <i>vgf</i> e <i>ha</i> .	83
FIGURA 17: Percentual de identidade entre OPV, baseado nas sequências nucleotídicas dos genes <i>tk</i> e <i>vgf</i> .	85
FIGURA 18: Percentual de identidade entre OPV, baseado nas sequências nucleotídicas do gene <i>ha</i> .	86
FIGURA 19: Árvores filogenéticas baseadas nas sequências nucleotídicas dos genes <i>vgf</i> (A) e <i>ha</i> (B).	87
FIGURA 20: Variação percentual média diária do peso e curva de sobrevivência de camundongos BALB/c infectados pela via intra-nasal.	89
FIGURA 21: Títulos de anticorpos neutralizantes anti-VACV no soro de camundongos BALB/c infectados pela via intra-nasal com MARV-M, MARV-B, MARV-H, GP2V ou BAV (15ºd.p.i.).	90
FIGURA 22: Detecção de VACV em fezes de camundongos infectados com MARV-M, MARV-H, MARV-B, GP2V ou BAV por PCR ou titulação.	91

FIGURA 23: Títulos virais nos intestinos de camundongos infectados MARV-M, MARV-H, MARV-B, BAV e GP2V.	92
FIGURA 24: Títulos de anticorpos neutralizantes em amostras de soro de mamíferos silvestres amazônicos.	94
FIGURA 25: Cinética de inativação térmica da amostra viral BAV.	97
FIGURA 26: Alinhamento das sequências de aminoácidos inferidas dos genes B5R e H3L, presentes nos vetores vacinais B5R-DNA e H3L-DNA.	99
FIGURA 27: Análise da expressão das proteínas B5R e H3L em células BSC-40 transfectadas com os vetores vacinais B5R-DNA e H3L-DNA.	100
FIGURA 28: Curva de sobrevivência de camundongos Balb/c vacinados com diferentes imunógenos anti-OPV e desafiados com VACV-WR.	103
FIGURA 29: Avaliação da morbidade em camundongos Balb/c vacinados com diferentes imunógenos contra OPV e desafiados com VACV-WR.	104-105
FIGURA 30: Avaliação da produção de anticorpos neutralizante anti-IMV em camundongos Balb/c vacinados com diferentes imunógenos contra OPV.	107
FIGURA 31: Alinhamento das sequências de nucleotídeos dos genes B5R e H3L, subclonados no vetor pGEMT-easy.	111
FIGURA 32: Restrição enzimática das construções pGEMT-B5R, pGEMT-H3L e do vetor pQE9.	112
FIGURA 33: Triagem de clones pQE9-B5R e pQE9-H3L.	113
FIGURA 34: Análise da expressão de B5R e H3L recombinantes em clones bacterianos induzidos e não induzidos com IPTG.	116
FIGURA 35: Análise da purificação de B5R e H3L recombinantes.	117
FIGURA 36: Detecção de B5R e H3L recombinantes por transferência Western.	118
FIGURA 37: ELISAs IgG anti-B5R ou -H3L – teste dos soros de camundongos imunizados com as vacinas B5R-DNA, H3L-DNA e/ou BAV.	121
FIGURA 38: Modelo hipotético do ciclo de transmissão dos VACV.	129

LISTA DE ABREVIATURAS

μ L – microlitro
ARAV – Vírus Araçatuba
ATCC – American type cell collection
BAV – Vírus BeAN 58058
BSA – albumina sérica bovina
CDC – Centro de Controle de Doenças
CEBIO-UFMG – Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Minas Gerais
CETEA - Comitê de Ética da UFMG
CEV – vírus envelopado célula-associado
CMC – Carboxi-Metil-Celulose
CPXV – *Cowpox virus*
CTGV – Cantagalo virus
d.p.i. – dias pós-infecção
dATP – dideoxiadenosina trifosfato
dCTP – dideoxicitosina trifosfato
dGTP – dideoxiguanidina trifosfato
DMEM - meio de Eagle modificado por Dulbecco
DNA – Ácido dexirribonucléico
dTTP – dideoximidina trifosfato
ECMV – *Ectromelia virus*
ECP – Efeito Citopático
EDTA – ácido etilenodiaminotetracético
EEV – vírus envelopado extracelular
EV – vírus extracelular
FIOCRUZ – Fundação Instituto Oswaldo Cruz
GP1V – Vírus Guarani P1
GP2V – Vírus Guarani P2
ha – Hemaglutinina
ICTV – International Committee on Taxonomy of Viruses
IEV – Vírus envelopado intracelular
IMA – Instituto Mineiro de Agropecuária
IMV – Vírus maduro intracelular
ITR – Regiões terminais invertidas
IV – Vírus imaturo
MARV – Mariana virus
M.O.I. – multiplicidade de infecção
MCA – Membrana corioalantóica
MEM – Meio mínimo essencial
 $MgCl_2$ - Cloreto de Magnésio
mL – mililitro

mm – milímetros
 mM – milimolar
 MPXV – *Monkeypox virus*
 MURV – Vírus Muriaé
 MV – Vírus maduro
 nm – nanômetro
 OMS – Organização Mundial da Saúde
 OPXV – *Orthopoxvirus*
 PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida
 pb – Pares de bases
 PBS – Tampão salina fosfato
 PCR – Reação em Cadeia da Polimerase
 PFU / UFP– Unidade Formadora de Placas
 PFU ou UFP/g - Unidades Formadoras de Placas / grama
 pH – Potencial de hidrogênio
 pM – picomoles
 PSTV – Vírus Passatempo
 r.p.m. - rotações por minuto
 RNA – Ácido ribonucléico
 SAV – SPAn 232 virus
 SFB – Soro fetal bovino
 SN – Soroneutralização
 TK – Timidina quinase
 UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais
 UV – Ultra-violeta
 VACV – *Vaccinia virus*
 VACV-WR – *Vaccinia virus* amostra Western Reserve
 VARV - *Variola virus*
 VBH – Vírus Belo Horizonte
 VGF – Fator de crescimento de *Vaccinia virus*
vgf - gene do fator de crescimento de *Vaccinia virus*
 WV – Vírus envelopado

5

10

Resumo

A família *Poxviridae* compreende grandes e complexos vírus de animais, capazes de infectar hospedeiros vertebrados e invertebrados. *Orhopoxvirus* (OPXV) é um dos gêneros da família, e entre os seus representantes estão o *Cowpox virus*, o *Monkeypox virus*, o *Variola virus* e o *Vaccinia virus* (VACV). O VACV é o agente causador da vaccínia bovina no Brasil, e está associado à formação de lesões ulcerativas em bovinos e ordenhadores, acarretando perdas econômicas e impactos sociais. Desde 1999, vários casos de vaccínia bovina vêm sendo notificados, e um grande número de amostras de VACV foram isoladas durante esses surtos. Todavia, apesar de todos os impactos causados pela vaccínia bovina no Brasil, os hospedeiros naturais do VACV são pouco conhecidos, e a escassez de dados dificulta a proposição de modelos sólidos relativos à biologia do VACV, como a manutenção e circulação desses vírus na natureza. Além disso, atualmente não existem imunógenos seguros disponíveis no mercado contra esta doença. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi a determinação de alguns dos hospedeiros naturais do VACV, assim como o estudo de imunógenos seguros contra esta doença, buscando, portanto, por métodos de prevenção e controle da vaccínia bovina no Brasil. Os estudos sobre os hospedeiros naturais do VACV foram feitos por meio da análise de roedores peridomiciliares, capturados na proximidades de áreas com registros de surtos de VACV. Além disso, diferentes bibliotecas de soros de vertebrados foram analisadas. Para o estudo de imunógenos anti-VACV foram desenvolvidas três diferentes vacinas: uma amostra de VACV, BAV, sob a forma inativada e vacinas de DNA expressando as proteínas virais B5R ou H3L. Evidências sorológicas e moleculares indicaram a presença de VACV em roedores peridomiciliares capturados em propriedades rurais em Minas Gerais, assim como em duas espécies de primatas amazônicos. No estudo dos imunógenos, testes de resposta humoral e de desafio foram realizados, e demonstraram que o imunógeno contendo BAV associado com a vacina de DNA expressando B5R, sob o regime de prime-boost homólogo, apresentou os resultados mais promissores. Desta forma, os resultados obtidos no presente estudo sugerem a existência de um ciclo silvestre do VACV, e que roedores peridomiciliares podem representar os carreadores deste vírus entre as áreas rurais e as florestas brasileiras. Por outro lado, os estudos relacionados a imunógenos anti-VACV sugerem que vacinas seguras contra a vaccínia bovina podem ser opções viáveis, em alternativa a utilização de vacinas contendo amostras virais atenuadas. Os resultados deste estudo podem ser utilizados para futuras ações de controle e prevenção da vaccínia bovina no Brasil.

ABSTRACT

The *Poxviridae* family comprises large and complex viruses that infect vertebrates and invertebrates. *Orthopoxvirus* (OPXV) is a *Poxviridae* family's genus, and comprises species with clinical and veterinary relevance, like *Variola virus*, *Cowpox virus*, *Monkeypox Virus* and *Vaccinia virus* (VACV). VACV has been associated with bovine vaccinia outbreaks in Brazil, causing ulcerative lesions in cattle and humans, causing economical losses and social impact. Since 1999, several bovine vaccinia outbreaks were notified in Brazil, and many strains of VACV were isolated during such outbreaks. There are few available data about VACV hosts and reservoirs in Brazil. In addition, little is known about how these viruses are maintained in nature and the role of wild life in the emergence of those outbreaks. Despite the impacts associated to VACV outbreaks, there are no available safe vaccines against such zoonosis. Thus, the present work aimed the search of VACV natural hosts and reservoirs, and the study of safe vaccines against bovine vaccinia. Studies for discovery VACV hosts were performed using wild animals sera collections from Brazilian forests and to capturing rodents in properties affected by bovine vaccinia outbreaks. In parallel, three vaccines against VACV were tested: an inactive Brazilian VACV strain, named BAV; and two DNA vaccines, codifying B5R and H3L viral glycoproteins. Serological and molecular evidences indicated VACV infection in peridomestic rodents, captured in Minas Gerais State rural areas, as such as in two Amazon monkey species. The vaccine studies showed that BAV in association with B5R-DNA vaccine, using prime-boost immunization, presented the best results. Therefore, the results here obtained suggest the existence of a feral VACV cycle of life, and that peridomestic rodents could carrier VACV between forests and rural areas. Our results also showed that safe vaccines against VACV could be good alternatives to prevent bovine vaccinia outbreaks. The results of the present study could be used for prevention and control programs against VACV in the future.

30

35

I. INTRODUÇÃO

1.1. Família *Poxviridae*

1.1.1. Classificação

5

A família *Poxviridae* compreende vírus de morfologia complexa, com genoma de DNA, que se multiplicam no citoplasma da célula hospedeira. De acordo com o tipo de hospedeiro a família se divide em duas subfamílias, *Chordopoxvirinae* e *Entomopoxvirinae*, que infectam vertebrados e invertebrados, respectivamente (INTERNATIONAL COMMITTEE ON TAXONOMY OF VIRUSES [ICTV], 2008). Os membros da subfamília *Entomopoxvirinae* apresentam como espectro de hospedeiros diversas ordens da classe *Insecta*, incluindo Diptera, Coleoptera, Orthoptera e Lepdoptera (DAMON, 2007; BECKER *et al.*, 2008). A subfamília *Chordopoxvirinae* é dividida em oito gêneros (TABELA 1), dos quais quatro (15) (*Orthopoxvirus*, *Parapoxvirus*, *Molluscipoxvirus* e *Yatapoxvirus*) incluem agentes etiológicos de infecções humanas (SARAL *et al.*, 2006; de SOUZA TRINDADE *et al.*, 2007; LENDERMAN *et al.*, 2007; NAZARIAN *et al.*, 2007).

TABELA 1: Classificação dos vírus da subfamília *Chordopoxvirinae*. Fonte: ICTV, 2008
Família *Poxviridae*; subfamília *Chordopoxvirinae*

Gênero	Protótipo
<i>Orthopoxvirus</i>	Vaccinia virus
<i>Parapoxvirus</i>	Orf virus
<i>Capripoxvirus</i>	Sheeppox virus
<i>Suipoxvirus</i>	Swinepox virus
<i>Leporipoxvirus</i>	Myxoma virus
<i>Avipoxvirus</i>	Fowlpox virus
<i>Yatapoxvirus</i>	Tanapox virus
<i>Molluscipoxvirus</i>	<i>Molluscum contagiosum virus</i>

20

Muitas doenças veterinárias são causadas por poxvírus de vertebrados, acarretando importantes perdas econômicas. Os vírus do gênero *Avipoxvirus*, por

- exemplo, afetam um amplo espectro de aves, incluindo frangos, perus e canários, causando lesões vesiculares, sobretudo na região das patas (RAPIN *et al.*, 2007; TADESE *et al.*, 2007). Os vírus do gênero *Leporipoxvirus* infectam populações de coelhos domésticos, causando infecção sistêmica, com alta mortalidade (STANFORD *et al.*, 2007). Os vírus do gênero *Parapoxvirus* atingem criações de caprinos, ovinos e bovinos (MONDAL *et al.*, 2006; HOSAMANI *et al.*, 2007, ABRAHÃO *et al.*, 2009) e os vírus do gênero *Orthopoxvirus* (OPV) causam perdas na pecuária leiteira (TRINDADE *et al.*, 2007) e em áreas de criação de camelos e búfalos (SINGH, *et al.*, 2006; AL-ZI'ABI O *et al.*, 2007; SINGH, *et al.*, 2007).
- 10 O espectro de hospedeiros dos cordopoxvírus é notavelmente amplo, e muitas espécies virais isoladas ainda não foram classificadas dentro de um gênero, sendo que sua inserção dentro da subfamília foi possível devido a características morfológicas e biológicas. Dentre os cordopoxvírus não-classificados estão incluídos poxvírus isolados de mamíferos, como focas californianas (*California harbor seal poxvirus*), esquilos (*Squirrelpox virus*), golfinhos nariz-de-garrafa (*Dolphin poxvirus*) e cangurus cinza e vermelho (*Grey kangaroo poxvirus*, *Red kangaroo poxvirus*); e de répteis como o crocodilo do Nilo (*Nile crocodile poxvirus*) e jacarés americanos (*Spectacled caiman poxvirus*) (ICTV, 2008).
- 15

20 1.1.2. Morfologia

- As partículas dos poxvírus apresentam morfologia complexa, em forma ovóide, de tijolo ou pleomórfica, com dimensões variando entre 140-260nm de diâmetro por 220-450nm de comprimento (CYRKLAFF *et al.*, 2005; ICTV, 2008). A partícula contém mais de 100 proteínas distribuídas em quatro estruturas distintas: cerne, corpúsculos laterais, membrana e envelope. O cerne apresenta configuração bicôncava (FIGURA 1A), unilateralmente côncava ou cilíndrica, e envolve o material genético, enzimas e fatores de transcrição de genes precoces. Uma membrana lipídica, contendo proteínas de superfície tubulares ou globulares
- 25
- 30 arranjas de forma helicoidal (parapoxvírus) ou irregular (FIGURA 1B), envolve o

cerne e dois corpúsculos laterais, cuja função e composição química ainda são pouco definidas (MOSS, 2001; ICTV, 2008). O esquema das estruturas que compõem a partícula viral está representado na FIGURA 1-C.

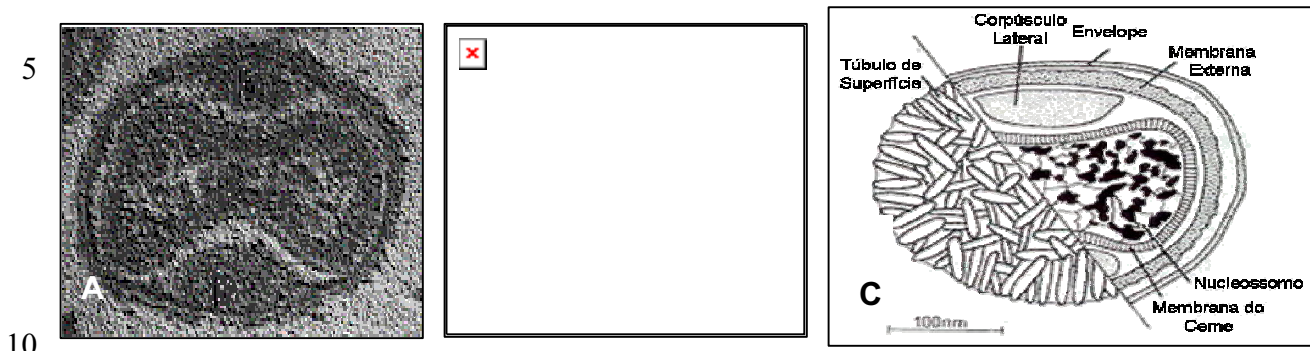


FIGURA 1: Morfologia e estrutura dos poxvírus. (A) Eletromicrografia de secção longitudinal de *Fowlpox virus*, evidenciando o cerne em forma de halter e os corpúsculos laterais. (B) Eletromicrografia em contraste negativo de *Variola virus*, apresentando os túbulos de superfície. (C) Representação esquemática de um poxvírus. Fontes: ICTV, 2008; www.ucm.es; FENNER, 1989 – modificado.

1.1.3. Estrutura do genoma

O genoma dos poxvírus é constituído por uma molécula de DNA dupla-fita linear, covalentemente ligada nas extremidades, variando de 130kb (gênero *Parapoxvirus*) a 375kb (gênero *Avipoxvirus*), e codifica aproximadamente 200 genes. O conteúdo guanina+citosina varia de 35-64% entre os cordopoxvírus, e representa cerca de 20% do genoma dos entomopoxvírus (BECKER *et al.*, 2008; ICTV, 2008). O tamanho relativamente grande do genoma permite a codificação de proteínas não-essenciais para seu ciclo de multiplicação, mas que modulam sua patogenicidade. A ausência de infecções latentes e a não-integração no genoma do hospedeiro justificam a importância de genes que protejam os poxvírus do sistema imune durante uma infecção (MOSS, 2001; HUGHES e FRIEDMAN, 2005; ICTV, 2008).

A região central do genoma dos poxvírus, sobretudo dos vírus do gênero OPV, é altamente conservada, e codifica principalmente proteínas estruturais e enzimas

envolvidas no metabolismo do ácido nucléico. Nas extremidades do genoma se encontram as regiões terminais invertidas (ITRs), seqüências idênticas dispostas em orientações contrárias. As ITRs são regiões genômicas variáveis, que codificam genes responsáveis pela interação vírus-hospedeiro, conferindo a cada poxvírus características únicas de patogênese e imunomodulação (GUBSER *et al.*, 2004).

As duas fitas de DNA são conectadas em suas porções terminais por seqüências nucleotídicas de fitas simples ricas em adenina e timina (alças), contendo aproximadamente 100 bases. Essas regiões são altamente conservadas e contêm seqüências necessárias para a formação de concatâmeros durante a replicação do DNA (FIGURA 2) (revisado por MOSS, 2001; ICTV, 2008).

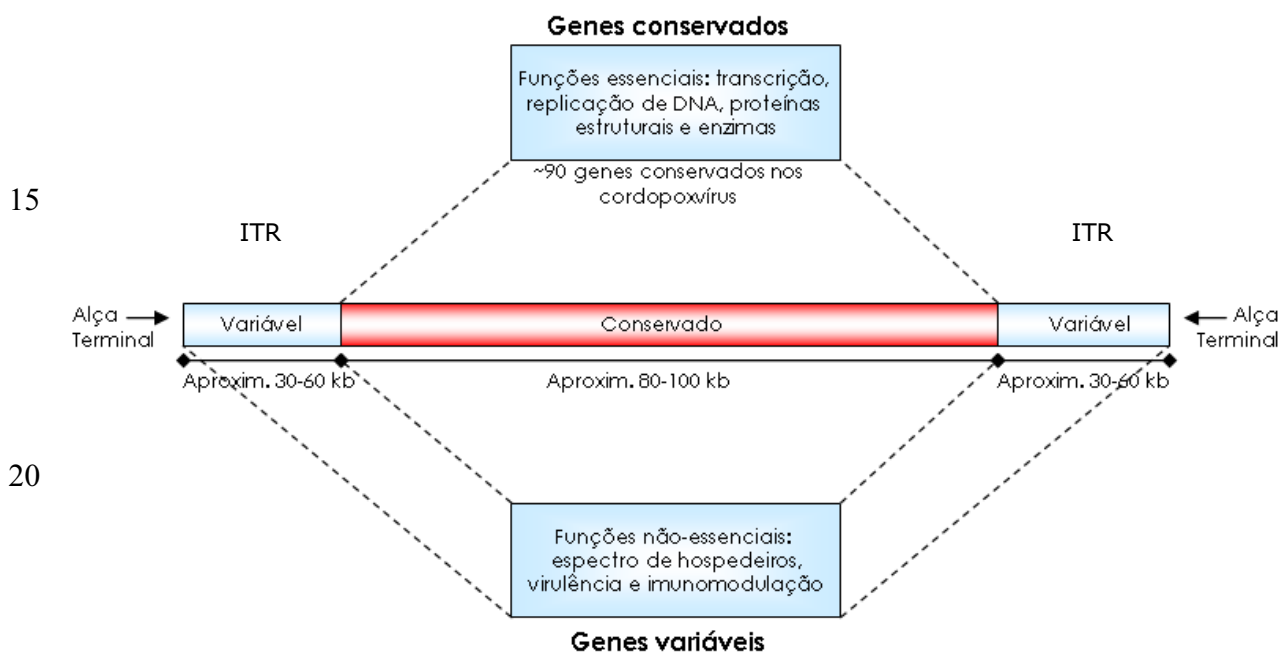


FIGURA 2: Representação esquemática das características estruturais e funcionais do genoma do *Vaccinia virus*. A região central do genoma apresenta genes altamente conservados, que codificam proteínas envolvidas em funções essenciais. As regiões terminais invertidas (ITRs) codificam proteínas não-essenciais, e se apresentam duplicadas no genoma. Nas extremidades são observadas as alças terminais. Fonte: Adaptado de SMITH e McFADDEN, 2002.

Diversos poxvírus, de ambas as subfamílias, tiveram seus genomas sequenciados de forma completa nos últimos anos, o que permitiu um avanço nos estudos de

localização e função gênica (MASSUNG *et al.*, 1994; SHCHELKUNOV *et al.*, 1995; SENKEVICH *et al.*, 1997; ANTOINE *et al.*, 1998; CAMERON *et al.*, 1999; SHCHELKUNOV *et al.*, 2000; AFONSO *et al.*, 2000; BAWDEN *et al.*, 2000). O genoma do *Vaccinia virus* (VACV), o protótipo da família, não possui íntrons e cada gene contém seu próprio promotor. Não existe uma distribuição óbvia dos genes no genoma no que diz respeito à função, contudo estes estão arranjados de modo a minimizar uma possível interferência durante a transcrição (*revisado por* CONDIT e NILES, 2002).

10 **1.1.4. Ciclo de multiplicação dos poxvírus**

Diferentemente da maioria dos vírus de DNA, a multiplicação dos poxvírus ocorre inteiramente no citoplasma da célula hospedeira (FIGURA 3), característica compartilhada apenas com a família *Asfarviridae* (ICTV, 2008). A partícula viral possui quase todos os elementos necessários para a sua multiplicação, incluindo RNA polimerase dependente de DNA, enzima de metilação, poli A polimerase e fatores de transcrição de genes precoces (*FENNER, 2000; MOSS, 2001; revisado por* SODEIK e KRIJNSE-LOCKER, 2002; MOSS, 2006).

20 O ciclo tem início com a adsorção viral na membrana da célula hospedeira, todavia, pouco se conhece acerca dos ligantes virais e receptores celulares envolvidos no processo. Ao todo, oito diferentes glicoproteínas virais parecem estar envolvidas na formação do complexo de fusão-penetração (SENKEVICH *et al.*, 2005). Foi demonstrado que as proteínas de membrana A21, H2, F9 e G9 são essenciais para a penetração das partículas virais, uma vez que mutantes negativos para estas proteínas não foram capazes de se multiplicar (TOWNSLEY *et al.* 2005; SENKEVICH *et al.*, 2005; BROWN *et al.*, 2006; OJEDA *et al.*, 2006). A proteína de superfície A27, presente no vírus maduro intracelular (IMV) também parece estar envolvida na adsorção viral. Além disso, uma série de outras proteínas de superfície como D8 e H3 também vêm sendo relacionadas como possíveis ligantes de IMV, porém nenhuma destas três proteínas em questão se mostrou individualmente essencial (MOSS, 2005). Elementos de expressão ubíqua e de

caráter aniônico, como os glicosaminoglicanos e outros componentes da matriz extracelular, como condroitina sulfato e heparano sulfato, vêm sendo apontados como possíveis receptores celulares envolvidos na adsorção dos poxvírus (MOSS, 2001; *revisado por* McFADDEN, 2005).

5

Após a adsorção, ocorre a fusão da partícula viral com a membrana plasmática, liberando o nucleocapsídeo no citoplasma celular. A proteína A28 é altamente conservada entre os poxvírus, e parece estar envolvida no processo de fusão. Experimentos envolvendo a deleção de A28 em VACV demonstraram que esta proteína está presente em todas as partículas infecciosas dos poxvírus (SENKEVICH *et al.*, 2003). TOWNSLEY e colaboradores (2006) demonstraram que o VACV também pode penetrar na célula hospedeira pelo mecanismo de endocitose mediada por receptor, em uma via endossômica que requer acidificação.

15

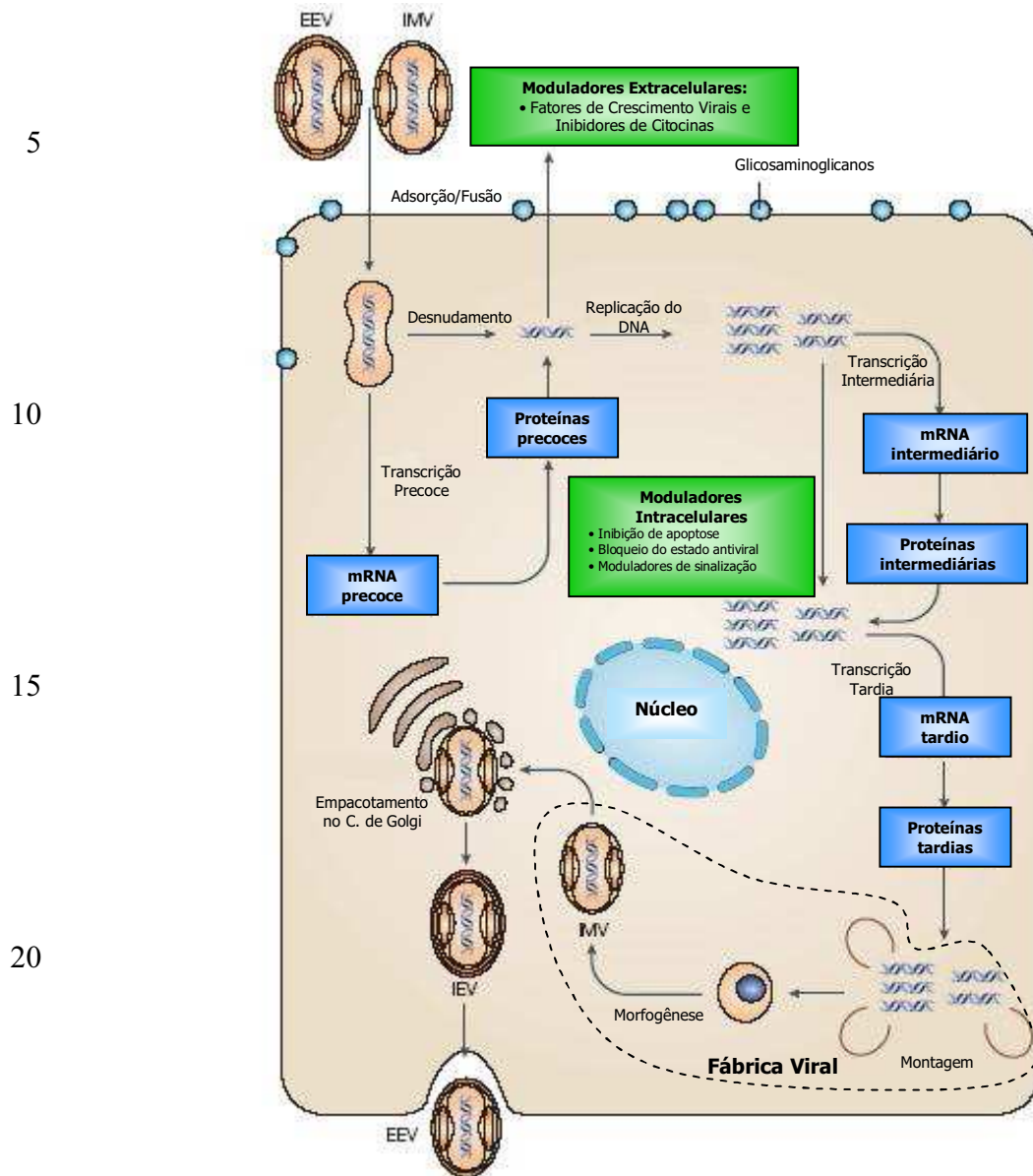
Após a penetração na célula, a maquinaria transcricional do vírus é ativada pelos fatores de transcrição de genes precoces presentes no nucleocapsídeo (GUBSER *et al.*, 2007). Proteínas moduladoras de resposta imune e fatores de crescimento celular são então traduzidos (McFADDEN, 2005; McLENNAN, 2007) e, em seguida, ocorre um desnudamento secundário, e o DNA começa a ser replicado, formando concatâmeros. Os genes intermediários e tardios são transcritos e traduzidos, originando proteínas estruturais, além de elementos que serão associados às partículas virais em formação (MOSS, 2001). A morfogênese acontece em sítios celulares onde ocorre acúmulo de um material nucleoprotéico denso, embebido em uma matriz granular, conhecidos como corpúsculos de inclusão do tipo basófilo ou “fábricas virais” (*revisado por* YODER *et al.*, 2004).

25

Ao contrário do que ocorre com outros vírus envelopados, as membranas dos poxvírus não são exclusivamente adquiridas de forma adjacente às membranas celulares, sendo a síntese *de novo* de membranas uma hipótese ainda debatida (ICTV, 2008). A estruturação inicial das partículas dos poxvírus ocorre de forma seqüencial, a partir de estruturas lipoprotéicas denominadas crescentes, que dão

30

origem a partículas uniformes e esféricas, que em um estágio subsequente de maturação, formam o vírus imaturo (IV) (MOSS, 2006).



25 **FIGURA 3: Diagrama do ciclo de multiplicação dos poxvirus.** Fonte: **McFADDEN, 2005** – modificado.

30 Após clivagens proteolíticas de elementos de capsídeo e condensação do cerne viral, os IV dão origem aos vírus maduros intracelulares (IMV), que representam a maioria das partículas virais infecciosas (MOSS, 2006). Algumas partículas IMV podem ser transportadas através de microtúbulos até o complexo de Golgi, onde adquirem uma dupla membrana, dando origem aos vírus envelopados

intracelulares (IEV), que são partículas virais não infecciosas (DUBOCHET, 1993; MOSS, 2006). Os IEV seguem para a periferia da célula direcionados por microtúbulos, e então se fundem com a membrana plasmática, formando os vírus envelopados extracelulares (EEV). Entretanto, algumas partículas podem eventualmente permanecer associadas com a membrana plasmática da célula, formando os vírus envelopados célula-associados (CEV), importantes na dispersão viral célula-célula (MOSS, 2001; MOSS, 2006; DOCEUL *et al.*, 2010). As partículas EEV, apesar de representarem apenas um pequeno percentual das partículas virais totais, são essenciais para a disseminação do vírus dentro do hospedeiro durante uma infecção (DOCEUL *et al.*, 2010).

O número e a composição das membranas presentes nas formas virais envolvidas no ciclo de multiplicação dos poxvírus é alvo de intensa pesquisa. Nos últimos anos, técnicas de microscopia eletrônica, associadas ao avanço de procedimentos bioquímicos de identificação protéica, demonstraram que a composição das proteínas de membrana dos IMV é diferente da encontrada nos IEV e CEV (MOSS, 2006). Além disso, foi demonstrado de forma consistente que os IMV apresentam apenas uma membrana, enquanto as partículas extracelulares (CEV e EEV) possuem pelo menos duas (FIGURA 4). Estes aspectos influenciam diretamente no modo pelo qual tais partículas adsorvem e penetram nas células hospedeiras (SENKEVICH *et al.*, 2003; MOSS, 2006).



5



10 **FIGURA 4: Eletromicrografia de transmissão de (A) IMV, (B) IEV e (C) EEV.** As setas indicam as membranas presentes nas partículas. Fonte: **MOSS, 2006** – modificado

Em 2006, MOSS propôs uma nova nomenclatura para as partículas virais dos
 15 poxvírus. Os vírus maduros intracelulares (IMV) foram classificados como vírus maduros (MV), e há um consenso que tais partículas possuem uma única membrana, formada por bicamada lipídica. Os vírus intracelulares envelopados (IEV), por adquirirem um envelope composto por duas membranas que circundam o MV, foram chamados de vírus envelopados (WV). Por fim, as partículas EEV e
 20 CEV, por ocorrerem fora da célula, foram denominadas vírus extracelulares (EV), e possuem uma membrana a menos que os WV (MOSS, 2006).

1.2.1. Gênero *Orthopoxvirus* (OPV)

25 O gênero OPV apresenta nove espécies antigenicamente relacionadas (BREMAN e HENDERSON, 2002; ICTV, 2008), com uma ampla distribuição geográfica e um variado espectro de hospedeiros (LOPAREV *et al.*, 2001; McFADDEN, 2005). Quatro espécies de OPV infectam humanos: *Variola virus* (VARV) , *Monkeypox virus* (MPXV), *Cowpox virus* (CPXV) e VACV (McFADDEN, 2005; ICTV, 2008).
 30 Outras espécies, incluindo o VACV, CPXV e o MPXV são patógenos de animais: *Ectromelia virus* (ECMV), *Camelpox virus*, *Racconpox virus*, *Volepox virus* e *Taterapox virus*. Outras duas não estão ainda bem caracterizadas: *Skunkpox virus* e *Uasin Gishu disease virus*, os quais são agentes etiológicos de doenças em gambás e cavalos, respectivamente (ICTV, 2008).

35

1.2.2. Ocorrência mundial dos OPV

1.2.2.1. *Variola virus e Monkeypox virus*

O VARV foi um dos mais importantes patógenos da humanidade, responsável por aproximadamente 50 milhões de óbitos somente no século XIX. A origem do VARV é desconhecida, mas acredita-se que a espécie tenha surgido com os primeiros agrupamentos humanos organizados, quando a prática da agricultura permitiu a ocorrência da primeira expansão demográfica, há cerca de 6000 anos (GEDDES, 2006). Os casos mais antigos documentados remetem aos anos de 1580-1100a.C., relacionados a três múmias egípcias encontradas apresentando cicatrizes faciais típicas de varíola, incluindo a múmia do faraó Ramsés V, que possivelmente faleceu acometido pela doença (*revisado por* MAHALINGAM *et al.*, 2004; *revisado por* TOLEDO, 2006). Os primeiros registros de varíola da Era Cristã coincidem com a concentração de pessoas e os surgimentos de grandes cidades no século IV, sobretudo ao longo dos vales dos rios Nilo (Egito), Tigre e Eufrates (Mesopotâmia, atual Iraque), Ganges (Índia), Amarelo e Vermelho (República Popular da China). Antes desse período, a doença possivelmente ocorria de forma esporádica, devido ao pequeno número de habitantes das cidades (*revisado por* TOLEDO, 2006). Segundo historiadores, as rotas de mercadores e o tráfego de especiarias, e a expansão islâmica nos séculos VIII e IX permitiram a disseminação e o estabelecimento da doença no continente Europeu. A disseminação da varíola no Novo Mundo ocorreu a partir das Grandes Navegações, iniciadas no século XV, sendo a doença um dos fatores responsáveis pela queda substancial das populações indígenas americanas (*revisado por* TOLEDO, 2006).

Os principais sintomas e sinais clínicos associados à varíola são a formação de pústulas dolorosas e confluentes por toda superfície corporal, com maior número de lesões nos membros e na face (FIGURA 5), além de estado febril agudo e prostração. Em 5 a 10% dos pacientes, a doença progride rapidamente de forma maligna, provocando a morte em aproximadamente 6 dias (HENDERSON *et al.*, 1999).



5

FIGURA 5: Lesões pustulares típicas de varíola na face (A) e membros inferiores (B).Fontes: **McFADDEN, 2005; GEDDES, 2006** - modificado

10 Em 1977, na Somália, foi registrado o último caso de varíola, três anos antes da
Organização Mundial da Saúde (OMS) declarar a doença erradicada, graças ao
Programa Intensificado para a Erradicação da Varíola (FENNER, 1989).
Atualmente, apenas dois institutos estão legalmente autorizados a manterem
amostras de VARV: o Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC), nos
15 Estados Unidos, e o Centro de Pesquisa do Estado para Virologia e Biotecnologia,
na Rússia. Existe, no entanto, uma preocupação acerca da existência de estoques
clandestinos de VARV, que poderiam ser utilizados em atentados terroristas,
especialmente após os ataques de setembro de 2001, envolvendo *Bacillus*
anthracis (McFADDEN, 2005). A liberação acidental ou deliberada do VARV
20 poderia causar uma grande epidemia, sobretudo porque a vacinação contra a
varíola foi suspensa há mais de duas décadas, o que ocasionou uma geração de
pessoas não imunizadas contra os OPV (BREMAN e HENDERSON, 2002).

O MPXV é um agente zoonótico emergente, podendo ocasionar manifestações
25 clínicas sistêmicas graves, muito similares às da varíola humana (SHCHELKUNOV
et al., 2002; LEARNED *et al.*, 2007). Alguns roedores endêmicos da África Central
e Ocidental são os reservatórios naturais deste vírus, embora infecções em
populações humanas e de outros primatas vêm sendo descritas no continente
africano (ARITA *et al.*, 1976; MARENNIKOVA, 1977; *revisado por* McFADDEN,
30 2005, *revisado por* CHASTEL, 2009). Estudos epidemiológicos recentes vêm
demonstrando um aumento de aproximadamente 400% no número de casos de
MPXV na África nos últimos 20 anos, provavelmente relacionado com o

crescimento da população não imunizada contra os OPV (RIMOIN *et al.*, 2010). Em junho de 2003, uma inadvertida importação de roedores africanos causou um surto de MPXV no centro-norte dos Estados Unidos (GIULIO e ECKBURG, 2004). Naquela ocasião, 81 casos humanos com sinais clínicos foram reportados, acometendo principalmente veterinários e vendedores de animais. Fortuitamente, estes casos foram clinicamente mais brandos que os normalmente observados no continente africano, provavelmente devido ao truncamento de um gene viral relacionado com o escape do complemento (GUARNER, 2004; FINLAY e McFADDEN, 2006). Assim como descrito para o VARV, existe uma grande preocupação quanto à utilização do MPXV em atentados bioterroristas (NALCA *et al.*, 2005).

1.2.2.2. Cowpox virus

O CPXV é endêmico na Europa e oeste da Ásia e, apesar do nome, a infecção em bovinos é rara, com prevalência de anticorpos para vírus do gênero OPV no gado europeu menor que 1%. Evidências apontam que os prováveis reservatórios do CPXV sejam roedores silvestres, dos gêneros *Clethrionomys*, *Microtus* e *Apodemus* (BENNETT, 1996).

Nos últimos anos, é crescente o número de casos relatados de infecção humana por CPXV, associada principalmente aos gatos (CORAS, 2005; KURTH *et al.*, 2009). Os felinos exercem um importante papel de hospedeiro intermediário, transmitindo CPXV de roedores para os seres humanos, animais domésticos, tais como cães e cavalos, e para animais habitantes de zoológicos, como elefantes, rinocerontes, antas, edentatas e alguns carnívoros (MARENNIKOVA, 1977; BAXBY, 1979; MEYER, 1998; PELKONEN, 2003; KURTH *et al.*, 2009). O primeiro caso de transmissão direta de CPXV de um roedor para um hospedeiro humano foi descrito em 2002, na Holanda, quando uma adolescente entrou em contato com um rato peridomiciliar (*Rattus norvegicus*) e apresentou lesões com nódulos ulcerados na face, como ilustrado na FIGURA 6 (WOLFS, 2002). Vinte anos antes, MAIBORODA (1982) já havia sugerido que essa espécie de roedor poderia participar da circulação de uma variante biológica do CPXV na natureza. Novos

casos de transmissão de CPXV entre *R. norvegicus* e humanos foram simultaneamente descritos na França e Alemanha recentemente (NINOVE *et al.*, 2009; CAMPE *et al.*, 2009). Um surto de CPXV também foi descrito em mangustos (*Mungos mungo*) e em gatos selvagens europeus (*Herpailurus yagouaroundi*) (KURTH *et al.*, 2009).

No Brasil, um caso de varíola bovina causada por CPXV foi relatado por SILVA e colaboradores, em 1986. No entanto, nenhuma caracterização molecular do agente viral foi realizada para a confirmação de que se tratava efetivamente de um CPXV, e não um VACV (TRINDADE *et al.*, 2003).



FIGURA 6: Lesões faciais causadas por infecção de CPXV após contato com roedor selvagem - Fonte: WOLFS, 2002

A circulação de CPXV em animais selvagens e domésticos, associada com a queda da imunidade das populações humanas, podem estar relacionadas aumento do número de casos da doença (PELKONEN, 2003). Em geral, a recuperação completa da doença leva de 6 a 8 semanas, porém, em pessoas imunocomprometidas é possível ocorrer uma infecção grave e generalizada, levando até mesmo ao óbito (EIS-HUBINGER, 1990).

1.2.2.3. *Vaccinia virus*

O VACV é o protótipo do gênero OPV, e apresenta um amplo espectro de hospedeiros (McFADDEN, 2005). Este vírus foi utilizado na Campanha de Erradicação da Varíola da Organização Mundial de Saúde (OMS), pelo fato de oferecer alta proteção imunogênica, por produzir somente lesões localizadas e pela característica de ser menos virulento que o VARV (ESPOSITO e FENNER, 2001).

A origem do VACV é desconhecida, embora algumas teorias tentem explicar o seu surgimento: (1) seria um híbrido do CPXV e VARV; (2) teria derivado de CPXV, (3) ou do VARV, após adaptação em animais; (4) seu hospedeiro natural estaria, atualmente, extinto. Apesar das hipóteses levantadas, não existe concordância nessa questão (FENNER, 1989; DAMASO *et al.*, 2000; TRINDADE *et al.*, 2007).

Mesmo após a suspensão do programa mundial de vacinação contra a varíola, na década de 80, as Forças Armadas dos Estados Unidos mantêm um programa interno de vacinação, visando a proteção de suas tropas contra um eventual ataque bioterrorista. Entretanto, muitos soldados, apesar de imunizados, permanecem por um longo período liberando partículas virais infecciosas supostamente a partir das crostas formadas em decorrência da administração da vacina. Por esse motivo, alguns casos de transmissão intra-familiar vêm sendo descritos desde a década de 80 (EGAN, *et al.*, 2004; VORA *et al.*, 2008). Em março de 2007, um dos casos mais graves foi registrado, quando um soldado recém-vacinado transmitiu VACV para seus familiares, incluindo uma criança de 2 anos, que desenvolveu *eczema vaccinatum*, levando ao surgimento de lesões generalizadas, principalmente no ventre e nos membros (FIGURA 7) (VORA *et al.*, 2008).

30



5

10 **FIGURA 7: Peito e abdômen de uma criança de 2 anos com lesões generalizadas provocadas por VACV, causada por *eczema vaccinatum*.** Exemplo de transmissão intra-familiar pós-vacinação contra varíola - Fonte: **VORA *et al.*, 2008**

Após a erradicação da varíola, a vacinação foi suspensa (FENNER *et al.*, 1988), e
15 o VACV passou a ser amplamente utilizado na pesquisa, como modelo para o entendimento de estratégias de evasão imune dos vírus em geral (YAO *et al.*, 2007; DOMINGO-GIL *et al.*, 2008), e mais recentemente como potenciais vetores recombinantes para a vacinação contra numerosas doenças humanas e veterinárias (ARAVINDARAM *et al.*, 2008; CHIAN *et al.*, 2009; KREIJTZ *et al.*,
20 2009). Nos últimos anos, entretanto, começaram a ser registrados no Brasil, vários surtos exantemáticos, acometendo gado leiteiro e ordenhadores, e diversos estudos vêm demonstrando que o agente etiológico dessas lesões são amostras de VACV (DAMASO *et al.*, 2000; TRINDADE *et al.*, 2004; LEITE *et al.*, 2005; TRINDADE *et al.*, 2006; TRINDADE *et al.*, 2007; MEGID *et al.*, 2008; MEDAGLIA *et al.*, 2009).
25

1.3. Ocorrência de VACV no Brasil

Vários trabalhos desenvolvidos em instituições de pesquisa no Brasil vêm
30 demonstrando que amostras de VACV apresentam-se sob ativa circulação no território nacional (DAMASO *et al.*, 2000; TRINDADE *et al.*, 2004; LEITE *et al.*, 2005; TRINDADE *et al.*, 2006; TRINDADE *et al.*, 2007; MEGID *et al.*, 2008;

MEDAGLIA *et al.*, 2009). Durante a década de 60, foram realizados os primeiros isolamentos deste vírus, obtidos através de um programa governamental de suporte a áreas rurais com registros de zoonoses virais desconhecidas (FONSECA *et al.*, 2002). O vírus SPAn 232 (SAV) e Cotia foram isolados e re-isolados de camundongos sentinelas na estação de Cotia, estado de São Paulo. O vírus BeAn58058 (BAV) foi isolado de amostras de sangue de um roedor silvestre, do gênero *Oryzomys*, capturado na floresta de Utinga, na cidade de Belém, no estado do Pará. Análises filogenéticas posteriores revelaram que todos os vírus citados são amostras de VACV (LOPES *et al.*, 1965; FONSECA *et al.*, 1998; MARQUES *et al.*, 2001; FONSECA *et al.*, 2002).

Em 1993, um surto exantemático foi notificado no Centro de Bioterismo da UFMG (CEBIO/UFMG), acometendo camundongos suíços provenientes da Universidade de Campinas, São Paulo. Testes biológicos, feitos a partir das lesões dos camundongos, revelaram a presença de um poxvírus, que posteriormente foi denominado Belo Horizonte virus (VBH) (DINIZ *et al.*, 1998). Apesar dos sinais clínicos indicarem que o vírus se tratava de um ECMV, caracterizações moleculares demonstraram que o VBH representava mais uma amostra de VACV circulante no Brasil (TRINDADE *et al.*, 2004).

Todavia, desde o final da década de 90, um grande número de amostras de VACV vêm sendo isoladas e caracterizadas durante surtos de vaccínia bovina (VB) ocorridos no país (FIGURA 8). As lesões observadas em bovinos durante esses surtos são típicas de poxvírus (FIGURA 9), e sua evolução clínica geralmente segue os estágios de mácula, pápula, vesícula, pústula, úlcera e crosta. Tais lesões podem favorecer o estabelecimento de infecções secundárias, como mamites bacterianas no gado, causando uma queda de até 50% na produção de leite (LOBATO *et al.*, 2005). Os bezerros comumente se infectam durante a amamentação, apresentando lesões no focinho (FIGURA 9B), gengiva e mucosa oral. A infecção de ordenhadores também é comum, levando a lesões nos dedos (FIGURA 9C-D), dores no corpo, linfadenopatia e febre acima de 40°C

(TRINDADE *et al.*, 2003; NAGASSE-SUGAHARA *et al.*, 2004; LEITE *et al.*, 2005; SILVA-FERNANDES *et al.*, 2009).

Em 1999, na região sudoeste do estado do Rio de Janeiro, foi isolada a amostra de
5 VACV denominada Cantagalo virus (CTGV), na qual as primeiras análises
filogenéticas o aproximaram da amostra vacinal VACV-Instituto Oswaldo Cruz (IOC)
(DAMASO *et al.*, 2000). No mesmo ano, o Araçatuba virus (ARAV) foi isolado a
partir de um surto exantemático afetando bovinos e humanos no estado de São
Paulo. A caracterização molecular do ARAV também mostrou íntima relação
10 filogenética com amostras de VACV, sobretudo com a amostra isolada em
Cantagalo (TRINDADE *et al.*, 2003)

No período de 2001 a 2003, o Instituto Adolfo Lutz recebeu amostras de fluido
vesicular provenientes de surtos exantemáticos ocorridos nos estados de Minas
15 Gerais, Goiás e São Paulo. Espécimes oriundos dos dois últimos estados foram
diagnosticados como positivos para poxvírus, e a posterior caracterização
molecular também os agrupou filogeneticamente com os vírus CTGV e outras
amostras de VACV (NAGASSE-SUGAHARA *et al.*, 2004).

20 Ainda em 2003, na cidade de Passa Tempo, estado de Minas Gerais, foi isolada
mais uma amostra de VACV, Passatempo virus (PSTV). Análises moleculares
demonstraram que assim como as amostras ARAV e CTGV, o PSTV apresenta
uma mesma deleção de 18 nucleotídeos no gene que codifica a proteína
hemaglutinina (*ha*), indicando que estas amostras possivelmente compartilham
25 uma origem em comum (LEITE *et al.*, 2005). Outras amostras virais também foram
isoladas em surtos recentes, como o vírus Muriaé (MURV), isolado a partir de um
surto de VB na cidade de Muriaé, na Zona da Mata mineira, em 2000 (TRINDADE
et al., 2007).



5

10

FIGURA 8: Estados onde amostras brasileiras de VACV foram isoladas.

As amostras *Guarani P1 virus* (GP1V) e *Guarani P2 virus* (GP2V), isoladas a partir de diferentes propriedades rurais durante um único surto ocorrido em 2001, também na Zona da Mata mineira, suscitaram uma interessante questão acerca da origem dos VACV (TRINDADE *et al.*, 2006). A heterogeneidade genética entre duas amostras isoladas de um mesmo surto indicaria que os VACV circulantes no país provavelmente teriam mais de uma origem, e não apenas a vacinal, como proposto por DAMASO e colaboradores (2000). TRINDADE (2007) e DRUMOND (2008) demonstraram, através de análises das regiões conservadas e variáveis do genoma de diversas amostras de VACV, que os VACV brasileiros até então isolados podem ser segregados em dois grandes grupos filogenéticos. GP1V e GP2V apresentaram maior similaridade filogenética com outras amostras de VACV do que entre si. Tal variabilidade genética é refletida diretamente em certas características fenotípicas, como o tamanho de placa em monocamada celular (dados não publicados) e a virulência observada em camundongos Balb/c (FERREIRA *et al.*, 2008).

30



FIGURA 9: Lesões causadas por amostras de VACV: (A) Lesões ulcerativas em tetas de vacas, e **(B)** no focinho de um bezerro. **(C) e (D)** lesões nas mãos de ordenhadores. Fonte: **Madureira (2009)** – modificado.

20 Novos surtos exantemáticos causados por VACV, afetando bovinos e humanos, foram descritos nos Estados do Espírito Santo (DONATELE *et al.*, 2007), Pernambuco (DAMASO *et al.*, 2008), Rondônia (S. de Saúde de Rôndonia, 2009), Maranhão (ASSIS *et al.*, 2009), Tocantins (MEDAGLIA *et al.*, 2009), Minas Gerais (KROON *et al.*, dados não publicados), Rio de Janeiro (SILVA-FERNANDES *et al.*, 25 2009) e São Paulo (MEGID *et al.*, 2008). Em janeiro de 2010, BRUM e colaboradores descreveram um surto exantemático causado por um OPV acometendo cavalos crioulos em um haras localizado em Pelotas, RS. Estudos moleculares adicionais, realizados em parceria com o Laboratório de Vírus/UFMG, demonstraram que este isolado também se tratava de uma amostra de VACV, a 30 primeira isolada de um cavalo no Brasil (CAMPOS, 2010). Desta forma, com as recentes notificações de surtos de exantemáticos causados por VACV, é possível afirmar que o vírus está amplamente distribuído no território nacional, abrangendo

todas as regiões do país (FIGURA 8). Em 2010, MOTA e colaboradores descreveram uma alta prevalência de indivíduos OPV-soropositivos em uma área rural no Acre, região livre de notificações de vaccínia bovina. O estudo demonstrou que a soropositividade anti-OPV nesta área não tinha relação direta com sexo ou
5 ocupação profissional, sugerindo um mecanismo de exposição ao vírus relacionado com atividades de caça e extrativismo nas florestas adjacentes.

Notificações sobre pessoas e animais com os sinais e sintomas característicos da VB foram feitas em várias cidades do estado de Minas Gerais durante os últimos 9
10 anos. O Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA), juntamente com a Escola de Veterinária da UFMG, a Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e o Laboratório de Vírus da UFMG têm feito um levantamento das propriedades rurais da região e vêm alertando médicos e profissionais da saúde sobre as características e procedimentos clínicos da doença. Baseado em resultados de testes de
15 soroneutralização e diagnóstico viral pela PCR foram confirmados vários outros surtos de VB causados por amostras de VACV em diversas propriedades rurais mineiras (dados não publicados).

O estado de Minas Gerais é o maior produtor de leite do Brasil, com um rebanho
20 de mais de 3,26 milhões de vacas leiteiras. Cerca de 90% do rebanho está localizado em áreas sob o risco de vaccínia bovina, e grande parte das amostras de VACV isoladas durante os surtos são derivadas desse estado. Foi demonstrado que amostras de leite coletadas de animais acometidos pela doença podem apresentar DNA e partículas infecciosas de VACV, todavia, o risco associado ao
25 consumo de leite contaminado com este vírus ainda não é desconhecido (ABRAHÃO *et al.*, 2009). Além dos aspectos econômicos envolvidos na questão, a VB é uma zoonose emergente que requer atenção dos órgãos de Saúde Pública (LOBATO *et al.*, 2005). Apesar deste grande impacto causado pela VB, não existem vacinas disponíveis contra a doença. Além disso, existem poucas
30 informações sobre os reservatórios naturais do vírus, e o modo pelo qual o VACV infecta o gado a partir da vida selvagem ainda é desconhecido.

1.4. Espectro de hospedeiros de OPV

Com exceção do VARV, que apresenta o ser humano como seu único hospedeiro conhecido, existe uma grande incógnita sobre o real espectro de hospedeiros dos demais vírus gênero OPV. Seu extenso genoma permite a codificação de um poderoso arsenal de imunomodulação, o que lhes confere uma grande versatilidade bioquímica, aumentando o espectro de tipos celulares permissivos (MOSS, 2001; HUGHES e FRIEDMAN, 2005). Tal característica usualmente se reflete em uma variada gama de hospedeiros, permitindo a infecção de vertebrados filogeneticamente distantes (McFADDEN, 2005).

Existem poucas informações sobre os hospedeiros naturais de VACV. Todavia, de forma comparativa, evidências apontam que CPXV pode estabelecer infecções persistentes ou agudas em alguns roedores silvestres, como *Apodemus sylvaticus*, *Clethrionomys glareolus* e *Microtus agrestis*, e em roedores urbanos, como *Mus musculus*, *Rattus norvegicus* e *Rattus rattus* (MAIOBORODA, 1982; BENNETT *et al.*, 1996; LAAKONENN *et al.*, 2006). A sazonalidade climática europeia exerce uma clara influência nos níveis populacionais dos roedores, o que afeta também a dinâmica infectiva viral (BENNETT *et al.*, 1996; LAAKONENN *et al.*, 2006).

Apesar das amostras SAV e Cotia virus terem sido isoladas a partir de camundongos sentinelas, e o VBH a partir de camundongos suíços, BAV constitui a única amostra de VACV efetivamente isolada de um roedor silvestre (FONSECA *et al.*, 1998). Este roedor foi caracterizado como uma espécie do gênero *Oryzomys*, cuja distribuição é ampla no Brasil, incluindo os estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo (PEREIRA, 2007). O gênero agrupa outras 36 espécies, e apresenta os mais variados *habitats*: desde os ecossistemas dominados por savanas (Cerrado, Caatinga) até áreas de floresta ombrófila densa (Floresta Amazônica, Mata Atlântica) ou mista (Mata de Araucária), incluindo as regiões de interface entre diferentes padrões fitoecológicos (SOUZA, 2006; PEREIRA, 2007). Todavia, esses roedores podem eventualmente ter acesso a áreas peridomiciliares,

especialmente com o avanço das fronteiras agrícolas sobre regiões de borda de mata (HOMEM *et al.*, 2001; SOARES-FILHO *et al.*, 2006).

Várias espécies de roedores são candidatas em potencial a reservatórios naturais do VACV. Além do gênero *Oryzomys*, de circulação peridomiciliar, espécies do gênero *Mus musculus*, *Rattus rattus* e *Rattus norvegicus* devem ser consideradas, sobretudo porque são reservatórios de CPXV (MAIOBORODA, 1982; BENNETT *et al.*, 1996; LAAKONEN *et al.*, 2006). Esses roedores apresentam distribuição cosmopolita, possuem hábitos peridomiciliares e representam uma fonte constante para a disseminação de outras zoonoses virais. Arenaviruses e hantaviruses, por exemplo, podem ser transmitidas através da inalação de aerossóis oriundos de excretas de *Oryzomys ssp.* e outras espécies de roedores infectados, causando febres hemorrágicas e meningites (SOUZA, 2006).

Outro importante grupo de mamíferos se destaca como possíveis hospedeiros ou reservatórios naturais de VACV: os primatas não humanos. Durante os últimos anos da campanha da OMS para a erradicação da varíola, mais precisamente entre as décadas de 70 e 80 do século passado, foi promovido um grande estudo de campo em florestas da Ásia e África, envolvendo centros de pesquisas norte-americanos e europeus, que teve como objetivo a busca por eventuais reservatórios naturais do VARV (MARENNIKOVA *et al.*, 1972). Existia ainda naquela época o receio de que o VARV fosse uma zoonose, e de que a qualquer momento este vírus poderia escapar da natureza e causar novos surtos em humanos. Desta forma, uma grande coleção de animais silvestres foi coletada, incluindo roedores, primatas, marsupiais, pequenos felídeos, dentre outros (MARENNIKOVA *et al.*, 1972; ARITA e HENDERSON, 1976; *revisado por* FENNER *et al.*, 1988). Os métodos de diagnóstico viral se baseavam em ensaios de soroneutralização, que revelavam a existência de anticorpos neutralizantes anti-OPV; e inoculação em membrana corioalantóide (MCA) de ovos de galinha embrionados, na qual era possível diferenciar se o OPV isolado previamente em cultivo celular se tratava de MPXV (que produz pequenas placas hemorrágicas e opacas), VARV (que produz placas esbranquiçadas e pequenas), VACV (variável

no tamanho, mas usualmente produz grandes placas esbranquiçadas) ou CPXV (induz a formação de grandes placas hemorrágicas) (DAMON *et al.*, 2007). A grande maioria dos isolados produziram placas pequenas e hemorrágicas em MCA, seguindo o padrão de MPXV. Todavia, em alguns casos, algumas amostras

5 de OPV isoladas de chimpanzés e outras espécies de macacos sintomáticos e assintomáticos geraram placas pequenas e esbranquiçadas, seguindo o padrão de VARV ou VACV (MARENNIKOVA *et al.*, 1972, FENNER *et al.*, 1988).

O fato descrito gerou grande preocupação na comunidade científica, episódio que

10 ficou conhecido como “The Whitepox Problem” (*revisado por* FENNER *et al.*, 1988). Como estes isolados representavam apenas uma pequena parte das inúmeras amostras de OPV provenientes de macacos silvestres, MARENNIKOVA (1972) propôs que as placas brancas eram na verdade variantes de MPXV, que após algumas mutações haviam perdido a capacidade de gerar placas do tipo

15 hemorrágica. Entretanto, embora estudos posteriores tenham demonstrado que algumas dessas amostras isoladas de macacos se tratavam de contaminação laboratorial com amostras de VACV ou VARV (ESPOSITO *et al.*, 1985), o agente etiológico envolvido em alguns destes isolamentos permaneceu indefinido (FENNER *et al.*, 1988).

20

Outros relatos de infecção de primatas por OPV foram feitos nos últimos anos. Um grande surto de CPXV foi descrito em 2006, acometendo diferentes espécies de macacos do Novo Mundo, mantidos em cativeiro em um centro de primatologia na Alemanha (MÄTZ-RENSING *et al.*, 2006). Em um outro estudo, GOLDBERG e

25 colaboradores (2008) descreveram que uma população de colobos vermelhos de Pennant (*Procolobus pennantii*), primatas habitantes do Parque Nacional de Kibale, oeste de Uganda, apresentavam evidências sorológicas de infecção por um OPV não-caracterizado, distinto de MPXV.

30 Diversas espécies de macacos, roedores, felinos e marsupiais são usualmente avistadas em áreas adjacentes a propriedades rurais brasileiras, incluindo àquelas já acometidas por surtos de VB. Todavia, não existem estudos sobre a

soroprevalência de OPV em espécies brasileiras de primatas não-humanos. A relação entre esses animais, os roedores-hospedeiros de VACV (como *Oryzomys*) e os surtos de VB ainda não foi investigada.

5 1.5. Vias de infecção e patogênese dos poxvírus

A infecção por poxvírus está associada a diversos sinais clínicos, variando desde lesões pustulares localizadas e auto-limitantes, a doenças sistêmicas generalizadas. Uma única espécie da família pode estar associada a diferentes
10 níveis de patogenicidade, dependendo da virulência da amostra, da via de infecção viral e do tipo de hospedeiro e seu estado imunológico (*revisado por FENNER et al., 1989*).

O trato respiratório é a via de infecção que ocorre de forma mais freqüente entre os
15 OPV, e constitui a provável via de entrada de *Camelpox virus*, VARV e MPXV. As infecções causadas por VACV e CPXV podem ocorrer através de microabrasões na pele e, como foi mencionado, estão associadas com lesões ulcerativas nas tetas e úberes do gado, e nas mãos de ordenhadores. A infecção por ECMV em camundongos também está associada com microabrasões na pele, dando origem
20 ao sítio primário de infecção (*revisado por FENNER et al., 1989*).

O trato gastrointestinal representa outra via natural de infecção conhecida para os OPV e ocorre usualmente, através de lesões na mucosa oral. Todavia, a infecção das células epiteliais do intestino delgado pode ocorrer, dependente de altos títulos
25 virais. Muitos roedores se alimentam das carcaças de animais mortos da mesma espécie, e tal comportamento pode favorecer a disseminação viral, como foi sugerido para ECMV (*revisado por FENNER et al., 1989*). A via oral é a maior fonte de infecção por CPXV em gatos domésticos e de felinos habitantes de zoológicos, através da predação de roedores contaminados (MAREKNIKOVA, *et al.*, 1977;
30 CORAS, 2005). Adicionalmente, a transmissão de MPXV entre populações de esquilos, e entre esquilos e macacos, pode ocorrer quando sementes de palmeiras

são contaminadas por um animal infectado e o restante do alimento é consumido por outro (*revisado por FENNER et al., 1989*). Em geral, as infecções causadas pelos OPV podem estar associadas a mais de uma via de transmissão, e outras vias, como a congênita, foram descritas, mas com importância epidemiológica pouco significativa (*revisado por FENNER et al., 1989; BENNING e HASSETT, 2004*).

FENNER e colaboradores (1948) em um experimento clássico, utilizaram ECMV para propor um modelo de patogênese viral *in vivo*. Segundo tais estudos, as partículas virais se multiplicam inicialmente em um sítio primário de infecção e em seguida, atingem a corrente sanguínea, causando viremia primária. A disseminação do vírus no organismo ocorre tanto em associação com células sanguíneas, quanto livres no plasma. Órgãos muito vascularizados, como fígado e baço, são então infectados, assim como os linfonodos regionais. Após alguns dias, ocorre a viremia secundária, quando as partículas virais migram para a pele, causando lesões ulcerativas generalizadas. Neste estágio, os tecidos pulmonar, hepático e esplênico podem apresentar necrose avançada, causando falência de órgãos (FENNER *et al.*, 1948; *revisado por ESTEBAN e BULLER, 2005*).

20 **1.6. Vias de eliminação**

A circulação e manutenção de partículas infecciosas na natureza representam alguns dos desafios impostos às progêneses virais. Estratégias de eliminação, resistência ambiental e disseminação foram selecionadas e modeladas ao longo da evolução, e são fundamentais na logística infectiva (MAIBORODA, 1982). Dados referentes às vias de eliminação dos OPV ainda são escassos. Todavia, foi demonstrado que durante a infecção por VARV as partículas virais são excretadas por fluidos orofaríngeos, secreções da conjuntiva e através da urina dos pacientes, ocorrendo um decréscimo na concentração de vírus eliminados durante a fase de coalescência (SARKAR, 1973; *revisado por BREMAN e HENDERSON, 2002*). Infecções causadas por pequenas doses de ECMV não apresentam os sinais clínicos característicos, mas partículas virais podem ser detectadas em fezes, urina

e em lesões próximas ao ânus, durante algumas semanas após a infecção (revisado por FENNER *et al.*, 1989).

Em um outro estudo sobre vias de eliminação, envolvendo *Ratpox virus*, uma variante biológica de CPXV, MAIBORODA (1982) observou que o roedor *Rattus norvegicus* é altamente susceptível ao vírus, com alta taxa de morbidade e mortalidade. No entanto, os animais sobreviventes, eliminavam o vírus nas fezes e urina, por um período superior a 1 mês após a infecção, o que pôde ser comprovado através da observação de lesões hemorrágicas em membranas corioalantóides, após a inoculação do material biológico em ovos embrionados de galinha. Altos títulos virais foram observados, sobretudo no reto dos animais (10^9 UFP), indicando que esta porção do intestino representa uma considerável fonte de disseminação de partículas virais (MAIBORODA, 1982). GOFF e colaboradores (2007) demonstraram, através de titulações e ensaios de imunofluorescência, intensa multiplicação do CPXV no intestino de camundongos Balb/c, assim como nos linfonodos e tecido adiposo mesentéricos.

Estudos realizados no Laboratório de Vírus/UFMG demonstraram que camundongos Balb/c inoculados com amostras brasileiras de VACV eliminam partículas e DNA viral nas fezes por pelo menos 30 dias pós-infecção (d.p.i.), e na urina, restrito ao período agudo da doença (7^o-9^od.p.i.) (ABRAHÃO, 2008). Foi demonstrado também, que camundongos sentinelas expostos à excretas contaminadas com VACV se infectam, e passam a eliminar partículas e DNA viral nas fezes (FERREIRA *et al.*, 2008). Esse estudo corroborou com dados prévios obtidos para outros OPV, que indicam que as vias de eliminação representam uma fonte de transmissão em potencial, sobretudo porque partículas infecciosas já foram detectadas em fezes, urina e fluídos orofaríngeos, conforme descrito para VARV, ECMV (revisado por FENNER *et al.*, 1989; revisado por BREMAN e HENDERSON, 2002) e VACV (FERREIRA *et al.*, 2008; ABRAHÃO, 2008).

30

1.7. Estabilidade das partículas virais sob condições ambientais

Desde a década de 50, inúmeros estudos vêm demonstrando que os poxvírus apresentam uma resistência relativamente alta a condições ambientais (MACALLUM e MCDONALD, 1957; HERRILICH *et al.*, 1967; JUST e FINK, 1979; HARPER, 1961; MAHNEL, 1977; FROSTEGARD *et al.*, 1999; LEWIS *et al.*, 2000; 5 ESSBAUER *et al.*, 2007; ABRAHÃO *et al.*, 2009). A morfologia complexa da partícula, incluindo um conjunto expressivo de proteínas estruturais, os corpúsculos laterais e a arquitetura do envelope, poderia exercer influência direta em sua estabilidade (ESSBAUER *et al.*, 2007). Variáveis físico-químicas modulam tal característica e, de uma forma geral, os poxvírus são mais estáveis quando 10 expostos a baixa umidade relativa do ar e temperaturas reduzidas (HARPER, 1961; ESSBAUER *et al.*, 2007). Alguns autores atribuem a baixa tenacidade epidemiológica do MPXV ao clima africano, uma vez que o continente apresenta altas temperaturas e elevada umidade relativa do ar (ESSBAUER *et al.*, 2007). A sazonalidade da VB no Brasil também corrobora com os dados acima, pois os 15 surtos ocorrem preponderantemente entre os meses de junho e outubro, época de frio e de baixa umidade.

McCALLUM e McDONALD (1957) demonstraram que VARV é estável em crostas de pacientes por um período que varia de 2 a 4 meses, dependendo da umidade 20 que o material foi acondicionado. Assim como ocorre para outros OPV, a viabilidade do VARV também é dependente da temperatura. A 35°C, partículas virais presentes em crostas permanecem viáveis por apenas 3 semanas; a 26°C, o tempo sobe para 13 semanas; e por fim, a 4°C, é possível detectar partículas infecciosas de VARV por até 16 semanas (HUQ, 1976). HERRLICH e 25 colaboradores (1976) isolaram partículas virais viáveis em *swabs* provenientes de pústulas e vesículas de pacientes com varíola 9 meses após a data da coleta. Este fato possui importante caráter epidemiológico, uma vez que material clínico de pacientes hospitalizados constituía a maior causa de novas epidemias de varíola no século passado (*revisado por* ESSBAUER *et al.*, 2007). De forma similar, o 30 ECMV é estável por um período de até 11 dias em gotas de sangue secas, quando ambientadas a 4°C (BHATT e JACOBY, 1987).

HARPER (1961) comprovou a estabilidade do VACV em aerossóis por aproximadamente 23 horas, sobretudo sob baixas temperaturas e umidades relativas, em ambiente não irradiado por luz UV. A resistência ambiental de VACV também foi demonstrada em amostras de água de chuva e de rios, e nestes casos, 5 outras variáveis também influenciaram na viabilidade das partículas, como a concentração iônica e o pH da solução (MAHNEL *et al.*, 1977; ESSBAUER *et al.*, 2007). Similarmente, VACV mostrou ser resistente em alimentos experimentalmente contaminados, como saladas, carnes, leite, queijo e pães (ESSBAUER *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2010). Todavia, apesar da elevada 10 estabilidade mencionada, o VACV é altamente susceptível aos raios ultra-violeta, e a exposição da partícula durante alguns segundos é suficiente para sua inativação (VON BRODOROTTI e MAHNEL, 1982). Desta forma, a partícula viral ao ser eliminada pelo hospedeiro no decorrer do quadro infectivo, provavelmente não permanecerá viável por um longo período na urina, uma vez que será exposto à 15 irradiação solar ou se associará com partículas do solo, o que reduz consideravelmente sua infectividade (IJZERMANN *et al.*, 1997; FROSTERGARD *et al.*, 1999; LEWIS *et al.*, 2000; *revisado por* ESSBAUER *et al.*, 2007). No entanto, ABRAHÃO e colaboradores (2009) demonstraram que amostras brasileiras de VACV mantêm sua infectividade em fezes murinas por até 20 dias de exposição 20 (d.d.e.) à temperatura ambiente, sendo possível detectar DNA viral por pelo menos 60 d.d.e.. Desta forma, a eliminação pela via fecal prolonga a viabilidade ambiental das partículas virais, sobretudo pela heterogeneidade química e a opacidade do espécime clínico.

25

1.8. Estratégias imunomodulatórias dos poxvírus

Imediatamente após invasão viral, mecanismos não-específicos e específicos (memória) envolvendo interferons (IFN), complemento, quimiocinas, citocinas, 30 células *Natural Killer* (NK), células T citotóxicas e anticorpos assumem importância na defesa do organismo do hospedeiro (WANG e tal, 2009). Deste modo para uma infecção viral eficiente, tendo em vista a imunidade inata e adquirida do

hospedeiro, é requerida uma capacidade de escapar, obstruir ou subverter elementos críticos que medeiam a resposta antiviral do hospedeiro (*revisado por* JOHNSTON e McFADDEN, 2003; CRAMPTOM *et al.*, 2010). Assim sendo, vírus com grandes genomas, como os poxvírus, carregam genes não essenciais para a sua multiplicação, mas que codificam várias proteínas imunomodulatórias, bloqueando ou amenizando a ação de citocinas e mecanismos do sistema imune inato (SMITH *et al.*, 1997, TURNER e MOYER, 2002, JOHNSTON e McFADDEN, 2003; CRAMPTOM *et al.*, 2010). Deste modo, os imunomoduladores dos poxvírus são importantes fatores de virulência que contribuem significativamente para a manutenção de infecções virais (READING e SMITH, 2003, JOHNSTON e McFADDEN, 2003, BOOMKER *et al.*, 2005; FREBEL *et al.*, 2010).

As proteínas imunomodulatórias dos poxvírus podem ser divididas em três classes principais: proteínas de viromimetismo (virocinas e viroreceptores), proteínas de virocamuflagem e virotransdutores (*revisado por* ESPOSITO e FENNER, 2001). As virocinas são secretadas pelas células infectadas e são semelhantes às citocinas do hospedeiro (DÉNNES *et al.*, 2006; DAY *et al.*, 2008). Os viroreceptores que são receptores celulares alterados que perderam seus domínios transmembrana e conseqüentemente são secretados pelas células infectadas seqüestrando seus ligantes (DÉNNES *et al.*, 2006; DAY *et al.*, 2008). As proteínas de virocamuflagem subvertem as vias de apresentação de antígenos não-próprios das células infectadas fazendo com que estas células não sejam reconhecidas pelo sistema imune (JOHNSON e McFADDEN, 2003; JOHNSON e McFADDEN, 2004). E os virotransdutores que são proteínas intracelulares que interferem com as vias sinalizadoras ou efectoras (DÉNNES *et al.*, 2006; DAY *et al.*, 2008). A FIGURA 10 ilustra algumas proteínas imunomoduladoras codificadas pelos poxvírus (JOHNSTON e McFADDEN, 2003).

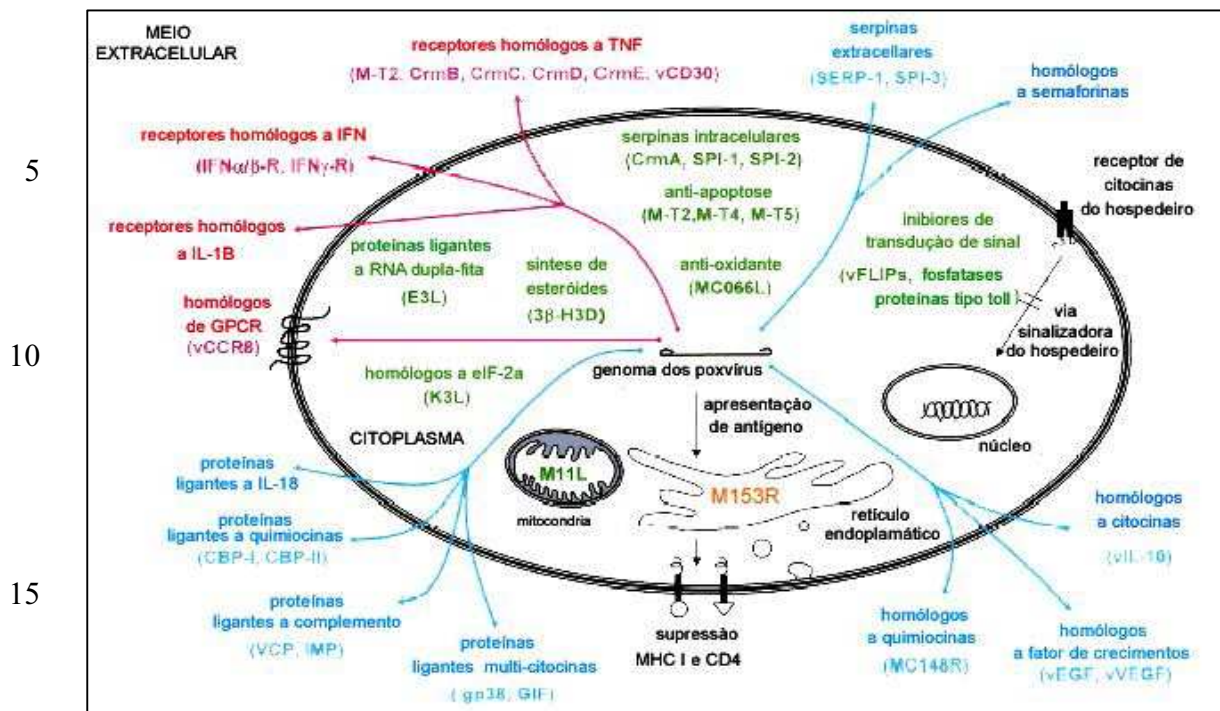


FIGURA 10: Representação esquemática de algumas proteínas imunomodulatórias codificadas por poxvírus. Proteínas virais que participam da virocamuflagem (laranja), virotransdução (verde) e viromimetismo (viroreceptores em vermelho e virocinas em azul) estão indicadas. Fonte: **JOHNSTON e McFADDEN, 2003** -modificado.

1.9. Desenvolvimento de imunógenos contra *Orthopoxvirus*

1.9.1. Vacinas de vírus vivos

Embora durante na Campanha de Erradicação da Variola da Organização Mundial de Saúde (OMS) tenham sido utilizadas inúmeras amostras de VACV naturalmente ou artificialmente atenuadas, a história da imunização contra a variola remete à Antiguidade, quando era praticado na China um processo denominado insuflação (FENNER *et al.*, 1988; *revisado por* TOLEDO, 2006). A prática da insuflação consistia na aspiração de material vesicular de lesões variólicas, conferindo proteção contra a doença. Alguns registros apontam que surgiu simultaneamente na região sul da Índia um processo muito semelhante à insuflação, denominado variolação (FENNER *et al.*, 1989; *revisado por* TOLEDO, 2006). Este processo consistia na inoculação de material vesicular de lesões variólicas pelo método da escarificação, o que também conferia proteção contra a doença. Durante os

séculos seguintes, tais práticas foram difundidas por vários países da Europa e Ásia, onde foram aperfeiçoadas, através da busca empírica por amostras cada vez menos virulentas de VARV. Todavia, tanto a insuflação quanto a variolação, apresentavam altos índices de mortalidade, mesmo utilizando material de lesões
5 obtidos de pacientes acometidos pelas formas menos severas da doença (FENNER *et al.*, 1988; *revisado por* TOLEDO, 2006; JACOB *et al.*, 2009). Apesar disso, tais práticas serviram de base para os estudos clássicos desenvolvidos por Edward Jenner no XVIII.

10 Na Era Moderna, a varíola ainda era a maior causa de óbitos na Europa, afetando principalmente crianças habitantes de grandes cidades. Entretanto, nas áreas rurais europeias, outras doenças exantemáticas também eram observadas, afetando o homem e animais de criação, dentre elas a varíola bovina (FENNER *et al.*, 1988; JACOB *et al.*, 2009). Esta doença, causada pelo CPXV, agente
15 desconhecido na época, causava lesões semelhantes às variólicas, todavia restritas aos tetos de vacas leiteiras. Os trabalhadores que ordenhavam os animais acometidos pela varíola bovina também desenvolviam lesões, normalmente localizadas e restritas às mãos. No final do século XVIII, o médico inglês Edward Jenner observou que o índice de ordenhadores acometidos pela varíola humana
20 era curiosamente menor do que o observado para o restante da população europeia. Jenner, como a maioria dos médicos da época, conhecia as antigas práticas de insuflação e variolação, e viu uma relação direta entre as lesões de varíola bovina em ordenhadores, e um possível mecanismo de proteção contra a varíola humana (*revisado por* TOLEDO, 2006). Baseado em tais observações, em
25 1876, Jenner inoculou em James Phipps, um garoto de 8 anos, com material pustular obtido de uma lesão de varíola bovina observada nas mãos de uma ordenhadora, Sarah Nelmes (FENNER *et al.*, 1988; GEDDES, 2006; JACOB *et al.*, 2009). Posteriormente Jenner comprovou que Phipps estava protegido contra a varíola. A publicação deste trabalho foi feita no ano de 1798, quando Jenner
30 chamou o procedimento descrito de “vacinação”, do termo latim *vacca*, ou vaca. Durante os 80 anos seguintes, a vacinação era feita quase que exclusivamente de braço a braço, através da coleta de material pustular (FENNER *et al.*, 1988;

revisado por TOLEDO, 2006). Ocasionalmente, outros agentes eram confundidos com o CPXV e, inadvertidamente, utilizados como vacina, incluindo sífilis, VARV, varicela, sarampo e bactérias gram-positivas (*revisado por TOLEDO, 2006*). Em institutos vacinais, o vírus era mantido e multiplicado em bezerros. Após décadas

5 de vacinação, o início do século XX marcou a emergência do VACV como amostra vacinal, vírus até então desconhecido, mas que estava sendo utilizado como vacina anti-variólica em alguns locais do mundo (FENNER *et al.*, 1988; GEDDES, 2006; JACOB *et al.*, 2009).

10 Como apresentava menor virulência que o CPXV, o VACV foi selecionado pela OMS como vírus vacinal da Campanha de Erradicação da Variola. No Brasil, até 1968, 4 laboratórios produziam a vacina utilizando as amostras Paris, New York e Lister. Contudo, em 1971, outros dois laboratórios passaram também a usar a amostra Lister, e outros dois continuaram a usar a amostra New York (*revisado por*

15 FENNER *et al.*, 1988). Essa vacina antivariólica consistiu em uma amostra liofilizada produzida a partir dessa linhagem semente, sendo este vírus denominado vírus Lister-Butantã (LST-BTT) (LANNA, 1980). Outra amostra vacinal utilizada no país foi a VACV-IOC, que foi produzida pelo Instituto Oswaldo Cruz, no Rio de Janeiro, durante a campanha da OMS, porém existem poucas informações

20 a respeito deste vírus, exceto a sua suposta origem francesa (DAMASO *et al.*, 2000). Na Argentina, foi utilizada a amostra Malbran, derivada da amostra Lister. Em ocasiões de desabastecimento, o Brasil importava a amostra Malbran da Argentina. Desta forma, de quatro a cinco tipos de amostras vacinais foram utilizadas durante a campanha da OMS no Brasil (TRINDADE *et al.*, 2007).

25

A procura por uma redução da patogenicidade das amostras de VACV, por meio de atenuação através de passagens seriadas, resultou no surgimento de novas amostras vacinais: VACV River, VACV Ankara, VAVC LC 16m8, MVA, entre outros (*revisado por BREMAN E HENDERSON, 2002; revisado por HENDERSON e*

30 MOSS, 1999; STITTELAAR e OSTERHAUS, 2001; *revisado por ROSENTHAL et al.*, 2001; JACOB *et al.*, 2009). Entretanto, mesmo utilizando uma amostra vacinal atenuada, a vacinação de indivíduos imunossuprimidos gerava, ocasionalmente,

complicações graves. Entre estes indivíduos, susceptíveis à ocorrência de efeitos adversos devido à vacinação, podem ser citados pacientes transplantados, portadores do vírus HIV, com leucemia, com linfoma, com desordens imunológicas de origem celular ou humoral, ou indivíduos em terapia com anti-metabólitos, radiações e altas doses de corticosteróides (HENDERSON e MOSS, 1999; ROSENTHAL *et al.*, 2001; BARTLETT, 2003; PASTORET e VANDERPLASSCHEN, 2003; VORA *et al.*, 2008).

Assim, com a erradicação mundial da varíola, a vacinação utilizando o VACV foi suspensa, uma vez que os riscos de efeitos adversos passaram a ser maiores que a própria possibilidade de infecção pelo VARV. Deste modo, a vacinação passou a ser recomendada apenas para militares e funcionários de laboratórios que manipulam diretamente culturas ou animais infectados com o VACV ou outro OPV zoonótico (FULGINITI *et al.*, 2003).

15

1.9.2. Vacinas de vírus recombinantes

A complexidade do genoma dos poxvírus permite a codificação de genes não essenciais para sua multiplicação. Desta forma, alguns poxvírus, como VACV, *Fowlpox virus* e *Canarypox virus* vêm sendo utilizados como vetores modificados para expressão de genes exógenos, inseridos em *locus* gênicos não essenciais (MULLBACHER e LOBIGS, 2001; ROCHA *et al.*, 2004; DREXLER *et al.*, 2004; ARAVINDARAM *et al.*, 2008; CHIAN *et al.*, 2009; KREIJTZ *et al.*, 2009). Muitos desses vetores vêm sendo utilizados no desenvolvimento de vacinas polivalentes, com a possibilidade de expressão de grandes quantidades das proteínas de interesse, uma vez que esses vírus recombinantes conservam a capacidade de infectar células do hospedeiro (RUPPRECHT *et al.*, 2001; MEEUSEN *et al.*, 2007). Poxvírus recombinantes vêm sendo utilizados para a expressão de proteínas imunizantes para *Herpesvirus*, hepatite B, vírus da raiva, HIV e *Dengue virus* (ARAVINDARAM *et al.*, 2008; CHIAN *et al.*, 2009; KREIJTZ *et al.*, 2009; VAN *et al.*, 2009; BRIDGEMAN *et al.*, 2009). Apesar das vantagens mencionadas, as vacinas de vírus recombinantes, assim como as vacinas de vírus atenuados, podem sofrer

recombinação genética com outros vírus relacionados filogeneticamente (BAXBY *et al.*, 1986; PASTORET e VANDERPLASCHEN, 2003).

1.9.3. Vacinas de vírus inativados e o imunógeno BAV

5

Uma vez que a multiplicação do VACV pode ser exacerbada em pessoas imunossuprimidas, a administração de uma vacina, mesmo que atenuada pode resultar em diversas complicações secundárias (ROSENTHAL *et al.*, 2001). Deste modo, uma vacina utilizando VACV inativado se torna uma alternativa viável, não existindo a possibilidade de multiplicação do vírus no animal vacinado. Adicionalmente, devido à inativação viral, a possibilidade de recombinação desta amostra vacinal com outros poxvírus circulantes ou o estabelecimento e manutenção destes vírus na natureza torna-se improvável (TSUNG *et al.*, 1997).

10

15

Vários estudos envolvendo inativação do VACV e o mecanismo de proteção imunológica têm sido realizados (ROSENTHAL *et al.*, 2001; BELYAKOV *et al.*, 2003). Diversas metodologias para inativação viral tem sido desenvolvidas durante várias décadas, entre elas inativação por luz ultra-violeta (UV), calor, pressão e produtos químicos como formalina, hidroxilamina, β -propiolactona, paraformaldeído, etilenimina binária e psoraleno (TURNER *et al.*, 1970; TURNER e SQUIRES, 1971; THORNTON, 1980; TSUNG *et al.*, 1996; HULSKOTTE *et al.*, 1997; BOUDET *et al.*, 2001). Porém, é importante ressaltar que algumas destas metodologias de inativação viral podem levar à desnaturação protéica, levando o animal vacinado a desenvolver anticorpos contra a forma desnaturada das proteínas virais, o que pode resultar em uma resposta imunológica menos eficiente.

20

25

30

Em 2008, Ferreira descreveu a elaboração de uma vacina anti-OPV utilizando a amostra de VACV BeAn 58058 (BAV), em sua forma inativada, administrada sob a dose de 10^7 UFP para camundongos. A vacina se mostrou eficiente na proteção de camundongos Balb/c imunizados e posteriormente desafiados pela via intranasal e por escarificação. Além disso, o imunógeno foi produzido em MCA de ovos embrionados, reduzindo os custos de produção e eliminando a possibilidade de

contaminação por príons. A inativação da amostra vacinal foi feita através de método físico, utilizando luz UV, ou químico, pela beta-propiolactona, sendo o segundo método mais viável, apesar de laborioso. Todavia, apesar de conferir proteção, os animais imunizados e desafiados pela via intranasal com a amostra

5 VACV-Western Reserve (VACV-WR) ainda apresentaram certa morbidade, sendo observada pilo-ereção acentuada, arqueamento de dorso e perda de peso durante os primeiros dias pós-desafio. Apesar disso, o imunógeno BAV se mostrou promissor como uma possível vacina anti-OPV, que poderia ser utilizada na prevenção da VB no Brasil.

10

1.9.4. Vacinas de DNA e proteínas contra OPV: glicoproteínas mais promissoras

Vacinas de DNA e proteínas contra os poxvírus vêm sendo descritas como

15 alternativas às vacinas virais vivas e inativadas (HOOPER *et al.*, 2000; HOOPER *et al.*; 2003; PULFORD *et al.*, 2004; DAVIES *et al.*, 2005). Os alvos mais freqüentes são proteínas presentes na superfície das formas infectivas dos poxvírus, IMV e EEV e CEV. Dentre as vacinas de DNA que expressam um único gene de VACV, PULFORD e colaboradores (2004) obtiveram os melhores resultados, com

20 proteção de 100% em camundongos Balb/c desafiados com uma LD50 da amostra VACV-IHD. Foi analisada nesse estudo a proteção conferida por 11 proteínas virais de superfície de VACV, cujos genes foram inseridos no vetor pTARGET (Promega, E.U.A.), e a que obteve os melhores resultados foi a glicoproteína B5R (vacina pTB5R). A glicoproteína B5R, presente nos EEV, está relacionada com a inibição

25 do complemento. Apesar de conferir 100% de sobrevivência frente ao desafio com VACV, a vacina de DNA contendo o gene B5R não inibiu completamente a morbidade nos camundongos desafiados com VACV-IHD. Além disso, são requeridas de 3 a 4 doses da vacina, administradas por via intramuscular de 3 em

30 3 semanas, para que os menores índices de morbidade sejam atingidos. Não foram detectados anticorpos neutralizantes nos camundongos vacinados com pTB5R, o que sugere que a resposta celular também seja essencial para proteção contra infecções por OPV.

Dentre as vacinas recombinantes protéicas anti-VACV, DAVIES e colaboradores (2005) demonstraram que a administração da glicoproteína de VACV H3L, presente nos IMVs, promove 100% de proteção em camundongos desafiados com 5 1LD50 de VACV-WR (CHERTOV *et al.*, 1991). Foi demonstrado que a deleção do gene H3L não causa perda de infectividade de VACV, mas reduz significativamente o tamanho das placas de lise e os títulos virais, quando comparados com VACV selvagem (FONSECA *et al.*, 2000). Ao contrário da vacina de DNA-B5R, H3L purificada gera uma resposta de anticorpos neutralizantes significativa em 10 humanos. Outras vacinas protéicas conferiram proteção contra infecção de VACV, mas nenhuma delas alcançou o patamar de proteção conferido por H3L (DAVIES *et al.*, 2005).

Curiosamente, a indução de resposta imune 100% protetora somente foi obtida 15 quando B5R foi utilizada sob a forma de vacina de DNA, e no caso de H3L, sob a forma de imunógeno protéico (PULFORD *et al.*, 2004; DAVIES *et al.*, 2005). As formulações vacinais H3L-DNA e B5R-protéica apresentaram resultados intermediários, no que se refere à proteção. A via de administração do imunógeno, a sua dose, e a maneira que o desafio é feito parecem interferir diretamente na 20 indicação da proteína mais imunogênica e protetora, o que vem gerando resultados divergentes na literatura (PULFORD *et al.*, 2004; DAVIES *et al.*, 2005). Entretanto, de uma forma geral, mesmo aqueles que foram considerados os melhores imunógenos, de DNA ou proteína, não reduziram completamente a morbidade dos modelos desafiados, sobretudo nos 10 primeiros dias pós-infecção (PULFORD *et al.*, 25 *et al.*, 2004; DAVIES *et al.*, 2005).

II. JUSTIFICATIVA

Desde o início da formação das sociedades humanas cooperativas, há aproximadamente 6000 anos, a história vem sendo profundamente marcada pelos poxvírus. A determinação de rotas migratórias, a intensificação das relações humanas e a expansão demográfica, proporcionada pelo advento da agricultura e da pecuária, representaram fatores altamente favoráveis para o estabelecimento e disseminação da varíola no planeta. Surtos recorrentes da doença foram registrados durante toda a Idade Média, persistindo até o século XX, período em que o VARV foi a causa de cerca de 500.000 mortes anuais. Apesar da erradicação da doença no final da década de 70, é crescente a preocupação de instituições de Saúde e Segurança Pública acerca da utilização do VARV como arma biológica, sobretudo pela possibilidade da existência de estoques clandestinos do vírus. Adicionalmente, a suspensão do programa mundial de vacinação, nos anos 80, acarretou a emergência de gerações não imunizadas contra os OPV.

Outros membros da família *Poxviridae* circulam ativamente na natureza e são responsáveis por surtos de interesse médico e veterinário em todo o mundo. Diferentemente do VARV, um patógeno estritamente humano, os outros poxvírus apresentam um amplo espectro de hospedeiros. Dentre os representantes do gênero OPV, do qual o VARV faz parte, outras três espécies são capazes de infectar humanos: MPXV, CPXV e VACV. O MPXV causa um quadro clínico semelhante ao da varíola humana e, apesar de ser endêmico do continente africano, foi a causa de um grande surto nos Estados Unidos em 2003, acometendo 81 pessoas. O episódio foi associado à importação de roedores africanos, alguns dos prováveis reservatórios naturais da espécie. Outro OPV causador de infecções em seres humanos de extrema relevância é o CPXV. Esta espécie é endêmica da Europa e também está associada a infecções de animais domésticos e habitantes de zoológicos. Em hospedeiros imunodeficientes CPXV pode causar quadro clínico grave e generalizado.

No Brasil, um número crescente de amostras de VACV vem sendo isoladas durante surtos de vaccínia bovina, sobretudo no estado de Minas Gerais, o maior produtor de leite do país. A doença causa lesões ulcerativas no gado leiteiro e em ordenhadores, podendo também ocasionar uma série de outros sintomas e sinais clínicos. Durante o episódio da doença, o gado apresenta queda na produção de leite, e o ordenhador normalmente é afastado do serviço por alguns dias, acarretando grandes perdas econômicas. A vaccínia bovina também constitui um problema social, pois as pequenas propriedades são as mais atingidas pela doença, sobretudo as que praticam a ordenha de subsistência em que o leite representa um dos pilares da alimentação familiar. Apesar de sua relevância econômica e social, a vaccínia bovina é muitas vezes negligenciada, e os surtos nem sempre são relatados. Os hospedeiros naturais do VACV são pouco conhecidos, e a escassez de dados dificulta a proposição de modelos sólidos da biologia do VACV, como a manutenção e circulação desses vírus na natureza.

15

A eliminação de partículas virais durante um processo infeccioso constitui uma fonte em potencial de transmissão entre hospedeiros. As vias de eliminação dos poxvírus já foram bem caracterizadas para o VARV, CPXV e ECMV, sendo fezes, urina, fluídos orofaríngeos e secreções da conjuntiva algumas das possíveis vias relacionadas. Em animais infectados com ECMV e CPXV, partículas virais podem ser excretadas nas fezes por até 35 dias. O Grupo de Poxvirologia do Laboratório de Vírus ICB/UFMG demonstrou que amostras brasileiras de VACV são eliminadas nas fezes e urina de camundongos Balb/c, exercendo possivelmente um importante papel na transmissão horizontal desses vírus. Nesse mesmo estudo, foi observado que DNA e partículas de VACV se mantêm conservadas em fezes murinas. No entanto, não foi demonstrado se o modelo de eliminação e transmissão de VACV se aplica a roedores silvestres. Caso esse modelo de eliminação e transmissão seja observado também em outros roedores, o monitoramento epidemiológico da vaccínia bovina poderia ser feito através da análise das fezes de roedores silvestres e peridomiciliares, habitantes de áreas adjacentes a propriedades acometidas pela doença.

30

Vacinas contra OPV vêm sendo desenvolvidas, sobretudo pela re-emergência de vírus zoonóticos e pela possibilidade de utilização do VARV em atos de bioterrorismo. Vacinas de vírus inativados, de DNA e de proteínas são alternativas válidas às vacinas de vírus vivos atenuados, que historicamente causam uma série

5 de efeitos colaterais. Com o aumento do número de pessoas imunossuprimidas, a utilização de vacinas atenuadas é cada vez menos recomendada pela OMS. Estudos recentes, utilizando imunógeno inativado (BAV), vacinas de DNA e de proteína, obtiveram, isoladamente, sucesso na imunização de roedores contra VACV, com proteção de 100% dos animais desafiados com VACV. Todavia, em

10 todos os casos morbidade foi observada, em contraste com as amostras vacinais controle. A associação do imunógeno BAV inativado com vacinas de DNA, em um sistema de *prime boost* heterólogo ou homólogo, poderia conferir proteção efetiva contra infecções por OPV. Foi demonstrado que *prime boost* heterólogos resultam em um aumento expressivo de células T CD8 de memória antígeno-específicas,

15 muito maior do que quando comparado com vacinas administradas em dose única ou por *boost* homólogos. Assim, a combinação do imunógeno BAV inativado com vacinas de DNA poderia requerer menor número de *boosts*, com doses menores de imunógeno, mantendo entretanto, a proteção de 100% dos camundongos.

20 Dessa forma, considerando todos os impactos causados pela circulação dos OPV no mundo e a relevância da vacínia bovina no Brasil, o estabelecimento de métodos de controle e prevenção de poxviroses são importantes no âmbito econômico e social. Assim, o presente trabalho possui como objetivos o estudo de possíveis hospedeiros naturais de VACV no Brasil, e a padronização de um

25 sistema de *prime-boost* para imunização contra VACV, com futura aplicação destes conhecimentos no controle e prevenção da vaccínia bovina no país.

III. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

- 5
- Identificar alguns dos hospedeiros naturais do *Vaccinia virus* e padronizar um sistema dose-reforço para a imunização contra este vírus.

3.2. Objetivos Específicos

10

1- Verificar a soroprevalência OPV em roedores capturados em áreas próximas a propriedades acometidas por vaccínia bovina;

15

2- Isolar amostras de VACV a partir de órgãos de roedores capturados em áreas próximas a propriedades acometidas pela vaccínia bovina, e compará-las com amostras virais isoladas de bovinos e humanos afetados pela doença;

20

3- Avaliar se fezes de roedores coletadas em propriedades acometidas pela vaccínia bovina contêm DNA ou partículas infecciosas de VACV;

4- Verificar a soropositividade para OPV em uma coleção de soros de animais silvestres amazônicos;

25

5- Verificar a soropositividade para OPV em uma coleção de soros de animais mantidos em cativeiro na Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte;

30

6- Avaliar a proteção conferida pelo imunógeno inativado BAV (FERREIRA, 2008) associado com a vacina B5R-DNA ou H3L-DNA (PULFORD *et al.* 2004) em camundongos Balb/c desafiados com VACV-WR;

- 7- Avaliar a produção de anticorpos neutralizantes anti-IMV nos camundongos vacinados conforme descrito em 6;
- 5 8- Avaliar a produção de anticorpos neutralizantes anti-EEV nos camundongos vacinados conforme descrito em 6;
- 9- Avaliar a morbidade em camundongos vacinados e desafiados;
- 10 10- Comparar a proteção conferida pelos sistemas de vacinação, com a proteção conferida pela vacina Lister-Butantã;
- 11- Comparar os métodos da inativação térmica e por β -propiolactona do imunógeno BAV;
- 15 12- Clonar e expressar as proteínas virais H3L e B5R em sistema procarioto, e utilizar estas proteínas em testes sorológicos.

20

25

30

IV. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Sistemas celulares

4.1.1. Células vero

5

As células Vero e BSC-40, linhagens contínuas derivadas de células epiteliais de rim de macaco verde africano (*Cercopithecus aethiops*) foram obtidas da “American Type Culture Collection” (ATCC), (Maryland, E.U.A.). O cultivo celular foi feito em garrafas redondas contendo 50 mL de meio mínimo essencial de Eagle (MEM) (Gibco™, USA) suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) (Cultilab, Brasil), glutamina, gentamicina (50 µg/mL), penicilina potássica (200 U/mL) e anfotericina B (2,5 µg/mL), sob incubação a 37°C, em atmosfera com 5% de CO₂ em estufa de tambor rolante. Os subcultivos foram feitos três vezes por semana sendo a monocamada celular lavada com solução tampão fosfato salina (PBS) (NaCl 137mM; kCl₂ 7mM; Na₂HPO₄ 1,4mM; pH 7,2) e tratada com solução de tripsina contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (NaCl 136mM; kCl 5mM; glicose 55mM; NaHCO₃ 69mM; 0,5g p/v tripsina 1:250 [Difco]; EDTA 0,5mM; 1% vermelho de fenol). Estas células foram utilizadas para multiplicação, titulação viral, ensaios de soroneutralização ou imunofluorescência, quando apresentaram 85-20 100% de confluência da monocamada.

4.1.2. Fibroblastos embrionários de galinha (CEF)

Para a produção de fibroblastos embrionários de galinha (CEF), ovos embrionados com 10 dias foram higienizados com solução de iodo glicerinado 2%. Em capela de fluxo laminar, após a retirada da parte superior da casca e da membrana subjacente, os embriões foram removidos cuidadosamente para que o vitelo não se rompesse, e colocados em uma placa de Petri contendo MEM autoclavado sem SFB. A cabeça, os membros superiores, inferiores e os órgãos internos dos embriões, foram removidos com o auxílio de tesoura e pinça cirúrgicas estéreis. Em seguida, as carcaças remanescentes foram transferidas e mantidas em uma segunda placa de Petri contendo MEM 0% de SFB, para a remoção do excesso de

sangue. As carcaças foram então trituradas com o auxílio de uma seringa de 10 mL (sem agulha) e incubadas em um erlemeyer com cerca de 5 mL de solução de tripsina/EDTA por carcaça, sob agitação constante, a 37°C durante 15 minutos. A ação da tripsina foi interrompida com a adição de igual volume de meio MEM com 10% de SFB. A suspensão foi posteriormente filtrada em um béquer com gaze (remoção de fragmentos sólidos das carcaças) e então centrifugada por 10 minutos a 1750g. O sobrenadante foi descartado e o sedimento suspenso em MEM 10% de SFB. A suspensão foi subdividida em garrafas de 150 cm² na proporção de três carcaças para cada garrafa. As células foram incubadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ até atingirem a confluência de 90 a 100%. Os subcultivos foram realizados por no máximo 3 vezes, a intervalos máximos de 3 dias. Essas células foram utilizadas para ensaios de isolamento viral e para testes de inativação de imunógenos.

4.1.3. Membrana corioalantóide de ovos embrionados

Os ovos embrionados de galinha utilizados para inoculação de vírus em membrana corioalantóide (MCA) foram obtidos do setor de aves do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Escola de Veterinária da UFMG. Estes ovos foram mantidos em incubadora Petersime (SC, Brasil), por 9 dias à temperatura de 37°C, para infecção viral.

4.2. Vírus

4.2.1. Origem das amostras

25

A amostra *Vaccinia virus* Western Reserve (VACV-WR) foi gentilmente cedida pelo Dr. C. Jungwirth (Universitat Würzburg, Alemanha).

A amostra Lister Butantã (LST-BTT) foi gentilmente cedida pelo Instituto Butantã, SP.

30

A amostra BeAn 58058 (BAV) foi isolada durante a década de 60 de um roedor silvestre, do gênero *Oryzomys*, em Belém (PA), e posteriormente caracterizada como uma amostra de VACV (FONSECA *et al.*, 1998), sendo gentilmente cedida pelo Dr. Francisco de Paula Pinheiro.

5

A amostra de VACV Guarani P2 foi isolada pelo Laboratório de Vírus durante um surto de vaccínia bovina na cidade de Guarani, Minas Gerais, no ano de 2001 (TRINDADE *et al.*, 2006)

10 **4.2.2. Multiplicação viral em cultura celular**

Os estoques de vírus foram obtidos após a multiplicação em células Vero cultivadas em 30 garrafas redondas de 500 mL, a 37°C, em estufa de tambor rolante. Monocamadas contendo cerca de 40 milhões de células Vero foram lavadas duas vezes com PBS e infectadas com multiplicidade de infecção (MOI) de 0,01, em 5 mL de MEM, acrescido de antibióticos. Após 1 hora de adsorção, a 37°C, foram acrescentados 50 mL de MEM suplementado com 1% SFB. Novamente, as células foram incubadas a 37°C e monitoradas diariamente, ao microscópio óptico até a detecção de 90% de efeito citopático (ECP), aproximadamente, 48 horas após a infecção. Em seguida, o meio de cultivo foi desprezado, as células foram lavadas com PBS e desprezadas das garrafas com auxílio de um raspador e utilizando Tris-HCl 10mM, pH 8,0. A suspensão obtida foi centrifugada durante 10 minutos a 1500 rpm (rotor H1000B - Sorvall RT6000 B), a 4°C e o sedimento obtido foi mantido a – 70°C para posterior purificação das partículas virais.

4.2.3. Purificação viral (JOKLIK, 1962)

O sedimento de células infectadas (**item 4.2.2.**) foi homogeneizado em 8mL de Tris-HCl 10mM, pH 8,0 e centrifugado a 2.500 rpm (rotor H1000B - Sorvall RT6000 B) durante 15 minutos a 4°C. O sobrenadante obtido foi mantido em banho de gelo e o sedimento celular foi lisado duas vezes em 10 mL de solução de lise (MgCl₂

1mM; Tris 10mM, pH 7,0; KCl 10mM). Após a adição desta solução, a suspensão foi incubada em banho de gelo, durante 10 minutos e as células lisadas mecanicamente em homogeneizador do tipo “Douncer” (Wheaton, USA) por 80 vezes. A suspensão viral resultante foi centrifugada a 14.000 rpm (rotor AH 629 Sorvall), 4°C, por 2 horas sobre um colchão de sacarose a 36% em Tris-HCl 10mM, pH 8,0 para separação dos restos celulares. Utilizando-se uma pipeta Pasteur, o sobrenadante e a interface foram coletados e desprezados e o restante foi descartado por inversão do tubo. Os sedimentos obtidos foram homogeneizados em 1mL de Tris 10mM, pH 8,0 e submetidos a 2 ciclos de sonicação por 30 segundos, com 40% de potência de saída (Sonic Desmembrator-50, Fisher Scientific – USA). Posteriormente, os sedimentos foram centrifugados em gradiente de sacarose (25% a 40%) a 12.000 rpm (rotor AH 629 – ultracentrífuga Sorvall), 4°C, por 45 minutos. As bandas relativas aos vírus foram coletadas com pipeta Pasteur e adicionadas de Tris 10mM, pH 8,0 e centrifugadas a 20.000 rpm (rotor AH 629 – ultracentrífuga Sorvall), 4°C por 45 minutos. Os sobrenadantes foram desprezados e os sedimentos homogeneizados em até 500µL de Tris 10mM, pH 8,0 e distribuídos em alíquotas de 2 µL em microtubos e estocados a – 70°C.

4.2.4. Multiplicação da amostra viral BAV em membrana corioalantóide de ovos embrionados

A inoculação da amostra BAV em MCA foi feita por deslocamento da câmara de ar dos ovos embrionados pela técnica convencional, utilizando um ovoscópio. Um volume de 100 µL contendo 1000 pfu de vírus BAV foi inoculado, utilizando seringa de 1 mL com agulha 0,45 x 13mm (26 Gauge). Os ovos foram mantidos em estufa úmida, a 37°C, por um período de 72 horas e, posteriormente, incubados a 4°C durante 24 horas. As MCAs foram retiradas dos ovos assepticamente e armazenadas a -70°C.

4.2.5. Purificação da amostra viral BAV multiplicada em membrana corioalantóide de ovos embrionados (JOKLIK, 1962 – modificado)

A MCA infectada foi macerada em nitrogênio líquido e adicionada de 1 mL de tampão Tris, 10mM, pH 8,0. Esta foi triturada utilizando homogeneizador Politron (Brinkmann Homogenizer, Suíça), primeiramente com a sonda maior por 90 segundos e, posteriormente, utilizando intervalo de 30 segundos e, novamente, com a sonda menor por 90 segundos. Posteriormente, o material foi centrifugado a 1.500 rpm (Sorvall RT-6000) por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi colocado sobre um colchão de sacarose 36% e centrifugado a 14.000 rpm (rotor AH 629 - ultracentrífuga Sorvall) por 2 horas a 4°C. Com o auxílio de uma pipeta Pasteur, o sobrenadante e a interface foram coletados e desprezados, e o restante foi descartado por inversão do tubo. Os sedimentos obtidos foram homogeneizados em 1mL de Tris 10 mM, pH 8,0 e submetidos a 2 ciclos de sonicação por 30 segundos com 40% de potência de saída (Sonic Desmembrator-50, Fisher Scientific – USA). A solução foi então distribuída em alíquotas de 2 µL em microtubos, sendo 2 µL do vírus purificado retirada para determinação do título e o restante foi estocado a – 70°C.

4.2.6. Titulação viral (CAMPOS e KROON, 1993)

A titulação viral foi feita em placas de 6 câmaras, em triplicata, contendo aproximadamente $1,5 \times 10^6$ células Vero/ câmara cultivadas por 16 a 24 horas, a 37°C em MEM, contendo 5% SFB (Cultilab, Brasil). Em cinco câmaras da placa, o meio foi desprezado e 200 µL de uma série de diferentes diluições dos vírus, na razão de 10, em meio MEM, foram adicionados às células. Uma câmara não foi infectada, ficando reservada para o controle da viabilidade celular. Após 1 hora de adsorção a 37°C, 2 mL de MEM contendo 1% de SFB foram adicionados e as placas foram novamente incubadas a 37°C e monitoradas por 48 horas. Em seguida, as células foram fixadas com solução 10% de formol em PBS por 30 minutos, lavadas com água e, posteriormente, coradas com solução 1% (p/v) de cristal violeta por 15 minutos. O título viral foi calculado pelo número de placas

obtidas na câmara da diluição que apresentou entre 30 a 300 placas de lise, multiplicado pelo inverso da diluição, em 200 µL, sendo posteriormente convertido para o volume final de 1 mL. As titulações foram feitas em triplicata.

5 4.2.7. Ensaios de imunofluorescência

Células BSC-40 foram cultivadas, a uma densidade de $4,5 \times 10^4$ células, sobre lamínulas de microscopia de 13 mm, por 16 a 24 horas, a 37°C, em MEM contendo 5% SFB (Cultilab). Após o crescimento celular, o meio foi descartado e a
10 monocamada infectada com diferentes amostras de VACV, na M.O.I. de 3. Após 24 horas, as células foram fixadas com solução de 4% de paraformaldeído e incubadas com anticorpos anti-B5R ou anti-H3L (gentilmente cedidos pelo Dr. Bernard Moss, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, E.U.A.). Após 1 hora de incubação, foram adicionados anticorpos secundários conjugados com
15 rodamina ou FITC. Após 30 minutos de incubação com os anticorpos secundários, as células foram tratadas com DAPI (Sigma, E.U.A.) por 10 minutos, para marcação de ácidos nucléicos. As imagens das células preparadas foram então obtidas em um microscópio de imunofluorescência (Olympus BX51, E.U.A.). Este ensaio foi feito em duplicata.

20

4.2.8. Ensaios de infectividade viral

A determinação das curvas de ciclo único das amostras de VACV isoladas em expedições de campo e das amostras controle foi feita em células BSC-40,
25 implantadas em placas de 6 câmaras, a uma densidade de 10^6 células por câmara. Após o crescimento celular, o meio foi descartado e a solução viral inoculada no volume de 200µL, na M.O.I. de 10. Após 1 hora de adsorção, a monocamada foi lavada com PBS, e então foi adicionado 2 mL de MEM 1% SFB. As placas foram incubadas à 37°C, em atmosfera de 5% de CO₂. Após 3, 6, 12, 24, 36 ou 48 horas
30 de infecção, o meio de cultura foi descartado, as monocamadas infectadas foram lavadas com PBS, e em seguida foram raspadas e coletadas para ensaios de titulação, conforme descrito no **item 4.2.6**. Em paralelo, as amostras virais foram

inoculadas em células BSC-40 sob a M.O.I. de 0,01 para a observação do fenótipo de placas virais. Após 48 horas de incubação, as células infectadas foram fixadas com solução de 4% de paraformaldeído e coradas com cristal violeta. Estes ensaios foram feitos em triplicata.

5

4.3. Ensaios de soroneutralização e inibição da formação de cometas

Amostras de soro foram aquecidas a 56°C por 30 minutos para a inativação do complemento e testadas, em triplicata, pelos testes de soroneutralização e inibição de cometas para detecção da presença de anticorpos contra OPV. Os ensaios foram feitos utilizando a amostra VACV-WR.

Para cada soro, foram utilizadas placas de 6 câmaras, nas quais foram implantadas 10^6 células Vero por câmara. Os vírus, diluídos seriadamente em MEM, foram acrescidos de gentamicina (50µg/mL), penicilina potássica (200U/mL) e fungizona (2,5µg/mL). Os soros foram diluídos também seriadamente, nas diluições de 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320, 1:640 e 1:1280. Para cada diluição de soro, foi preparada uma mistura que consistiu de 200µL de diluição de soro mais 200 µL de suspensão viral contendo $1,5 \times 10^2$ UFP, que foram mantidas sob agitação a 37°C, por 1 hora e, em seguida, inoculadas nas células. As placas foram incubadas a 37°C e após 1 hora de adsorção das partículas virais, foi acrescentado meio MEM suplementado com 1% SFB. Novamente, as placas foram incubadas a 37°C no período de 48 a 72 horas até o aparecimento de ECP. Após esta incubação, as células foram fixadas por 15 minutos em solução 3,7% de formaldeído e em seguida, a monocamada de células foi corada com solução de cristal violeta durante 15 minutos. Foram feitos controles com amostras de soro sabidamente positivas ou negativas para OPV. A atividade neutralizante contra as partículas IMV foi determinada e expressa como concentração de soro requerida para atingir 50% de redução de unidades formadoras de placa (UFP) por mililitro.

30

Os testes de inibição de cometas foram feitos em placas de 6 câmaras contendo células BSC-40, sob a confluência de 85-90%. A amostra VACV-WR foi diluída em

MEM 0% de SFB, e inoculada sobre as monocamadas, em um total de aproximadamente 40 UFP por câmara. Após 1 hora de adsorção, o inóculo foi removido e a monocamada foi lavada com PBS duas vezes. As amostras de soros testadas foram utilizadas no teste sob três diluições: 1:50, 1:250 e 1:500. As diluições de soro foram adicionadas em 2 mL de meio MEM 1% de SFB, e aplicadas sobre a monocamada. As placas foram incubadas por 72-96 horas, a 37°C, 5% CO₂, e então fixadas com solução de formaldeído a 3,7%, e coradas com cristal violeta. A inibição de cometas foi classificada como completa, parcial ou inexistente, considerando cada uma das diluições de soro utilizadas.

10

4.4. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para a amplificação de diferentes genes virais de OPV, foram utilizados iniciadores específicos para os genes da timidina quinase (*tk*) e do fator de crescimento viral (*vgf*), seguindo as condições químicas e térmicas descritas por FONSECA e colaboradores (1998). O gene viral codificador da proteína hemaglutinina (*ha*) foi amplificado utilizando os iniciadores específicos denominados EACP-1 e EACP-2, descritos por ROPP (1995). O produtos das reações foram fracionados em gel de agarose (1-2%), a uma voltagem de 100V, por 15 a 40 minutos. A visualização dos resultados foi feita em um transiluminador (UV), através da excitação do fluoróforo Gel-Red (Uniscience, Brasil) intercalado no material amplificado.

15
20

Todas as amostras de soro, órgãos e excretas utilizadas neste estudo foram primeiramente submetidas a uma triagem, utilizando uma PCR do tipo semi-nested para a detecção do gene *vgf* de OPV. A reação *semi-nested* PCR para a amplificação do gene *vgf* apresenta duas etapas. Na primeira, são utilizados os iniciadores VGF F e E, que amplificam um fragmento de 1536 pb. O produto desta reação foi utilizada como molde para a segunda etapa de amplificação, que utiliza os iniciadores VGF F e VGF R, cujo produto final é um amplificado de 381pb (TABELA 2) (ABRAHÃO *et al*, 2010).

25
30

TABELA 2: Relação dos iniciadores utilizados para a amplificação do gene *vgf* - PCR *semi-nested*

Iniciador	Seqüência	Tamanho amplicon (pb)	Referência
VGFR	3'CCAGAAGCTTTGGCACAACCAATATC 5'	381	FONSECA <i>et al.</i> , 1998
VGFF	5' CGCAGGATCCATAATCAGTCATT 3'		
E	3' ACAATGGATATTTACGAC 5'	1536	DRUMOND, 2007

- 5 Nas duas etapas de amplificação foram utilizadas as mesmas condições salinas e enzimáticas, descritas a seguir: 2,0mM de MgCl₂, 10mM dos nucleotídeos (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 2U de *Taq* DNA polimerase (Promega), 2,0µL de Tampão 10X de *Taq* polimerase, 4pmol dos iniciadores específicos, 1µL de amostra e 500ng de albumina sérica bovina (BSA), em um total de 20µL de reação.
- 10 As seguintes condições térmicas foram utilizadas para a amplificação do gene *vgf* na primeira reação: desnaturação inicial de 94°C por 9 minutos, seguido por 30 ciclos de 94°C por 1 minuto (desnaturação), 45°C por 1 minuto (pareamento), 72°C por 2 minutos (polimerização), e uma extensão final de 72°C por 7 minutos. O volume de 1µL desta 1ª reação foi utilizado, sem diluição, como amostra na 2ª
- 15 reação, cujas condições de amplificação foram: 94°C por 5 minutos; 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 45°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto, seguido de uma extensão final de 72°C por 7 minutos.

20 Como controle positivo foi utilizado 10⁴ UFP/µL de VACV-WR purificado por reação. Nos controles negativos, 1µL de água foi utilizado para substituir as amostras correspondentes. Os fragmentos amplificados foram fracionados por eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) 8%, sob voltagem de 100V e corados pela prata.

4.5. Sequenciamento e análise das seqüências de DNA

O sequenciamento foi feito pelo método de dideoxi descrito por SANGER *et al.*, (1977) em seqüenciador automático capilar Mega Bace1000 (Amersham/Pharmacia, Suécia), utilizando o Kit *Dy Enamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for Megabace* e obedecendo as condições de reação e leitura indicadas pelo fabricante.

Para cada fragmento foram feitas seis reações de sequenciamento, três com cada um dos iniciadores. As seqüências obtidas foram sobrepostas e o consenso foi obtido utilizando a plataforma Asparagin-Cenargen (EMBRAPA, 2010). As seqüências obtidas foram comparadas com as depositadas no banco de dados do “National Center for Biotechnology Information” através do programa BLAST 2.0 (<http://www.ncbi.nlm.gov/BLAST>.- Basic Local Alignment Tool (ALTSUCHL *et al.*, 1990). As seqüências nucleotídicas foram analisadas pelo programa BLAST N e as de aminoácidos foram analisadas pelo programa BLAST X. As seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos foram analisadas e utilizadas para a construção de árvores filogenéticas utilizando o programa MEGA 4.0 (KUMAR *et al.*, 1994).

20 4.6. Determinação de hospedeiros e reservatórios naturais de VACV

4.6.1. Expedições de campo: características das áreas visitadas

Com o intuito de verificar se espécies de roedores poderiam representar hospedeiros ou reservatórios naturais de VACV, quatro expedições de campo foram feitas para a captura desses animais em propriedades afetadas pela VB, no estado de Minas Gerais. Durante estes surtos, além da captura de roedores, foram coletadas amostras de sangue, crostas, líquido vesicular e swabs de úlceras, de bovinos e humanos acometidos pela doença. Além disso, baseado em estudos que demonstraram que partículas de VACV permanecem estáveis por longos períodos em fezes de camundongos experimentalmente infectados (ABRAHÃO *et al.*, 2009), foram coletadas excretas de roedores encontradas nas dependências das

propriedades visitadas. As equipes que participaram das expedições de campo foram formadas por biólogos, médicos veterinários e enfermeiros, em uma parceria do Laboratório de Vírus/ICB/UFMG, da Escola de Veterinária/UFMG e do Instituto René Rachou (FIOCRUZ-MG), contando com o apoio do Instituto Mineiro de Agropecuária (IMA).

A primeira expedição aconteceu no ano de 2005, durante um grande surto de VACV que aconteceu nas proximidades da cidade de Mariana (20°22'40''S – 43°24'57''W), centro do estado. Vários pequenos distritos da região registraram casos da doença, principalmente as localidades de Acaiaca e Goiabeiras. A região é localizada em uma área de transição de biomas, entre Mata Atlântica e Cerrado, alternando fragmentos de mata ombrófila densa e savanas. A altitude média da região é de aproximadamente 720 m, apresentando clima subtropical com médias de temperatura entre 15 e 18°C. O surto aconteceu durante a estação seca, que dura aproximadamente quatro meses do ano. A área apresenta alto nível de impacto antropogênico, com diversas áreas de pastos e lavouras (cana-de-açúcar, café e milho). Em algumas propriedades, porções de florestas limitam os quintais, currais e pastos, e segundo os moradores, animais selvagens eram frequentemente avistados nas redondezas, incluindo camundongos, ratos, gatos do mato, capivaras, siriemas, gambás, micos e garças-boiadeiras. De uma forma geral, as propriedades apresentavam infra-estrutura muito precária, e uma grande quantidade de entulho e lixo era observada nos quintais e em volta dos currais. Em todas as propriedades em que houve notificações de infecções por VACV a ordenha era manual, e o processo apresentava baixo nível de tecnificação. Roedores peridomiciliares e suas excretas, sobretudo *Mus musculus* e *Ratus norvegicus*, foram observados em diversas instalações das propriedades, incluindo os currais, armazéns e granjas de suínos. Algumas das propriedades, localizadas em Acaiaca, foram visitadas novamente pela equipe do Laboratório de Vírus/UFMG em 2009, e a situação permanecia muito semelhante com a observada em 2005. Segundo o IMA, foi o primeiro surto de vaccínia bovina notificado na região.

A segunda expedição aconteceu no ano de 2008, em um surto de VB que ocorreu na cidade de Paraguaçu (21°31'59"S e 45°45'59"W), e representou o primeiro surto notificado na região sul do estado de Minas Gerais. O perfil das propriedades rurais visitadas foi muito semelhante ao observado no surto de Mariana, com baixo nível de tecnificação na ordenha. Todavia, a região apresenta-se, exclusivamente, em uma área de Mata Atlântica, com altitude média de 825 m. O surto também aconteceu durante o inverno, e durou aproximadamente 2 meses. A temperatura média durante os dois dias de expedição foi de 17°C (dia). Dentre as regiões visitadas, esta foi a que apresentava maior impacto antropogênico, uma vez que a prática da pecuária leiteira era dividida com extensas áreas de lavoura cafeeira, produto tradicional do sul do estado. Foram observadas excretas de roedores em todas as propriedades visitadas. Em uma das propriedades que a comercialização do leite foi vetada pelo IMA, o proprietário descreveu a utilização do mesmo na alimentação de cães e gatos da propriedade. Apesar disso, nenhum desses animais apresentou sinais aparentes de infecção por VACV.

A terceira expedição de campo aconteceu na região de Doresópolis (20°17'13"S e 45°54'10"W), centro-oeste de Minas Gerais, em 2009. Mais de 15 propriedades foram afetadas pela doença, e durante os dois meses em que os surtos foram notificados, mais de 15 pessoas foram hospitalizadas (população de 1200 pessoas [IBGE, 2008]). A região está inserida integralmente em uma área de campos Cerrados, com altitude aproximada de 752 m, e temperatura média de 25°C. O inquérito epidemiológico revelou que a área já havia sido acometida por surtos exantemáticos semelhantes, porém nenhum registro oficial de confirmação do agente etiológico foi encontrado pelos funcionários do IMA. A maioria das propriedades afetadas também apresentava sinais de infestação por roedores, e algumas delas estavam localizadas muito próximas a áreas urbanas.

A última expedição foi realizada em setembro de 2009, e diferentemente das demais, não aconteceu em uma área em que estava ocorrendo um surto de VACV. As coletas aconteceram na cidade de Curvelo (18°45'21"S e 44°25'51"W), em uma área que, segundo moradores, uma doença com sinais clínicos muito semelhantes

à VB havia ocorrido em 2006. A região está localizada em uma área de Cerrado (subtipo cerrado), altitude média de 632 m, e temperatura média de 25°C durante o dia. Na ocasião, os proprietários relataram que uma grande quantidade de roedores silvestres e peridomiciliares estavam invadindo as propriedades em busca de alimento. Em algumas propriedades, mais de 40 roedores foram encontrados em piscinas e tanques de armazenamento de água, em uma única noite. Segundo os produtores rurais, a infestação de roedores causou perdas de mais de 60% em lavouras de milho e feijão. Apesar da ausência de relatos de VB durante a expedição, o estudo foi feito porque a detecção VACV em roedores poderia estar relacionada com o surto relatado em 2006 pelos proprietários.

A relação das amostras coletadas de roedores capturados durante as quatro expedições será apresentada no **item 4.6.2.**

15 **4.6.2. Captura de roedores e coleta de espécimes clínicos**

Para a captura de roedores, armadilhas do tipo Sherman (40x60x30cm) foram distribuídas nas propriedades rurais visitadas durante as expedições de campo. Foi utilizado como atraente uma composição contendo pasta de amendoim, bacon, banana e óleo de fígado de bacalhau. As armadilhas foram posicionadas em salas de ordenha, em armazéns, locais próximo a silagens, bordas de matas, lavouras de grãos ou cana, currais, granjas de suínos e pastagens (FIGURA 11).

As armadilhas foram preparadas e posicionadas nos locais indicados no período da tarde. Para evitar que os animais capturados ficassem prolongadamente expostos ao sol, a equipe verificava se haviam roedores nas armadilhas no início da manhã. No caso de armazéns e outros locais onde as armadilhas não ficavam expostas ao sol, a conferência foi feita, em alguns casos, após as 13 horas.

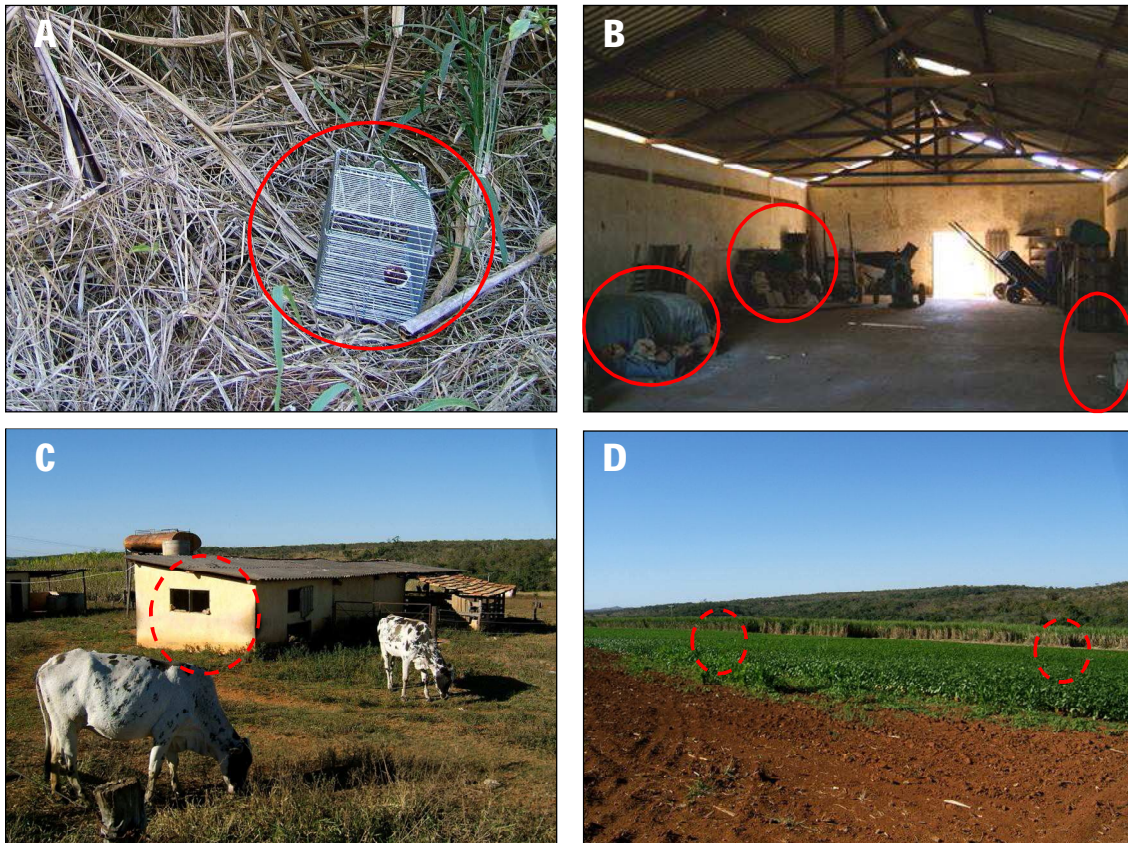


FIGURA 11: Painel ilustrando os locais onde as armadilhas para roedores foram posicionadas nas propriedades rurais visitadas. Os círculos indicam exatamente onde as armadilhas foram montadas. (A) lavoura de cana-de-açúcar; (B) armazém; (C) curral; (D) lavoura de feijão. Fotos obtidas durante a expedição de campo feita em Curvelo (MG), em 2009. Fotos gentilmente cedidas por Turrini, F.

Visando o início do processo de sedação dos roedores, as armadilhas contendo animais capturados foram colocadas dentro de uma caixa de isopor com tampa, onde foi então adicionado um algodão embebido em éter. Após 5 minutos, a armadilha era retirada do isopor e apoiada sobre uma bancada, para a administração de uma solução contendo anestésico e sedativo. Esta solução foi feita pela adição de 1.300 μ L de Ketamina (Vertanarcol®) a 50 mg/mL, 200 μ L de Cloridrato de Xilazina (Kensol®) a 20mg/mL e 1.500 μ L de PBS1x (RAMIREZ *et al.*, 2003 - modificado). Dependendo do tamanho do roedor capturado, um total entre 50 a 300 μ L desta solução foi inoculada pela via intraperitoneal.

Após a administração do anestésico, foi feita a coleta de sangue, através de punção cardíaca, utilizando uma seringa de insulina (500 μ L). Os animais foram então sacrificados por deslocamento cervical. Órgãos como fígado, baço, intestino, cérebro, pulmões, gônadas e peritônio foram coletados, acondicionados em tubos de microcentrífuga, e armazenados sob refrigeração até serem processados no Laboratório de Vírus/UFMG. Alguns animais foram fotografados para auxiliar no processo de identificação das espécies de roedor.

Amostras de fezes de roedores também foram coletadas em diversos locais das propriedades, sobretudo em armazéns, silos e currais. Este material foi acondicionado e armazenado conforme descrito para os órgãos dos roedores. Todo manuseio de roedores e suas fezes foi feito utilizando luvas e máscaras de proteção contra partículas biológicas. A TABELA 3 sumariza as espécies de roedores capturadas durante este estudo.

15

Em paralelo à captura de roedores, foi feita a coleta de amostras biológicas de humanos e bovinos. Amostras de crostas foram coletadas utilizando tesouras e pinças estéreis e acondicionadas em tubos de microcentrífuga; amostras de líquido vesicular foram coletadas utilizando seringas de insulina (500 μ L). Nos casos em que as lesões encontravam-se no estágio de úlcera, foram feitos swabs, que posteriormente foram acondicionadas em microtubos, sem a adição de qualquer solução. As amostras foram armazenadas sob refrigeração até serem processados no Laboratório de Vírus/UFMG.

25

30

TABELA 3: Relação dos roedores capturados e analisados neste estudo

	Localidade	Ano	Espécie	Identificação	Sexo
1	Mariana / Acaiaca	2005	<i>Mus musculus</i>	MmA1	ND
2	Mariana / Acaiaca	2005	<i>Mus musculus</i>	MmA2	ND
3	Mariana / Acaiaca	2005	<i>Mus musculus</i>	MmA3	ND
4	Mariana / Acaiaca	2005	<i>Mus musculus</i>	MmA4	macho
5	Mariana / Acaiaca	2005	<i>Rattus rattus</i>	RrA1	macho
6	Mariana / Acaiaca	2005	<i>Rattus rattus</i>	RrA2	ND
7	Mariana / Goiabeiras	2005	<i>Mus musculus</i>	MmG1	ND
8	Mariana / Goiabeiras	2005	<i>Rattus rattus</i>	RrG1	ND
9	Mariana / Goiabeiras	2005	<i>Rattus rattus</i>	RrG2	ND
10	Mariana / Goiabeiras	2005	<i>Mus musculus</i>	MmG2	ND
11	Mariana / Goiabeiras	2005	<i>Rattus sp.</i>	RG1	ND
12	Mariana / Goiabeiras	2005	<i>Rattus sp.</i>	RG2	ND
13	Mariana / Goiabeiras	2005	<i>Mus musculus</i>	MmG3	ND
14	Curvelo	2009	<i>Rattus norvergicus</i>	RnC1	macho
15	Curvelo	2009	<i>Mus musculus</i>	MmC1	fêmea
16	Curvelo	2009	<i>Mus musculus</i>	MmC2	fêmea
17	Curvelo	2009	<i>Mus musculus</i>	MmC3	macho
18	Curvelo	2009	<i>Rattus norvergicus</i>	RnC2	macho
19	Curvelo	2009	<i>Mus musculus</i>	MmC4	macho

ND= não determinado

5 O processamento dos espécimes clínicos bovinos e humanos foi feito conforme descrito por TRINDADE e colaboradores (2007). O processamento dos órgãos dos roedores foi feito segundo FERREIRA e colaboradores (2008). As amostras processadas foram submetidas ao isolamento viral em células Vero, CEF ou BSC-40 (FERREIRA *et al.*, 2008). Ao todo, foram feitas pelo menos duas passagens

10 cegas visando o isolamento. As amostras de soro murinas, bovinas e humanas foram submetidas a ensaios de soroneutralização para a detecção de anticorpos anti-OPV, conforme descrito no **item 4.3.** A TABELA 4 sumariza os espécimes clínicos coletados durante as expedições feitas em Mariana, Paraguaçu, Doresópolis e Curvelo.

15

20

TABELA 4: Relação das amostras coletadas e analisadas neste estudo

	Localidade	Ano	Amostra/detalhes	Espécie
1	Mariana / Acaiaca	2005	Crosta	<i>Bos taurus</i>
2	Mariana / Acaiaca	2005	Liq Vesicular	<i>Homo sapiens</i>
3	Mariana / Acaiaca	2005	Sangue	<i>Bos taurus</i>
4	Mariana / Acaiaca	2005	Sangue	<i>Homo sapiens</i>
5	Mariana / Acaiaca	2009	Fezes de roedor/Curral	NI
6	Mariana / Acaiaca	2009	Fezes de roedor/armazém	NI
7	Mariana / Acaiaca	2009	Fezes de roedor/armazém2	NI
8	Mariana / Acaiaca	2009	Fezes de roedor/quintal	NI
9	Mariana / Acaiaca	2009	Fezes de roedor/galinheiro	NI
10	Mariana / Acaiaca	2009	Fezes de roedor/granja suína	NI
11	Mariana / Acaiaca	2009	Sangue	<i>Bos taurus</i>
12	Mariana / Acaiaca	2009	Sangue	<i>Bos taurus</i>
13	Paraguaçu	2008	Fezes de roedor/armazém	NI
14	Paraguaçu	2008	Fezes de roedor/quintal	NI
15	Paraguaçu	2008	Fezes de roedor/Curral	NI
16	Paraguaçu	2008	Fezes de roedor/granja suína	NI
17	Paraguaçu	2008	Crosta	<i>Bos taurus</i>
18	Paraguaçu	2008	Liq Vesicular	<i>Homo sapiens</i>
19	Paraguaçu	2008	Sangue	<i>Bos taurus</i>
20	Paraguaçu	2008	Sangue	<i>Homo sapiens</i>
21	Doresópolis	2009	Fezes de roedor/armazém	NI
22	Doresópolis	2009	Fezes de roedor/quintal	NI
23	Doresópolis	2009	Fezes de roedor/galinheiro	NI
24	Doresópolis	2009	Fezes de roedor/Curral	NI
25	Doresópolis	2009	Sangue	<i>Homo sapiens</i>
26	Doresópolis	2009	Crosta	<i>Bos taurus</i>
27	Doresópolis	2009	Sangue	<i>Bos taurus</i>
28	Doresópolis	2009	Sangue	<i>Homo sapiens</i>
29	Doresópolis	2009	Sangue	<i>Homo sapiens</i>
30	Curvelo	2009	Sangue	<i>Bos taurus</i>
31	Curvelo	2009	Sangue	<i>Bos taurus</i>
32	Curvelo	2009	Sangue	<i>Bos taurus</i>
33	Curvelo	2009	Sangue	<i>Bos taurus</i>
34	Curvelo	2009	Fezes de roedor/armazém	NI
35	Curvelo	2009	Fezes de roedor/armazém	NI
36	Curvelo	2009	Fezes de roedor/armazém	NI
37	Curvelo	2009	Carcaça roedor/armazém	<i>Mus musculus</i>

NI: não identificada

5

4.6.3. Caracterização biológica e molecular de amostras de VACV isoladas de roedores capturados em áreas acometidas pela vaccínia bovina

Amostras de VACV isoladas de roedores foram comparadas com amostras isoladas de bovinos e humanos, isoladas durante o mesmos surtos de vaccínia bovina. As amostras murinas, bovinas e humanas foram multiplicadas separadamente em Vero, purificadas, e então submetidas a testes biológicos e

10

moleculares. Após a purificação, as amostras foram inoculadas em MCA (**item 4.2.4.**), submetidas a testes de curva de ciclo único e de fenótipo de placas virais (**item 4.2.8.**). Os isolados também foram submetidos a testes de imunofluorescência (**item 4.2.7.**). A comparação molecular foi feita baseada nos genes *tk*, *vgf* e *ha* (**item 4.4.**), que foram amplificados e sequenciados (**item 4.5.**). As sequências obtidas dos isolados murinos, humanos e bovinos foram alinhadas, comparadas e analisadas filogeneticamente (**item 4.5.**). A amostra VACV-WR foi utilizada como controle positivo em todos os testes acima descritos.

10 **4.6.3.1. Teste de virulência dos isolados virais em camundongos Balb/c**

Os testes de virulência dos isolados murinos, bovinos e humanos foram feitos em camundongos Balb/c, como descrito por FERREIRA e colaboradores (2008). Desta forma, grupos de 4 camundongos Balb/c machos com 4 semanas, foram inoculados pela via intranasal, com 10^6 UFP de cada isolado. A inoculação foi feita posicionando o focinho dos animais, previamente anestesiados (**item 4.6.2.**), sobre uma gota de 10 μ L de solução viral aplicada na superfície de uma placa de Petri. Após inspirar a solução viral, os animais foram colocados dentro de gaiolas contendo microisoladores, e levados para o biotério do Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG. De forma comparativa, grupos de 4 camundongos também foram infectados com as amostra de VACV GP2V e BAV. Um grupo foi inoculado com PBS.

Todos os camundongos foram examinados e pesados diariamente para a observação do aparecimento dos sinais clínicos. Para verificar a eliminação de dos isolados virais em excretas murinas (FERREIRA *et al.*, 2008), as fezes dos camundongos foram coleadas no 1º, 5º, 10º e 15º dias pós-infecção (d.p.i.). As fezes foram processadas (FERREIRA *et al.*, 2008) e submetidas a ensaios de PCR (**item 4.4.**) e titulação viral (HUTSON *et al.*, 2009). No 15º d.p.i. os camundongos foram anestesiados e sacrificados por deslocamento cervical, para a coleta de sangue, visando ensaios de soroneutralização (**item 4.3.**).

Em paralelo, grupos de 3 animais foram infectados pela via intranasal com as mesmas amostras virais, conforme acima descrito. No 5ºd.p.i., os animais foram sacrificados e amostras de intestino foram coletadas. Esses órgãos foram submetidos à titulação viral em células BSC-40 (FERREIRA *et al.*, 2008). Todas as amostras foram armazenadas em freezer -70°C até serem processadas.

4.6.4. Análise de coleções de soros de espécies de vertebrados silvestres ou mantidos em cativeiro

Com o intuito de determinar se outras espécies de vertebrados poderiam representar hospedeiros ou reservatórios de VACV, coleções de soros de animais silvestres ou mantidos em cativeiro foram submetidas a testes sorológicos e moleculares, a fim de analisar a presença de anticorpos anti-OPV e DNA de viral. A primeira coleção analisada foi gentilmente cedida pela Profa. Zélia Lobato (Escola de Veterinária, UFMG), sendo composta por amostras de soro de várias espécies de animais silvestres. Estas amostras foram coletadas durante um projeto de resgate de fauna, em decorrência do alagamento de uma área de floresta Amazônica, durante a construção de uma usina hidroelétrica no Rio Tocantins, nos municípios de Lajeado e Ipueiras (09°44'58"S e 48°21'23"O) (TO). Na ocasião da coleta, não existiam notificações de surtos de vaccínia bovina na região. O primeiro surto de VACV notificado neste estado aconteceu no ano de 2009 (MEDAGLIA *et al.*, 2009). Ao todo, foram coletadas 344 amostras de soro, como apresentado na TABELA 5. Todas as amostras foram submetidas a ensaios de soroneutralização (**item 4.3.**) e PCR (**item 4.4.**) para a detecção dos genes *vgf* e *ha* de OPV. Algumas das amostras positivas na PCR foram sequenciadas e analisadas, conforme descrito no **item 4.5.**

A outra coleção analisada foi gentilmente cedida pela Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte. As amostras de soro foram coletadas por veterinários da instituição, e abrange uma grande variedade de táxons de vertebrados, incluindo aves, mamíferos e répteis. A análise da soroprevalência de animais de zoológico OPV-positivos foi feita uma vez que surtos de CPXV têm sido descritos em animais

mantidos em cativeiro na Europa (ZWART *et al.*, 1971; MARENNIKOVA *et al.*, 1977; MÄTZ-RENSING *et al.*, 2006). Assim como descrito para a coleção anterior, os soros dos animais da Fundação Zoobotânica também foram submetidos a ensaios de soroneutralização (item 4.3.) e PCR (item 4.4.). A relação dos soros desta coleção também foi sumarizada na TABELA 5.

TABELA 5: Relação das amostras de soro de vertebrados silvestres ou mantidos em cativeiro, analisadas no presente estudo.

	Espécie	Nome popular	Nº de soros	Ano da coleta	Local
10	<i>Cebus apela</i>	macaco-prego	269	2001-2002	Lajeado-Ipueiras (TO)
	<i>Alouatta caraya</i>	macaco guariba	27	2001-2002	Lajeado-Ipueiras (TO)
	<i>Nasua nasua</i>	quati	12	2001-2002	Lajeado-Ipueiras (TO)
	<i>Dasyprocta sp.</i>	cotia	20	2001-2002	Lajeado-Ipueiras (TO)
	<i>Didelphis albiventris</i>	gambá	2	2001-2002	Lajeado-Ipueiras (TO)
	<i>Euphractus sexcinctus</i>	tatu	5	2001-2002	Lajeado-Ipueiras (TO)
	<i>Tamandua tetradactyla</i>	tamanduá-mirim	5	2001-2002	Lajeado-Ipueiras (TO)
	<i>Cerdocyon thous</i>	raposa cinzenta	4	2001-2002	Lajeado-Ipueiras (TO)
	<i>Eunectes murinus</i>	sucuri	2	2004	Fundação Zoo-Bot.BH (MG)
	<i>Caiman latirostris</i>	jacaré do papo-amarelo	3	2004	Fundação Zoo-Bot.BH (MG)
15	<i>Amazona brasiliensis</i>	papagaio de cara-roxa	1	2004	Fundação Zoo-Bot.BH (MG)
	<i>Boa constrictor</i>	jibóia	1	2004	Fundação Zoo-Bot.BH (MG)
	<i>Crocodylus acutus</i>	crocodilo	1	2004	Fundação Zoo-Bot.BH (MG)
	<i>Rhea americana</i>	ema	1	2004	Fundação Zoo-Bot.BH (MG)
	<i>Panthera onca</i>	onça pintada	1	2004	Fundação Zoo-Bot.BH (MG)
	<i>Chrysocyon brachyurus</i>	lobo guará	6	2004	Fundação Zoo-Bot.BH (MG)
	<i>Tapirus terrestris</i>	anta	4	2004	Fundação Zoo-Bot.BH (MG)
	<i>Lama glama</i>	lhama	2	2004	Fundação Zoo-Bot.BH (MG)
	<i>Panthera leo</i>	leão	1	2004	Fundação Zoo-Bot.BH (MG)
	<i>Taurotragus oryx</i>	elande	2	2004	Fundação Zoo-Bot.BH (MG)
20	<i>Loxodonta africana</i>	elefante	1	2004	Fundação Zoo-Bot.BH (MG)
	<i>Pan troglodytes</i>	chimpanzé	1	2004	Fundação Zoo-Bot.BH (MG)
	<i>Panthera pardus</i>	leopardo	1	2004	Fundação Zoo-Bot.BH (MG)
	<i>Blastocerus dichotomus</i>	cervo do pantanal	1	2004	Fundação Zoo-Bot.BH (MG)
	<i>Myrmecophaga tridactyla</i>	tamanduá-bandeira	3	2004	Fundação Zoo-Bot.BH (MG)
	<i>Cebus apela</i>	macaco-prego	1	2004	Fundação Zoo-Bot.BH (MG)
	<i>Mandrillus sphinx</i>	mandril	1	2004	Fundação Zoo-Bot.BH (MG)
	<i>Speothos venaticus</i>	cachorro do mato	1	2004	Fundação Zoo-Bot.BH (MG)
	<i>Tamandua tetradactyla</i>	tamanduá-mirim	1	2004	Fundação Zoo-Bot.BH (MG)
	<i>Gorilla gorilla</i>	gorila	1	2004	Fundação Zoo-Bot.BH (MG)

25

30

4.7. Padronização de um sistema *prime-boost* de vacinação contra OPV

4.7.1. Imunógeno inativado BAV

4.7.1.1. Inativação por β -propiolactona (THORNTON, 1980 - modificado)

5 O vírus BAV previamente titulado em 10^7 UFP/ μ L foi transferido para um erlenmeyer e em seguida, adicionado β -propiolactona (Sigma) na proporção de 1:100 (ISLAS *et al.*, 1995; FRAZATTI-GALLINA *et al.*, 2004). A solução foi mantida sob agitação por 2 horas a 37°C, sendo o pH monitorado por meio de um potenciômetro (MB-10-Marte, Brasil), corrigido para pH 7,2 pela adição de K_2HPO_4
10 1M estéril, quando necessário. Após este período, o vírus foi incubado à temperatura de 25°C e a agitação foi mantida por mais 4 horas.

A suspensão viral inativada foi coletada e dialisada em PBS 0,8% por 24 horas, a 4°C (SAMBROOK *et al.*, 1989). A diálise da amostra inativada foi feita com o
15 objetivo de se retirar a β -propiolactona, e seus produtos de degradação. A membrana de diálise (12000-14000 MWCO) foi preparada conforme instruções do fabricante (Spectral Medical Industries Inc., E.U.A.), autoclavada após o preparo, e em seguida, armazenada imersa em água Milli-Q estéril a 4°C. Ao final da diálise, a amostra foi armazenada a -70°C.

20

O imunógeno inativado BAV foi desenvolvido e testado por FERREIRA (2008), no Laboratório de Vírus – ICB/UFMG. No protocolo padrão, são administradas 2 doses com 10^7 UFP de BAV inativado, em 100 μ L, pela via subcutânea, em intervalos de 4 semanas.

25

4.7.1.2. Inativação térmica de BAV

Visando reduzir o tempo utilizado para inativação de BAV, uma metodologia de inativação térmica de VACV foi testada em paralelo à inativação química. Segundo
30 PULFORD (2004), a inativação consiste em aquecer a 60°C, por 2 horas, alíquotas virais de 100 μ L, contendo 10^7 UFP/ μ L. Para isso, foram utilizados tubos de microcentrifuga pequenos (200 μ L), e o aquecimento foi feito em um termociclador

(Eppendorf, Mastercycler, Alemanha). O tempo necessário para inativação de BAV foi testado, e alíquotas desse vírus foram expostas ao aquecimento por 15, 30, 45, 30, 90, 120 ou 150 minutos. Ao final de cada tempo a alíquota viral foi titulada em células CEF (**item 4.2.6.**). O experimento foi feito em triplicata.

5

4.7.1.3. Testes de inativação

Para a avaliação e comprovação da inativação viral foram utilizados células CEF e ovos embrionados.

10

Para inoculação em células, um volume de 100 µL de BAV inativado por beta-propiolactona e termicamente (2 horas de aquecimento) foi diluído em 0,4 mL de MEM acrescido de glutamina, antibióticos e antifúngico. A inoculação da suspensão viral foi feita em monocamadas de CEF com confluência de 90%,
15 implantadas em garrafas de cultivo celular de 25cm². O meio de cultura foi removido e a monocamada lavada com PBS. Em seguida, foram acrescentados 0,1 mL da suspensão viral inativada e, em paralelo, feito um controle da viabilidade celular e um controle de vírus, em duplicata. As células foram incubadas a 37°C, homogeneizadas por 1 hora, de 15 em 15 minutos. Em seguida, o volume de meio
20 foi completado para 5 mL suplementado com 1% de SFB (Cultilab). As células foram observadas quanto ao aparecimento de ECP por um período de 48 a 96 horas. Uma das garrafas de cada teste foi fixada em formol e corada com cristal violeta para contagem de placas. Da outra garrafa, o meio foi descartado, as células foram congeladas e descongeladas por três vezes em Tris 10 mM pH8,0 e,
25 posteriormente, centrifugadas a 1.500 rpm (Sorvall, RT6000) a 4°C. O sobrenadante foi coletado, sendo 1 mL deste, repassado em 6 vezes sucessivas em células Vero. Esse processo foi feito para as garrafas com as suspensões virais inativadas, com os controles positivos, inoculados com o BAV não-inativado e com os controles negativos, inoculados com PBS (THORNTON, 1980; SOMEKH *et al.*,
30 2004).

Para inoculações em MCA, foram utilizados 10^7 UFP de vírus BAV inativado, por ambos os métodos. Após incubação por 72 horas a 37°C, as MCA infectadas foram retiradas assepticamente, e armazenada a -70°C. Foram feitas duas passagens consecutivas em MCA, em duplicata, as quais foram coletadas e maceradas com areia autoclavada para inoculação em CEF para confirmação da inativação viral. Os controles negativos consistiram na inoculação da MCA com PBS e os controles positivos, na inoculação com 1000 UFP do vírus BAV não inativado (THORNTON, 1980).

10 4.7.2. Vacina de DNA: B5R e H3L

As vacinas B5R-DNA e H3L-DNA foram descritas por PULFORD e colaboradores (2004). O protocolo cujos melhores resultados foram observados utilizou 4 doses, com intervalos de 3 semanas, com 50µg do plasmídeo pTarget (Promega, E.U.A.) com o gene B5R em janela de leitura. A administração da vacina foi feita pela via intramuscular, com um volume de 100uL, nos membros traseiros.

As vacinas de DNA expressando as proteínas B5R ou H3L utilizadas no presente estudo foram obtidas de uma biblioteca de ORFs de VACV (gentilmente cedidos pelo Dr. Bernard Moss, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, E.U.A.). As ORFs foram clonadas no plasmídeo pcDNA3.1-V5-his-TOPO (Invitrogen), e encontram-se sob a regulação de um promotor de citomegalovírus, e portanto são expressas em células eucariotas. Algumas vacinas de DNA utilizando este vetor foram descritas (FRAGAKI *et al*, 2001; LI *et al.*, 2004, LIU *et al.*, 2004).

Os plasmídeos contendo B5R ou H3L foram inseridos em bactérias *E.coli DH5α* e, posteriormente, clones bacterianos foram triados por PCR, utilizando os iniciadores T7-F e BGH-R (pcDNA3.1). Ao todo, 5 clones bacterianos de cada gene foram submetidos a extração plasmidial em pequena escala (MiniPreps DNA plasmidial extraction kit, Promega). Para confirmar a integridade das sequências nucleotídicas de B5R e H3L nas construções, os plasmídeos foram sequenciados e as sequências obtidas comparadas com outras disponíveis no GenBank (item 4.5.).

Para confirmar a expressão das proteínas B5R e H3L, células BSC-40 implantadas em lamínulas de microscopia foram transfectadas com as construções separadamente, utilizando um kit de transfecção de células eucariotas (Lipofectamina, Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. Após a transfecção, as células foram incubadas com meio Opti-MEM (Gibco) contendo 1% SFB, por 24 horas, a 37°C, 5% de CO₂. Após este período, as lamínulas, contendo as células transfectadas, foram fixadas e submetidas a ensaios de imunofluorescência, utilizando anticorpos específicos para a detecção de B5R e H3L (**item 4.2.7.**).

Os clones bacterianos selecionados, contendo as sequências de B5R ou H3L, foram propagados em meio LB por 18 horas, e então submetidos à extração de DNA plasmidial em larga escala (Maxi-Preps Qiagen endotoxin-free). O DNA obtido foi quantificado em espectrofotômetro Nanodrop (ND-1000) e conservado a -70°C.

4.7.3. Preparo dos imunógenos para vacinação (FERREIRA, 2008)

Para o preparo dos imunógenos foi utilizado como adjuvante Emulsigen® (Laboratórios MVP, Ralston, NE), que é autorizado pelo Ministério da Agricultura Americano para uso em vacinas veterinárias para ser administrado pelas vias intramuscular e subcutânea. A fórmula utilizada foi composta (% p/p) de 5% de Rehydragel LV® (Reheis, U.S.A) - dispersão coloidal de hidróxido de alumínio - , 25% de Emulsigen® (Laboratórios MVP, Ralston, NE) e 70% de suspensão viral inativada e/ou B5R DNA e/ou H3L-DNA. Inicialmente, sob fluxo laminar, o Rehydragel® foi vertido em um béquer, seguido da adição do imunógeno inativado ou das vacinas de DNA. Esta mistura foi mantida à temperatura ambiente, sob agitação de 2000 rpm utilizando o aparelho Eurostar Basic, Brasil. Após 1 hora, a suspensão obtida foi vertida em um béquer contendo o Emulsigen® e a agitação foi mantida por mais 1 hora a 2000 rpm (Eurostar Basic, Brasil) à temperatura ambiente. Ao término do processo, o imunógeno foi envazado e conservado a 4°C até o momento do uso. A administração dos imunógenos, simples ou compostos,

foi feita pela via subcutânea, na parte interna da coxa esquerda, utilizando o volume de 100µL. Cada dose de imunógeno contém 10^7 UFP de BAV inativado, 40µg de B5R-DNA ou 40µg de H3L-DNA.

5 **4.7.4. Avaliação da resposta imune humoral pós-vacinação (FERREIRA, 2008)**

Grupos contendo quatro camundongos Balb/c machos, com 4 semanas de idade, foram imunizados pela via subcutânea. Os imunógenos foram administrados utilizando os sistemas de dose única, prime-boost homólogo ou prime-boost-heterólogo, conforme indicado na FIGURA 12.

Um grupo de 4 animais foi imunizado com amostra VACV-LST (10^6 PFU/100µL) em um sistema de prime-boost homólogo, e um grupo de camundongos foi imunizado apenas com adjuvante. Em todos os grupos, o intervalo entre as imunizações foi de três semanas. Três semanas após a última dose, os animais foram sacrificados, e amostras de sangue foram coletadas para ensaios de soroneutralização, testes de inibição de cometas e ELISA.

20 **4.7.5. Desafio de camundongos vacinados**

A proteção dos sistemas de vacinação sumarizados na FIGURA 12 foi avaliada através do desafio dos camundongos com a amostra viral VACV-WR. Foram utilizados 4 camundongos por grupo, e o desafio foi feito 3 semanas após a última dose. Foi avaliada a proteção contra 5×10^6 UFP de VACV-WR. Após o desafio, foram analisados parâmetros como a perda de peso e mortalidade. Além disso, foi utilizada uma metodologia descrita por PULFORD (2004) na qual o *score* da doença foi avaliado, baseado em 5 níveis distintos, que variam entre 0 e 100%: 20% - pilo ereção discreta; 40% - pilo-ereção substancial; 60% -arqueamento de dorso; 80% - edema facial ou plantar e dificuldade respiratória; 100% - morte. A pontuação foi atribuída, considerando que pelo menos 50% dos animais do grupo devessem apresentar os sinais clínicos acima relacionados. Os camundongos imunizados e desafiados foram avaliados até o 14º d.p.i., e então foram

sacrificados por aprofundamento de anestésico (item 4.6.2.) seguido por deslocamento cervical.

Prime	Boost
LST-BTT	LST-BTT
BAV	-
BAV	BAV
BAV	B5R-DNA
BAV	H3L-DNA
BAV+ H3L-DNA	BAV + H3L-DNA
BAV+ B5R-DNA	BAV + B5R-DNA
BAV+ B5R-DNA	-
BAV+ H3L-DNA	-
BAV+ H3L-DNA + B5R-DNA	-
BAV+ H3L-DNA + B5R-DNA	BAV+ H3L-DNA + B5R-DNA
H3L-DNA	-
H3L-DNA	H3L-DNA
B5R-DNA	-
B5R-DNA	B5R-DNA
B5R-DNA + H3L-DNA	-
B5R-DNA + H3L-DNA	B5R-DNA + H3L-DNA
BAV Inativação térmica	BAV Inativação térmica
BAV + H3L-DNA	BAV + B5R-DNA
Adjuvante	Adjuvante

5

FIGURA 12: Relação dos sistemas de vacinação utilizados neste estudo.

4.8. Clonagem e expressão das proteínas B5R e H3L em sistema procarioto

10 4.8.1. Clonagem de B5R e H3L em pQE9

Visando a expressão de B5R e H3L em sistema procarioto as ORFs completas destes genes foram amplificadas e clonadas no sistema de expressão pQE9 (QIAGEN, EUA). Iniciadores específicos foram designados a partir da análise do genoma completo da amostra VACV-WR (AY243312). As ORFs de B5R e H3L foram analisadas quanto a presença de sítios de restrição internos utilizando a plataforma WebCutter (bio.lundberg.gu.se/cutter2/). A partir destas análises, foi adicionado, a cada iniciador, sítios de restrição específicos para clonagem em pQE9.

20

As sequências dos iniciadores utilizados são: B5R F Sall: 5' GTCGACAAAACGATTTCCGTTG 3' e B5R R HindIII:5' AAGCTTTTACGGTAGCAATTTATGGAAC 3', contendo sítios de Sall e HindIII, respectivamente; para a amplificação e clonagem de H3L em pQE9 foram utilizados os iniciadores: H3L F HindIII: 5' AAGCTTTTAGATAAATGCGGTAAC 3' e H3L R BamHI: 5' GGATCCGCGGCGGCGGCGAAAAC 3', com os sítios de HindIII e BamHI, respectivamente. Nas reações foram utilizados 2mM de MgCl₂, 10mM de dNTP, 4pmol de cada iniciador, 2U de Taq DNA polimerase e tampão dessa enzima. Como amostra, foram utilizados 50ng de DNA de VACV-WR purificado. As condições térmicas utilizadas foram: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos; seguido por 30 ciclos de desnaturação a 95°C por 1 minuto, pareamento dos iniciadores a 45°C por 1 minuto e síntese de DNA a 72°C por 1 minuto; por fim, 7 minutos de extensão final a 72°C. Os amplificadas foram submetidos a fracionamento por eletroforese (100V) em gel de agarose 1%.

15

Após a amplificação de B5R e H3L a partir de VACV-WR, os fragmentos com tamanho esperado (~950pb) foram extraídos do gel de agarose (Qiagen Gel Extraction Kit), quantificados em espectrofotômetro (Nanodrop 1000), e então subclonados em pGEM-T easy, seguindo as instruções do fabricante. Após a ligação, as construções pGEMT-B5R e pGEMT-H3L foram propagadas em bactérias *E. coli* DH5α (SAMBROOK *et al.* 1989), e então submetidas a extração de DNA plasmidial, utilizando o Kit Minipreps Plasmidial Extraction (Promega), segundo instruções do fabricante.

25 As construções pGEMT-B5R e pGEMT-H3L, assim como o vetor plasmidial de expressão pQE9, foram então submetidos a digestão enzimática, utilizando as enzimas HindIII e BamHI ou Sall e HindIII (Fermentas). Após 3 horas de incubação a 37°C, os amplificadas foram fracionadas por eletroforese (100V) em gel de agarose 1%. Os fragmentos de interesse, correspondentes aos insertos B5R ou H3L digeridos, e ao vetor pQE9 digerido, foram extraídas do gel de agarose (Qiagen Gel Extraction Kit) e quantificadas em espectrofotômetro (Nanodrop 1000). Em seguida, foi feita a ligação de B5R ou H3L no vetor pQE9, utilizando o Kit T4

DNA ligase (Promega), nas proporções 1:3 e 1:8 (vetor:inserto). Após 12 horas a 4°C, as construções foram submetidas a transformação bacteriana (SAMBROOK *et al.*, 1989), utilizando a linhagem *E. coli* M15. Os clones contendo a construção foram triados por PCR, utilizando iniciadores específicos e/ou do plasmídio (pQE-F e pQE-R).

4.8.2. Cromatografia de afinidade (HOCHULI, 1990)

Clones bacterianos contendo os plasmídios de expressão pQE9 ligados a H3L ou B5R foram inoculados em meio de cultura, contendo antibióticos e incubados por 18 horas a 37 °C sob agitação de 180 rpm. Após este período foi feita a diluição na proporção de 1:10, em meio de cultura, contendo antibióticos e novamente incubado a 37 °C, sob agitação de 180rpm até atingir a DO_{600nm} . Neste momento, foi retirada uma amostra (1mL) da cultura não-induzida, utilizada como controle negativo da expressão e, ao restante da cultura, foram adicionados 4mM de IPTG. O restante foi centrifugado a 4000 rpm (Sorvall RC-5B, rotor GS3) por 30 min. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado foi homogeneizado com 10% do volume inicial da cultura de tampão A (6M Guanidina HCl, 0.1M fosfato de sódio, 0,01M tris /HCl pH 8,0), e incubado por 30 min sob agitação de 100 rpm. O lisado bacteriano obtido foi centrifugado a 8000 rpm (Sorvall RC-5B, rotor SS34) por 30min a 4°C, o sobrenadante coletado e armazenado, e o pellet utilizado na purificação (FENG *et al.*, 2002). O sedimento foi então resuspendido em tampão A e submetido a 2 ciclos de sonicação (potência 50%), por 12 minutos cada.

A esta solução foi então adicionada resina de quelato de níquel (QIAGEN, EUA) carregada com Ni_2^+ . A mistura resina/proteína foi colocada em um tubo cônico de 50 mL, selado e incubado durante 1h à temperatura ambiente sob agitação constante e lenta. Após a ligação da resina as proteínas recombinantes, por intermédio da cauda de histidina, presente na extremidade amino-terminal da proteína, a resina/proteína foi então transferida para uma coluna de 1 cm de diâmetro e 6 cm altura onde foi compactada. Para proceder a eluição da proteína, foram adicionados à coluna tampão de eluição (8M uréia, 0.1M fosfato de sódio,

0,01M tris/ HCl) em diferentes valores de pH, aumentando gradativamente a acidez da solução. O eluato foi coletado em diversas alíquotas, de acordo com o pH. Estas foram mantidas a 4 °C até o momento do uso.

5 4.8.3. Caracterização da proteína – PAGE (LAEMMLI, 1970).

Para controle da purificação de B5R e H3L, os eluatos proteicos foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE). Após fervura em tampão de amostra (20% glicerol, 20% SDS, 0,375M Tris pH 8,8, 0,75M, mercaptoetanol e 10 0,25 % v/v do corante azul de bromofenol) (Sigma, EUA), as amostras foram separadas por fracionamento eletroforético em gel de poliacrilamida bifásico a 10% (acrilamida/bisacrilamida na proporção 30:0,8) em tampão Tris-glicina (Tris base 25 mM pH 8,3, glicina 250 mM, SDS 0,1%). O fracionamento foi feito por 3 horas a 100V. O gel foi corado em solução coomassie blue (0,25% p/v do corante 15 coomassie blue R 250) (Sigma, EUA) durante 1 hora, à temperatura ambiente e sob agitação constante. Em seguida, foi descorado por 2h em solução fixadora I (40% metanol, 10% ácido acético glacial, 50% água) e então transferido para outra solução descorante por 2 h, fixadora II (etanol 10%, ácido acético 5%, água 85%) até a visualização das bandas, ao fundo do gel. Os géis foram desidratados entre 20 duas folhas de papel celofane e presas sobre uma placa de vidro, a temperatura ambiente durante 48 h.

4.9. Ensaio de Western blot

25 Para caracterizar as proteínas H3L e B5R recombinantes, estas foram submetidas à ensaios de Western blot utilizando anticorpos monoclonais específicos. Com este intuito, tampão LB (“loading buffer”) 5× (Tris-HCl 0,5M pH 6,8; β-mercaptoetanol 5%; azul de bromofenol 0,1% (p/v); glicerol 20% (p/v)) foi 30 adicionado a alíquotas de cerca de 50ng das proteínas recombinantes, que foram então desnaturadas por 5 min a 99°C. As proteínas foram fracionadas em gel de 10% poliacrilamida/SDS (PAGE) a 100V e transferidas para membrana de

nitrocelulose (Hybond ECL, GE Healthcare), conforme o protocolo do “*Kit Bio-Rad Transferency*” (Bio-Rad Laboratories, USA). Após a transferência, as membranas foram coradas com Ponceau 1% para a verificação da eficiência da mesma. A seguir, as membranas foram bloqueadas durante 1 hora em solução de leite em pó desnatado a 5% (p/v) e Tween-20 a 0,1% (v/v) em PBS. Após o bloqueio, as membranas foram lavadas três vezes em PBS/Tween-20 a 0,1% e incubadas com os anticorpos primários desejados por 24h a 4°C, na diluição de 1:3000, em albumina sérica bovina (BSA) a 5% (p/v) em PBS/Tween-20. As membranas foram novamente lavadas três vezes em PBS/Tween-20 e incubadas, por 1h a temperatura ambiente, com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase, na diluição recomendada pelo fabricante em leite em pó desnatado a 5% (p/v) em PBS/Tween-20. Após nova sessão de lavagens por três vezes em PBS/Tween-20, as membranas foram incubadas em solução reveladora ECL Plus (GE Healthcare) pelo tempo recomendado pelo fabricante, expostas contra filme de raio X (Hyperfilm ECL-GE Healthcare) e reveladas de acordo com as instruções do fabricante (Kodak). Os anticorpos primários monoclonais anti-B5R e –H3L foram gentilmente cedidos pelo Dr. Bernard Moss (National Institute of Allergy and Infectious Diseases, E.U.A.)

20 **4.10. ELISA anti-OPV utilizando B5R e H3L recombinantes**

Visando avaliar a presença de anticorpos totais anti-VACV em camundongos imunizados com as vacinas BAV, B5R-DNA e/ou H3L-DNA (item 4.7.5.), um ELISA foi padronizado utilizando como antígenos as proteínas recombinantes B5R e H3L. Para isso, um total de 50ng de B5R ou H3L recombinantes foi diluído em tampão carbonato (0,01M, pH6) e então adicionadas em placas para ELISA (Maxisorp Nunc, Apogent, EUA). Após 15 horas, o antígeno foi retirado e a placa foi lavada 3 vezes com uma solução de Tween-20 0,05% em PBS. O bloqueio foi feito utilizando uma solução de leite em pó desnatado (1%) diluído em PBS-Tween 0,05%. Após 2 horas de incubação a 37°C, a solução de bloqueio foi retirada e a placa foi lavada três vezes. Em seguida foram adicionadas as amostras de soro murino, diluídas 100 vezes em PBS-Tween 0,05%. Após 1 hora de incubação, as

amostras de soro foram retiradas e a placa foi novamente lavada 3 vezes com PBS-Tween 0,05%. Foi então adicionado conjugado anti-IgG murino, na diluição de 1:20000 (Sigma-Aldrich, Alemanha). As placas foram lavadas 4 vezes, e em seguida adicionado o substrato o-phenilenediamina dihidroclorídrico (Sigma-Aldrich, Alemanha) e 0,03% de peróxido de hidrogênio. Após 10 minutos, a reação foi interrompida pela adição de ácido sulfúrico 2M. A leitura dos resultados foi feita em espectrofotômetro (492nm).

10

15

20

25

30

V. RESULTADOS

5.1. Determinação de hospedeiros e reservatórios naturais de VACV

5.1.1. Análise de roedores e espécimes clínicos

5

Objetivando analisar se espécies de roedores poderiam representar alguns dos hospedeiros de VACV, foram feitas quatro expedições de campo visando a captura desses animais. As expedições foram feitas em Paraguaçu (2008), Doresópolis (2009), Curvelo (2006) e em Acaiaca/Goiabeiras, dois distritos de Mariana (2005 e 10 2009). Amostras de fezes de roedores também foram coletadas nas propriedades rurais visitadas, com o objetivo de verificar a presença de VACV nas mesmas. Amostras de crosta, líquido vesicular e sangue também foram coletadas de humanos e bovinos afetados pela VB durante os surtos. Ao todo, foram capturados 19 roedores, todos peridomiciliares, pertencentes às espécies *Mus musculus*, 15 *Rattus rattus* ou *Rattus norvegicus*. Esses animais foram capturados em instalações próximas às sedes das propriedades, como currais, armazéns, granjas de porcos e galinheiros, e também nas adjacências, em locais como bordas de matas, plantações de milho, cana e feijão. Após a captura, foram coletadas amostras de sangue e órgãos dos roedores, que posteriormente foram analisados 20 no Laboratório de Vírus, UFMG.

Embora não tenham sido observadas lesões epidérmicas aparentes em nenhum dos roedores capturados, os ensaios de soroneutralização revelaram a presença de anticorpos neutralizantes anti-OPV nos soros de dois roedores, capturados 25 durante a expedição feita em Acaiaca em 2005 (TABELA 6). Os títulos dos soros positivos foram de 1:40 e 1:320, correspondentes a dois camundongos da espécie *Mus musculus* (MmA1 e MmA2 [TABELA 3]), capturados nas proximidades de uma lavoura de milho. As outras 17 amostras de soro de roedores não apresentaram nenhuma atividade neutralizante contra VACV-WR, a amostra viral utilizada nos 30 ensaios de soroneutralização. Entretanto, a análise dos soros humanos e bovinos coletados durante as expedições mostraram altos títulos de anticorpos neutralizantes, variando de 1:160 a 1:640 (TABELA 6), incluindo as amostras de

soro bovino coletadas em Curvelo, local onde não estava ocorrendo surto de VB na ocasião da expedição. A análise dos soros bovinos coletados em Acaiaca em 2009 revelou que bovinos expostos ao surto em 2005 (segundo os proprietários), ainda apresentavam títulos altos de anticorpos anti-OPV (1:180) (TABELA 6).

5

TABELA 6: Títulos de anticorpos neutralizantes anti-OPV em amostras de soro murino, bovino e humano, coletadas durante as expedições de campo.*

Localidade	Ano	Espécie	Título de anticorpos neutralizantes
Mariana / Acaiaca	2005	<i>Mus musculus</i>	1:320
Mariana / Acaiaca	2005	<i>Mus musculus</i>	1:40
Mariana / Acaiaca	2005	<i>Bos taurus</i>	1:320
Mariana / Acaiaca	2005	<i>Homo sapiens</i>	1:640
Mariana / Acaiaca	2009	<i>Bos taurus</i>	1:160
Mariana / Acaiaca	2009	<i>Bos taurus</i>	1:160
Paraguaçu	2008	<i>Bos taurus</i>	1:160
Paraguaçu	2008	<i>Homo sapiens</i>	1:320
Doresópolis	2009	<i>Homo sapiens</i>	1:160
Doresópolis	2009	<i>Bos taurus</i>	1:160
Doresópolis	2009	<i>Homo sapiens</i>	1:160
Doresópolis	2009	<i>Homo sapiens</i>	1:160
Curvelo	2009	<i>Bos taurus</i>	1:160
Curvelo	2009	<i>Bos taurus</i>	1:320
Curvelo	2009	<i>Bos taurus</i>	1:160
Curvelo	2009	<i>Bos taurus</i>	1:160

*As amostras de soro OPV-negativas não estão representadas na TABELA.

10

Após os ensaios de soroneutralização, foram feitas tentativas de isolamento viral, a partir dos órgãos coletados dos roedores capturados. Foram utilizados, em paralelo, três tipos celulares para o isolamento, BSC-40, CEF e Vero, com o mínimo de duas passagens cegas. As células de cultivo primário, CEF, mostraram maior sensibilidade, e os resultados apresentados na TABELA 7 correspondem às tentativas de isolamento feitas nesta célula.

15

20

Ao todo, foram testadas 118 amostras de órgãos, incluindo cérebro, fígado, rins, gônadas, intestino, peritônio, estômago, pulmões e traquéia. Os testes de isolamento revelaram efeito citopático típico de poxvírus nas células infectadas com as gônadas ou com o peritônio coletados do camundongo MmA1, um dos

animais positivos nos ensaios de soroneutralização. Estes efeitos correspondem à formação de placas de lise, apresentando bordas com células em proliferação e uma região central com células arredondadas ou mortas. O mesmo efeito foi observado nas células onde foram inoculadas amostras de crosta ou líquido vesicular, humanas e bovinas, coletadas durante os surtos de VACV. Entretanto, não foi possível detectar efeito similar nas células infectadas com outros órgãos de MmA1, nem quaisquer órgão de outro roedor, incluindo MmA2 (TABELA 7).

Amostras de fezes de roedores coletadas durante as expedições, assim como uma carcaça de camundongo coletada na cidade de Curvelo, foram submetidas à detecção de DNA viral pela PCR *semi-nested vgf*, e isolamento em células CEF, Vero ou BSC-40. Todavia não foi possível detectar VACV em nenhuma dessas amostras.

TABELA 7: Teste de isolamento viral a partir de órgãos de roedores capturados. Ensaios feitos em CEF. Resultados correspondentes à 2ª passagem cega.

Espécie	Identificação	Cérebro	Fígado	Rins	Gónadas	Intestino	Peritônio	Estômago	Pulmões	Traquéia
<i>Mus musculus</i>	MmA1	-	-	-	+	-	+	-	S	-
<i>Mus musculus</i>	MmA2	-	-	-	NF	NF	NF	NF	-	NF
<i>Mus musculus</i>	MmA3	-	-	-	NF	NF	NF	NF	-	NF
<i>Mus musculus</i>	MmA4	-	-	-	NF	NF	NF	NF	-	NF
<i>Rattus rattus</i>	RrA1	-	-	-	NF	NF	NF	NF	-	NF
<i>Rattus rattus</i>	RrA2	-	-	-	NF	NF	NF	NF	S	NF
<i>Mus musculus</i>	MmG1	-	S	-	NF	NF	NF	NF	-	NF
<i>Rattus rattus</i>	RrG1	S	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rattus rattus</i>	RrG2	-	-	-	NF	NF	NF	NF	-	NF
<i>Mus musculus</i>	MmG2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rattus sp.</i>	RG1	-	S	-	NF	NF	NF	NF	-	NF
<i>Rattus sp.</i>	RG2	-	-	-	NF	NF	NF	NF	-	NF
<i>Mus musculus</i>	MmG3	-	-	-	NF	NF	NF	NF	-	NF
<i>Rattus norvegicus</i>	RnC1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Mus musculus</i>	MmC1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Mus musculus</i>	MmC2	-	-	-	-	-	-	-	S	-
<i>Mus musculus</i>	MmC3	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Rattus norvegicus</i>	RnC2	-	-	-	S	-	-	-	-	-
<i>Mus musculus</i>	MmC4	-	-	-	-	-	-	-	-	-

NF: não feito; S: suspeito, mas não confirmado em passagens posteriores; +: positivo; -: negativo

A amostra viral isolada do peritônio de MmA1 foi denominada Mariana virus murino (MARV-M). Esta amostra foi multiplicada e purificada em colchão de sacarose para posteriores testes de caracterização biológica e molecular. Com o intuito de analisar se MARV-M era o mesmo agente etiológico das lesões exantemáticas observadas durante o surto em Mariana, também foram multiplicadas e purificadas uma amostra bovina (MARV-B) e uma amostra humana (MARV-H), oriundas de

lesões exantemáticas observadas durante o mesmo surto. MARV-M, MARV-H e MARV-B foram comparados por testes biológicos e moleculares. PCR dos órgãos dos camundongos capturados, de fezes coletadas nas propriedades visitadas e de líquido vesiculares e crostas bovinas e humanas confirmaram os resultados dos testes de isolamento viral.

5.1.1.2. Caracterização biológica e molecular dos isolados MARV

5.1.1.2.1. Ensaio de imunofluorescência e de infectividade viral

Com o intuito de confirmar se os isolados MARV-M, MARV-H e MARV-B poderiam ser classificados como membros do gênero OPV, foram feitos testes de imunofluorescência, utilizando anticorpo monoclonal anti-B5R. B5R é uma glicoproteína viral de superfície dos poxvírus, que fica ancorada em membranas celulares durante o ciclo de multiplicação do vírus. As células foram infectadas sob a M.O.I. de 3, incubadas por 24 horas, e então tratadas com os anticorpos primário anti-B5R e secundário, seguido pela incubação com DAPI, um marcador de ácido nucléico.

Os ensaios de imunofluorescência revelaram que células BSC-40, infectadas com MARV-M, MARV-B e MARV-H, apresentavam, 24 horas após a infecção, a marcação da proteína B5R pontualmente distribuída pela membrana plasmática e pelo complexo de Golgi (FIGURA 13), indicando a multiplicação de algum OPV. O mesmo resultado foi observado nas células infectadas pela amostra VACV-WR, utilizada como controle positivo. A coloração com DAPI, marcador de ácido nucléico, revelou a presença de fábricas virais nas células infectadas com os isolados MARV ou com VACV-WR. As fábricas virais são pequenos concentrados de DNA próximo ao núcleo, e correspondem ao sítio celular onde é feita a maior parte da montagem da progênie viral dos poxvírus. Não foram visualizadas fábricas virais nem a marcação de B5R nas células não infectadas (FIGURA 13).

30

Paralelamente aos testes de imunofluorescência, ensaios de infectividade viral foram feitos em células BSC-40. Os isolados MARV-M, MARV-H e MARV-B foram

comparados entre si e com VACV-WR, através de ensaios de curva de ciclo único e fenótipo de placas virais. Neste último teste, células BSC-40 foram infectadas com a M.O.I. de 0,01, e analisadas 48 horas após a infecção. As três amostras testadas, MARV-M, MARV-H e MARV-B apresentaram placas pequenas, com o diâmetro médio de 0,6 mm. Todavia, a monocamada infectada com VACV-WR apresentou placas maiores, com o diâmetro médio de 1,4 mm (FIGURA 14). Nenhuma placa viral foi observada na monocamada infectada com PBS.

O outro ensaio de infectividade viral *in vitro*, também feito em células BSC-40, revelou que os isolados MARV apresentam curvas de ciclo único muito similares entre si, e distintas estatisticamente de VACV-WR ($p < 0,04$, PRISM). Enquanto MARV-M, MARV-H e MARV-B apresentaram um crescimento final de aproximadamente 1 log, VACV-WR cresceu 1,5 log (FIGURA 14). Nenhuma placa foi observada na monocamada infectada com PBS (dados não mostrados).

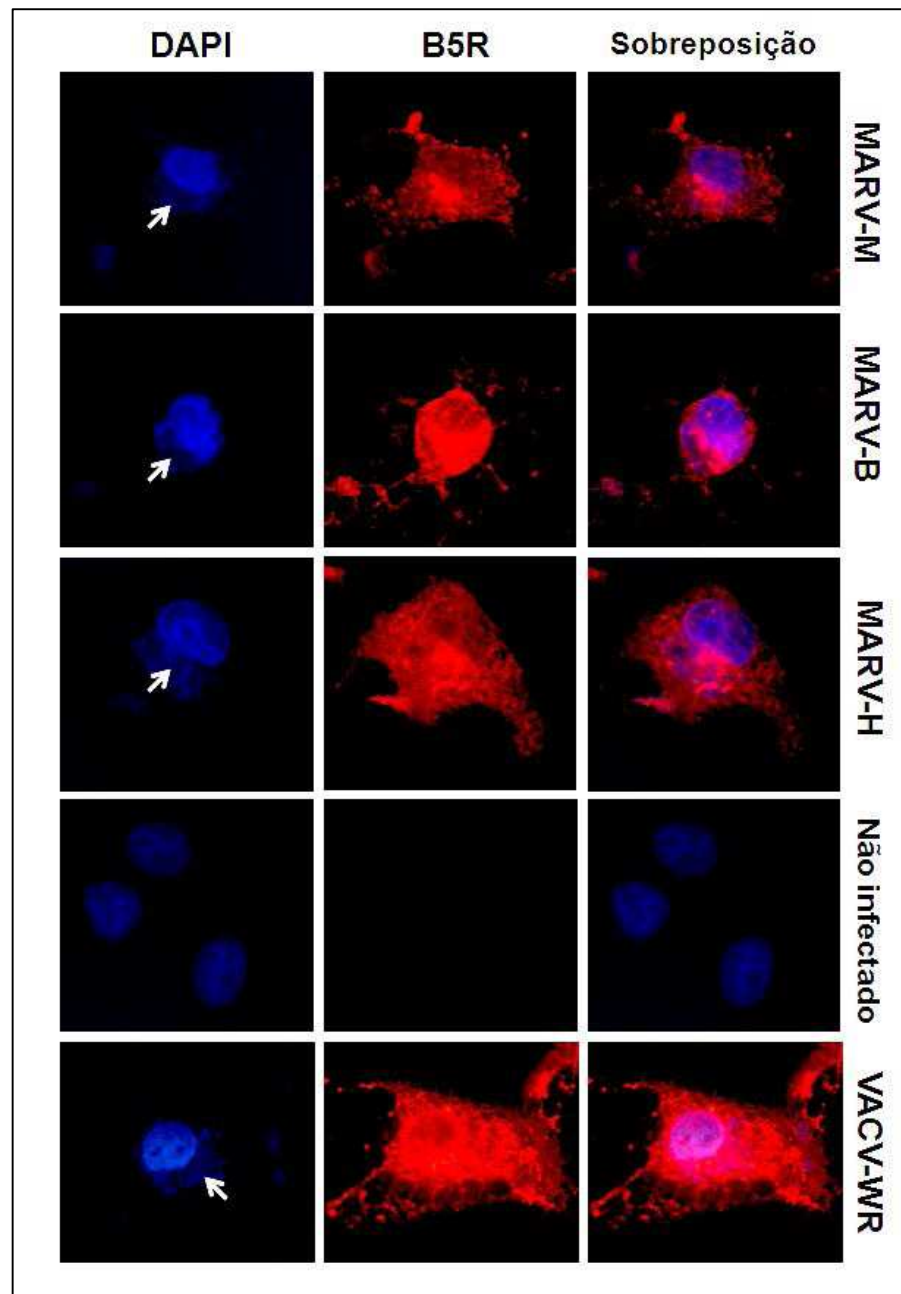


FIGURA 13: Ensaio de imunofluorescência de células BSC-40 infectadas com MARV-M, MARV-H, MARV-B ou VACV-WR. Células BSC-40 foram infectadas com MARV-M, MARV-H ou MARV-B, além de VACV-WR como controle positivo. 24 horas após a infecção, as células foram incubadas com um anticorpo primário anti-B5R, e posteriormente com um anticorpo secundário anti-mouse conjugado com rodamina. Para a marcação de ácidos nucleicos foi utilizado DAPI. As imagens foram obtidas no microscópio de fluorescência Olympus BX51. As setas indicam as fábricas virais. Em vermelho, a glicoproteína viral B5R de OPV.

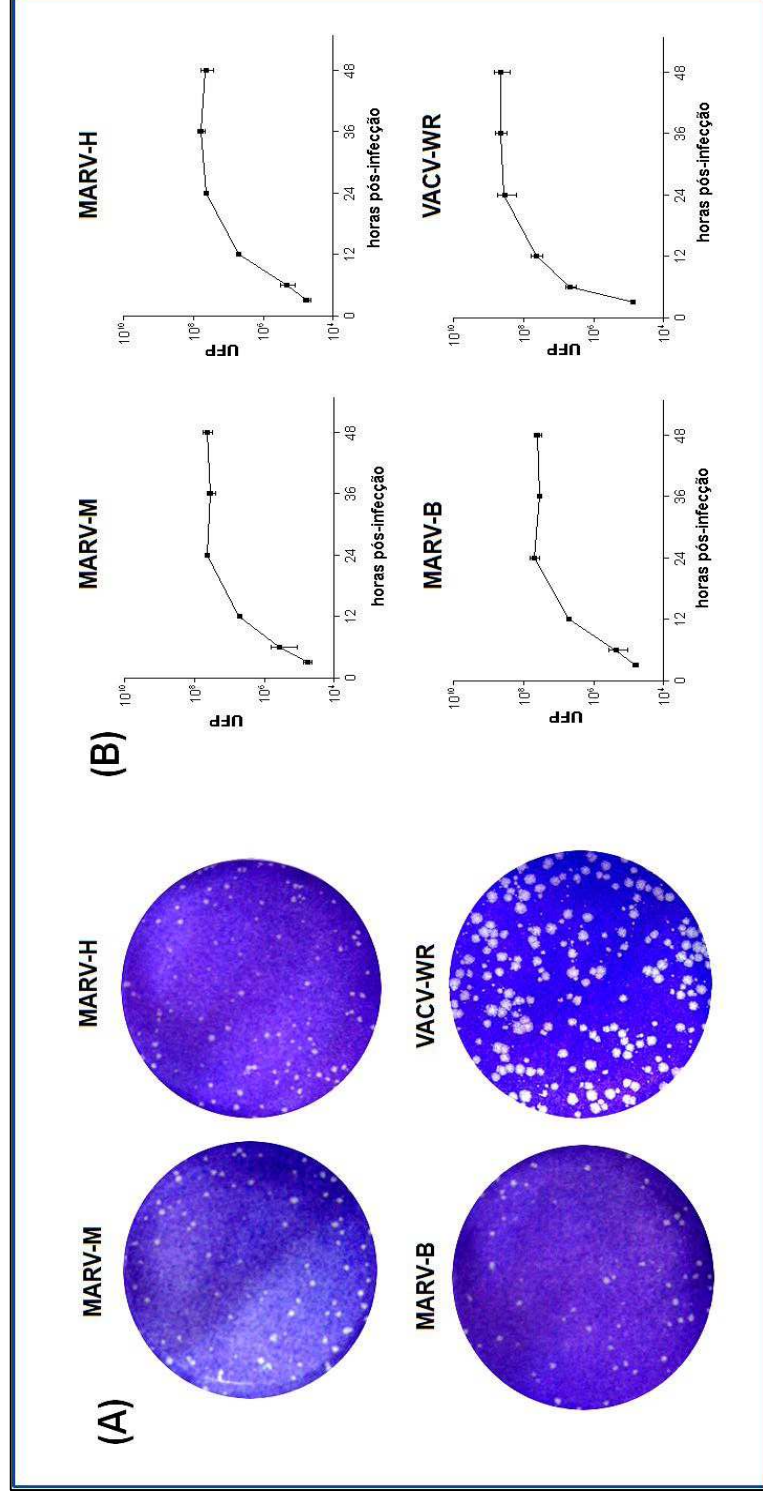


FIGURA 14: Ensaios de fenótipo de placa e curva de ciclo único de MARV-M, MARV-H, MARV-B e VACV-WR em células BSC-40. (A) Os ensaios de fenótipo de placa de MARV-M, MARV-H e MARV-B e VACV-WR, foram determinados feitos utilizando células BSC-40 infectadas com a M.O.I. de 0,01 e incubadas por 48 horas. Após este período, as monocamadas foram fixadas. A coloração com cristal violeta revelou que os isolados MARV apresentam placas de tamanho pequenas e similares entre si, mas diferentes de VACV-WR. (B) Os ensaios de curva de ciclo único foram feitos com células BSC-40 infectadas com a M.O.I. de 10, incubadas por até 48 horas. O título viral foi determinado em diferentes períodos da infecção, mostrando que os isolados MARV apresentaram um crescimento final de 1 log, enquanto VACV-WR cresceu 1,5 log.

5.1.1.2.2. Isolados MARV: inoculação em MCA e PCR para a detecção de genes específicos de OPV

Levando em conta os resultados apresentados no item anterior, a caracterização dos isolados MARV prosseguiu com a inoculação dessas amostras em membrana córioalantóide (MCA) de ovos de galinhas embrionados, para a observação de *pocks* virais. Um total de 10^4 partículas de MARV-M, MARV-H, MARV-B ou VACV-WR foi inoculado por ovo, que permaneceu em incubação por 72 horas após a inoculação. Após este período, os ovos foram mantidos por 24 horas a 4°C para causar a morte do embrião.

Os ovos inoculados com MARV-M, MARV-H ou MARV-B revelaram *pocks* grandes e esbranquiçados, típicos de VACV, disseminados por toda a superfície da MCA (FIGURA 15). Este resultado foi igualmente observado nos ovos inoculados com VACV-WR. Nenhum *pock* foi visualizado nas membranas inoculadas com PBS.

Avançando na caracterização dos isolados, MARV-M, MARV-B e MARV-H foram submetidas a ensaios de PCR, visando a identificação de genes virais específicos de OPV. Foram utilizados iniciadores para a amplificação dos genes *tk*, *vgf* e *ha*, e as reações foram feitas utilizando 10^2 UFP dos vírus purificados como amostra. Os amplificadores foram fracionados em gel de agarose 1%, sob a voltagem de 100V.

As PCRs dos genes *tk*, *vgf* e *ha* revelaram a amplificação de fragmentos de 528, 381 e 960 pb, respectivamente, a partir dos isolados MARV-M, MARV-B e MARV-H, assim como a partir do controle positivo, VACV-WR (FIGURA 15). Nenhuma amplificação foi observada nos controles negativos das três reações. As reações foram feitas em triplicata, e os amplificadores foram utilizados para reações de sequenciamento.

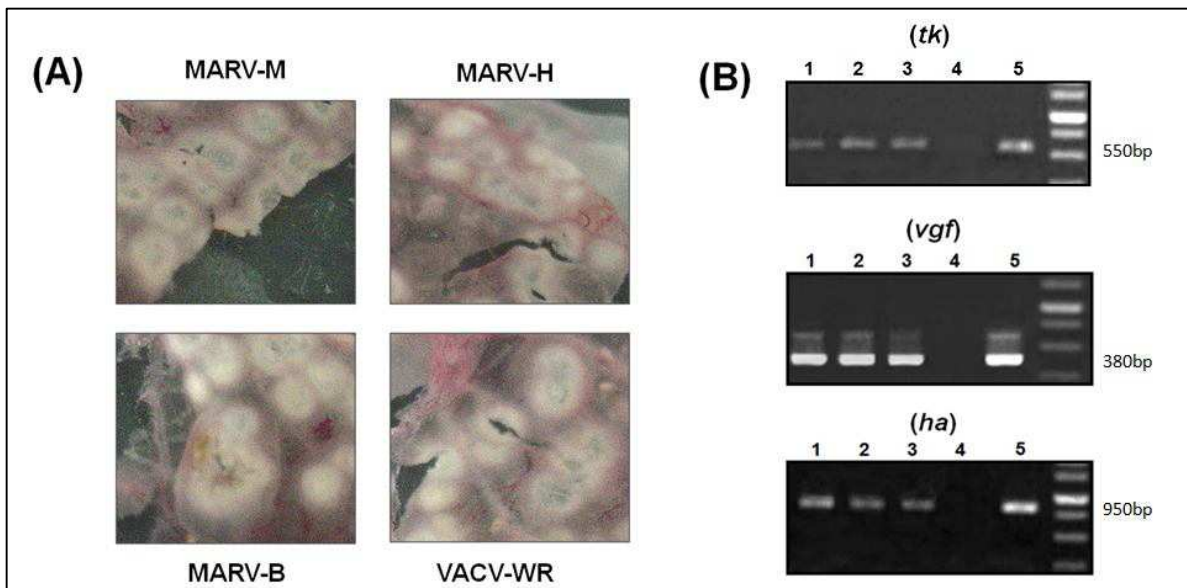


FIGURA 15: Isolados MARV: inoculação em MCA e PCR de genes específicos de OPV. (A) MCA de ovos de galinha embrionados foi inoculada com 10^4 UFP dos isolados MARV ou VACV-WR. Após 72 horas de incubação, foi possível observar que todas as amostras induziram a formação de *pocks* esbranquiçados, típicos de VACV. **(B)** Os isolados MARV foram submetidos a ensaios de PCRs, nas quais foram utilizados iniciadores específicos para os genes *tk*, *vgf* e *ha*, de OPV. Canaleta 1: MARV-M; Canaleta 2: MARV-H; Canaleta 3: MARV-B; Canaleta 4: água (controle negativo); Canaleta 5: VACV-WR (controle positivo). Os amplificados foram fracionados em gel de agarose 1%, sob a voltagem de 100V.

5.1.1.2.3. Sequenciamento, comparação e análises filogenéticas dos isolados MARV

Visando avaliar a semelhança genética entre os três isolados MARV, e a relação
5 desses isolados com outras amostras de OPV, os amplificadores obtidos a partir das
PCRs de *tk*, *vgf* e *ha* foram sequenciados de forma direta, sem clonagem
molecular. O método de sequenciamento direto foi selecionado para garantir que
as sequências nucleotídicas obtidas fossem mais fidedignas aos genes virais que
10 foram amplificadas, uma vez que a clonagem e a multiplicação plasmidial em
bactérias podem levar ao acúmulo de erros nas sequências clonadas. Cada gene
foi sequenciado 6 vezes, e um consenso foi feito utilizando a plataforma online
Asparagin-Cenargen (genoma.embrapa.br/phph/). Sequências consenso de alta
qualidade foram obtidas e analisadas utilizando o programa MEGA 4.0.

15 A análise das sequências dos genes *tk*, *vgf* e *ha*, obtidas a partir de MARV-M,
MARV-H e MARV-B, revelou alta identidade entre esses isolados e amostras de
VACV disponíveis no GenBank. As sequências de aminoácidos inferidas (MEGA
4.0) de *vgf* e *ha* (FIGURA 16) mostram um perfeito alinhamento entre os isolados
MARV, sem nenhuma inserção, deleção ou alteração de elementos. As sequências
20 nucleotídicas de *tk*, *vgf* e *ha* de MARV foram depositadas no GenBank e
receberam os números de acesso GQ226042, GQ226041 e GQ226040,
respectivamente.

O alinhamento das sequências de *ha* revela que os isolados MARV apresentam
25 uma deleção de 6 aminoácidos no final da região codificadora do gene, presente
também em diversas amostras de VACV isoladas durante surtos de VB no Brasil,
como ARAV, CTGV, Serro, GP2 e MURV; mas ausente nas amostras GP1, VBH,
BAV e SAV. Embora a amostra vacinal IOC apresente esta deleção em *ha*, outras
amostras de VACV utilizadas como vacinas no Brasil, como Malbran e LST-BTT,
30 não a possuem (FIGURA 16).

IIRSFADSON AIETTUPEIT NATTDIPAIR LCGPEGDGXC LBGDCIHARD IDGMCRCSH GYTGRODQV VLVVDYKRSN PNTTTSIPS PGIMLVIMSI IIT--CULUS VYKFRRTK-LPIQ [124]
 VACV-TO CA1 [124]
 VACV-TO CA2 [124]
 VACV-TO CA3 [124]
 VACV-TO CA4 [124]
 VACV-TO A21 [124]
 VACV-TO A22 [124]
 VACV-WR (AY243312) [124]
 VACV-MURV (DQ247772) [124]
 VACV-SP1V (DQ206440) [124]
 VACV-LST (DQ121394) [124]
 VACV-GR2V (DQ206441) [124]
 VACV-SAV (AY523995) [124]
 VACV-MARV-M [124]
 VACV-MARV-B [124]
 VACV-MARV-H [124]
 VACV-ARAV (AF503170) [124]
 VACV-PSIV (DQ08562) [124]
 HPXV (DQ792504) [124]
 CPXV-Germany (DQ437593) [124]
 CPXV-BP (AF462758) [124]
 MPXV-Zaire (AF3801380) [124]
 MPXV-Congo (AY743596) [124]
 VARV-Basikistan (DQ437589) [124]
 VARV-Somalia (DQ437590) [124]
 VACV-BAV (U79140) [124]
 ECMV (AF163845) [124]

LSGSTHSPET SSEKPEDIIN FMCSSVELIA TPEPITIMVE DEHTDVTYTS DSINTVSSASS BESTHDEPTE P1TK-EDHI VTDVVSVTYV STSSGIVTK LTTDDADIK-
 VACV-TO CA [240]
 VACV-TO AC [240]
 VACV-CTGV-MU07 (FJ545689) [240]
 VACV-GR1V (DQ206436) [240]
 VACV-VBR (DQ206435) [240]
 VACV-SPAN232 (DQ22922) [240]
 VACV-Beah8058 (DQ206442) [240]
 VACV-RIA (DQ810280) [240]
 VACV-MURV (DQ247770) [240]
 VACV-CTGV (AF229247) [240]
 VACV-LOR (DQ810281) [240]
 VACV-ARAV (AY523994) [240]
 VACV-MARV-M [240]
 VACV-MARV-H [240]
 VACV-MARV-B [240]
 VACV-SV2 (EF063677) [240]
 VACV-PSIV (DQ070848) [240]
 VACV-GR2V (DQ206437) [240]
 VACV-IOC (AF225248) [240]
 VACV-BE13906 (AF375077) [240]
 VACV-BE181 (AF375078) [240]
 VACV-Ankara (U944848) [240]
 VACV-WR (AY243312) [240]
 VACV-LST (AY675276) [240]
 VACV-Acambis 3 (AY313848) [240]
 VACV-MALBRAN (AV146624) [240]
 VACV-LST (EF175985) [240]
 VACV-DUKE (DQ439815) [240]
 RSPV (DQ79250) [240]
 Rabbipok (AF37511) [240]
 MPXV_mv3945 (AF375098) [240]
 MPXV_zaire (DQ011155) [240]
 MPXV_Congo (DQ011154) [240]
 MPXV_Sierra_Leone (AY741551) [240]
 CPXV-cowHAI2 (AY902253) [240]
 CPXV-Germany (DQ437593) [240]
 CPXV-90-1 (AF375087) [240]
 VARV (DQ437589) [240]

FIGURA 16: Alinhamento das sequências dos genes *vgf* (A) e *ha* (B). As sequências inferidas de aminoácidos obtidas no presente estudo foram alinhadas com sequências de outros OPV disponíveis no GenBank, utilizando o programa MEGA 4.0. Em destaque (vermelho, azul e vinho) as sequências obtidas e analisadas no presente trabalho, a partir de amostras coletadas em Mariana (MG) e Ipueiras/Lajeado (TO).

A análise do percentual de similaridade do gene *ha* (FIGURA 18) entre os OPV mostra que os isolados MARV apresentam 100% de identidade com amostras de VACV isoladas durante surtos de VB, como Cantagalo-Mu07, RIA, LOR, ARAV e Serro. A análise dos percentuais de similaridade dos genes *tk* e *vgf* (FIGURA 17) entre os OPV revela que ainda mais amostras de VACV possuem valores de identidade igual ou muito próximos de 100% quando comparadas aos MARV, uma vez que esses genes são mais conservados.

10

Baseado nas sequências nucleotídicas dos genes *vgf* e *ha*, duas árvores filogenéticas foram construídas, utilizando o programa MEGA 4.0 (FIGURA 19). As árvores foram construídas utilizando a metodologia da máxima parcimônia, com valores de significância baseados em 1000 replicatas.

15

A análise da árvore filogenética construída baseada no gene *ha* mostra que MARV se agrupa com diversas amostras de VACV. É possível observar que as amostras de VACV formam um grande ramo, segregado de VARV, CPXV e MPXV. Além disso, a árvore baseada em *ha* mostra uma clara separação das amostras brasileiras de VACV em dois grupos: um composto por MARV, ARAV, PSTV, CTGV, MURV, Serro, GP2V, entre outros; e outro grupo formado por VBH, GP1V, BAV e SAV. A amostra IOC, apesar de apresentar a deleção de 6 aminoácidos no gene *ha*, se agrupa com outras amostras vacinais, como Lister e Ankara (FIGURA 19). Pelo fato do gene *vgf* ser mais conservado, a visualização de tal separação das amostras de VACV não pode ser visto na árvore construída baseada nas sequências nucleotídicas deste gene. Todavia, assim como foi observado para *ha*, na árvore de *vgf* é possível ver que MARV se agrupa com diversas amostras de VACV.

25

5

timidina quinase (tk)																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1 VACV-GP2V																
2 VACV-MARV	100,00															
3 VACV-S2V	100,00	100,00														
4 VACV-GP1V	100,00	100,00	100,00													
5 CPXV	100,00	100,00	100,00	100,00												
6 VACV-WR	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00											
7 VACV-Cotia	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00										
8 VACV-BAV	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00									
9 VACV-PSTV	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00								
10 VACV-MURV	99,80	99,80	99,80	99,80	99,80	99,80	99,80	99,80	99,80							
11 VACV-LST	99,80	99,80	99,80	99,80	99,80	99,80	99,80	99,80	99,80	99,80						
12 ECMV	99,80	99,80	99,80	99,80	99,80	99,80	99,80	99,80	99,80	99,80	99,20					
13 HSPV	99,00	99,00	99,00	99,00	99,00	99,00	99,00	99,00	99,00	99,00	99,00	99,20				
14 MPXV	97,70	97,70	97,70	97,70	97,70	97,70	97,70	97,70	97,70	97,70	97,30	97,30				
15 VARV	97,80	97,80	97,80	97,80	97,80	97,80	97,80	97,80	97,80	97,80	97,10	97,10	96,70			
16 TATV	97,50	97,50	97,50	97,50	97,50	97,50	97,50	97,50	97,50	97,50	97,10	97,10	96,50	97,30		

fator de crescimento viral (vgf)																		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1 VACV-TO*																		
2 VACV-WR	99,40																	
3 VACV-MARV*	99,40	100,00																
4 VACV-MURV	99,40	100,00	100,00															
5 VACV-GP1V	99,40	100,00	100,00	100,00														
6 VACV-LST	99,40	99,40	99,40	99,40	99,40													
7 VACV-GP2V	100,00	99,40	99,40	99,40	99,40	99,40												
8 VACV-BAV	98,90	99,40	99,40	99,40	99,40	98,90	98,90											
9 VACV-BAV	98,30	98,90	98,90	98,90	98,90	98,30	98,30	98,60										
10 VACV-BAV	99,40	99,40	99,40	99,40	99,40	99,40	99,40	99,40	98,60									
11 VACV-PSTV	100,00	99,40	99,40	99,40	99,40	100,00	98,90	98,30	99,40									
12 HSPV	99,70	99,70	99,70	99,70	99,70	99,70	99,70	99,70	99,70	99,70								
13 CPXV-Germany	94,10	94,70	94,70	94,70	94,70	94,10	94,10	94,40	94,10	94,40	94,10	94,40	94,40					
14 CPXV-BR	95,80	96,40	96,40	96,40	96,40	95,80	95,80	96,10	95,80	96,10	95,80	96,00	96,00					
15 MPXV-Zaire	96,40	96,90	96,90	96,90	96,90	96,40	96,40	96,60	96,40	96,60	96,40	96,60	96,60	95,50	97,20			
16 MPXV-Congo	96,10	96,60	96,60	96,60	96,60	96,10	96,10	96,40	96,10	96,40	96,10	96,40	96,40	95,20	96,90	99,70		
17 VARV-Pakistan	94,10	94,10	94,10	94,10	94,10	94,10	94,10	93,80	93,60	94,40	94,10	94,40	90,80	92,40	92,70	92,40		
18 VARV-Somalia	94,10	94,10	94,10	94,10	94,10	94,10	94,10	93,60	93,60	94,40	94,10	94,40	90,80	92,40	92,70	92,40	100,00	

FIGURA 17: Percentual de identidade entre OPV, baseado nas seqüências nucleotídicas dos genes *tk* e *vgf*. As seqüências nucleotídicas obtidas no presente estudo foram comparadas com as seqüências de outros OPV disponíveis no GenBank, utilizando o programa MEGA 4.0. Em destaque (vermelho e azul) as seqüências obtidas e analisadas no presente trabalho, a partir de amostras coletadas em Mariana (MG) e Ipueiras/Lajeado (TO).

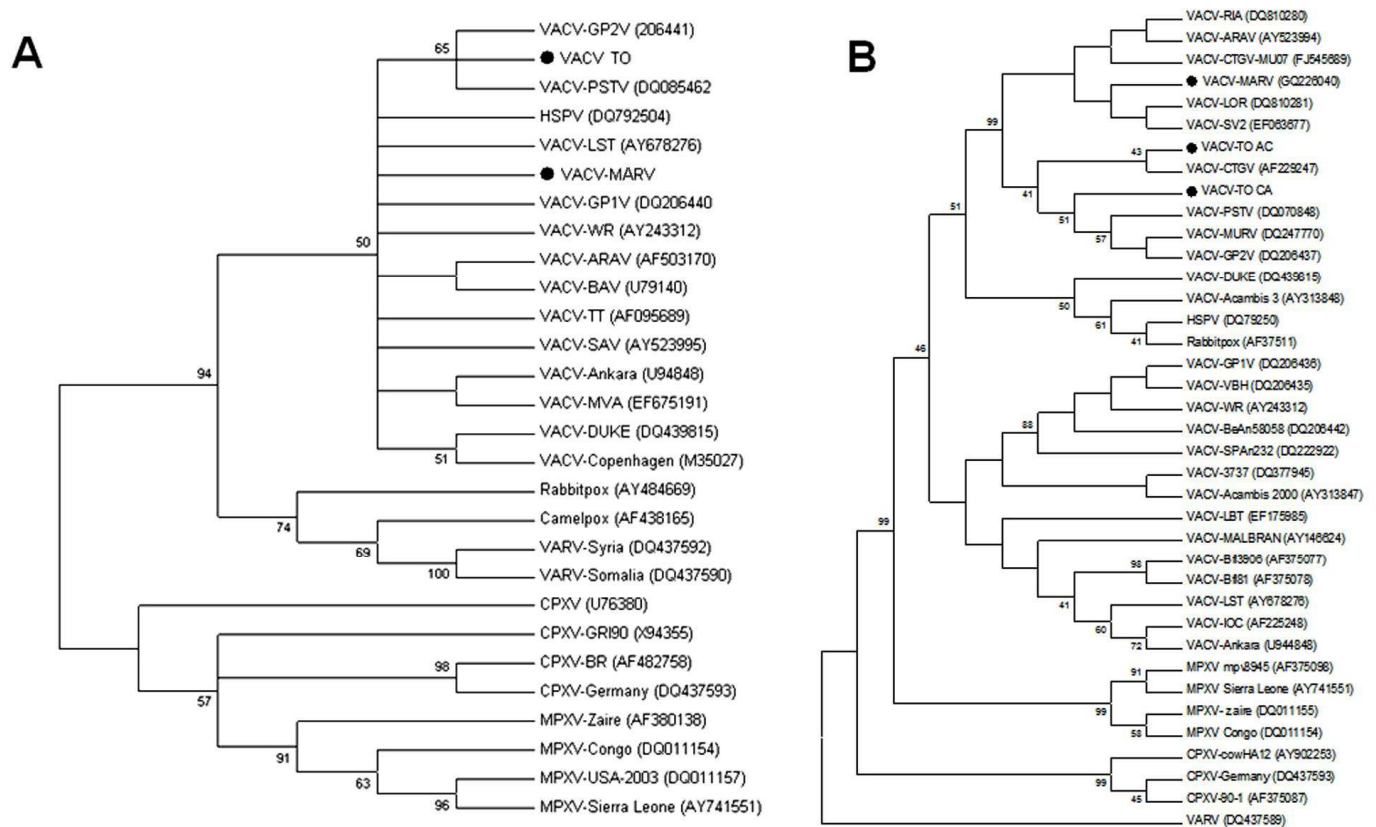


FIGURA 19: Árvores filogenéticas baseadas nas seqüências nucleotídicas dos genes *vgf* (A) e *ha* (B). As seqüências nucleotídicas obtidas no presente estudo foram alinhadas com as seqüências de outros OPV disponíveis no GenBank, e utilizadas para a construção das árvores filogenéticas, Neighbor-joining, com valor de bootstrap de 1000 replicatas (MEGA 4.0). Em destaque (pontos pretos) as amostras de VACV analisadas no presente trabalho, obtidas em Mariana (MG) e Ipueiras/Lajeado (TO).

5.1.1.3. Testes de virulência e eliminação de MARV em camundongos Balb/c

Objetivando analisar a virulência de MARV-M, MARV-H e MARV-B, grupos de 4 camundongos Balb/c foram inoculados pela via intranasal com 10^6 PFU/10 μ L das amostras virais mencionadas. Após a inoculação, os animais foram pesados diariamente, amostras de fezes foram coletadas, e os sinais clínicos, quando presentes, registrados. As amostras GP2V e BAV foram utilizadas para estudos comparativos de virulência. Os camundongos de todos os grupos foram mantidos no biotério do Departamento de Microbiologia da UFMG, em gaiolas com microisoladores, e fluxo de ar individualizado.

O grupo controle, no qual PBS foi inoculado, não apresentou qualquer sinal, e os animais ganharam peso gradualmente até o 15^od.p.i. (FIGURA 20). O grupo de animais inoculados com a amostra BAV apresentou mortalidade de 25%, uma vez que um dos animais infectados chegou ao óbito no 9^od.p.i. (FIGURA 20). Todos os camundongos do grupo apresentaram arqueamento de dorso e pilo-ereção, do 2^o-3^o ao 10^od.p.i., ou até a data do óbito. Dois animais apresentaram alopecia periocular, do 5^o ao 9^o d.p.i., sendo que um desses corresponde ao animal que chegou ao óbito em decorrência da infecção. Os camundongos infectados com BAV apresentaram perda de peso até o 9^od.p.i., com decréscimo médio de 34% nesta ocasião (FIGURA 20). Os três animais sobreviventes recuperaram peso a partir do 10^o-11^od.p.i. (FIGURA 20).

Os camundongos infectados intra-nalmente com amostra GP2V ou pelos isolados MARV não apresentaram quaisquer sinais clínicos, sendo observado um ganho médio de 15,5% no peso desses animais, ao final dos 15 dias analisados (FIGURA 20).

No 15^od.p.i., o soro dos camundongos foi coletado para confirmar o sucesso do procedimento de inoculação viral, através da detecção de anticorpos neutralizantes, pela técnica da soroneutralização. A coleta não pôde ser feita no animal que chegou ao óbito em decorrência da infecção, devido à coagulação *post-*

mortem. Todos os camundongos inoculados com as amostras virais, e que tiveram seus soros coletados, apresentaram anticorpos neutralizantes contra VACV, variando entre 40 a 640 unidades neutralizantes por mL. Os animais do grupo controle foram negativos nos testes de soroneutralização. A FIGURA 21 apresenta

5 os títulos de anticorpos obtidos nos ensaios mencionados.

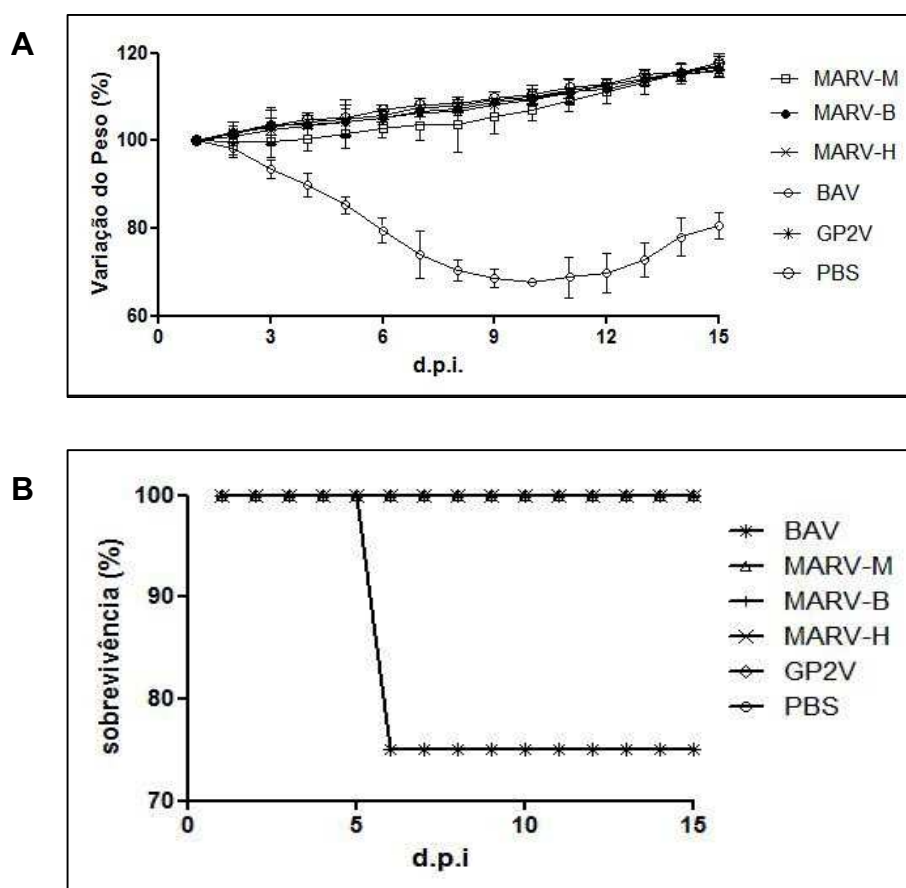


FIGURA 20: Variação percentual média diária do peso (A) e curva de sobrevivência (B) de camundongos Balb/c infectados pela via intra-nasal. Grupos de 4 camundongos Balb/c foram inoculados pela via intra-nasal com 10^6 PFU/10 μ L das amostras MARV-M, MARV-B, MARV-H, GP2V ou BAV. O peso dos animais foi monitorado por 15 dias. O grupo controle foi inoculado com PBS.

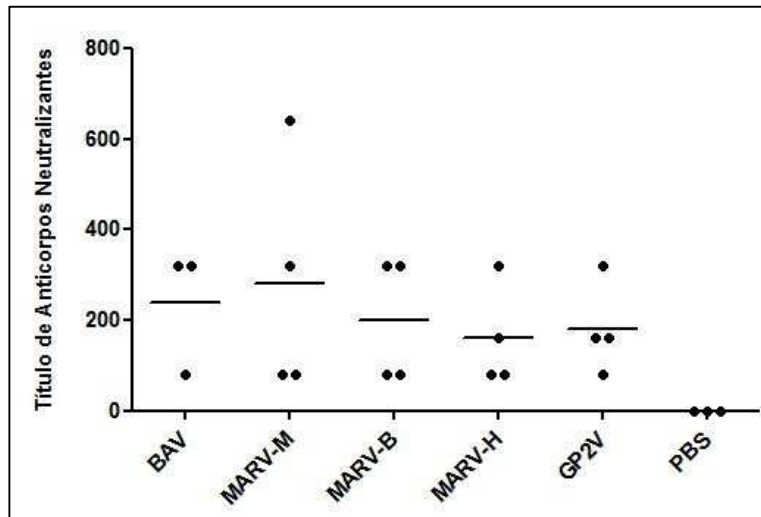


FIGURA 21: Títulos de anticorpos neutralizantes anti-VACV no soro de camundongos Balb/c infectados pela via intra-nasal com MARV-M, MARV-B, MARV-H, GP2V ou BAV (15ºd.p.i.). Grupos de 4 camundongos Balb/c foram inoculados pela via intra-nasal com 10^6 PFU/10µL das amostras MARV-M, MARV-B, MARV-H, GP2V ou BAV. Amostras de sangue foram coletadas no 15º d.p.i.. O grupo controle foi inoculado com PBS.

Amostras de fezes foram coletadas diretamente do ânus dos camundongos infectados por MARV-M, MARV-H ou MARV-B no 1º, 5º, 10º e 15º d.p.i., e então processadas e submetidas às PCR *semi-nested vgf* e a testes de titulação em células BSC-40. Para esta análise foram feitos *pools* de fezes de cada grupo, em todos os dias de coleta mencionados. Não foram isolados ou detectados DNA ou partículas virais nas fezes coletadas do grupo inoculado com PBS.

Todavia, DNA de VACV foi detectado nas fezes dos animais infectados com MARV-M, MARV-H ou MARV-B, nos quatro dias analisados (FIGURA 22). Em todos os casos, a PCR das fezes produziu um fragmento de aproximadamente 380 pb, assim como o controle positivo da reação (VACV-WR). Nenhuma amplificação específica foi visualizada no controle negativo da reação (FIGURA 22).

Entretanto, nos ensaios de titulação, só foi possível detectar VACV a partir do 5ºd.p.i., em amostras de fezes de camundongos infectados com MARV-M, MARV-

H ou MARV-B (FIGURA 22). As médias dos títulos virais foram muito semelhantes no 5º, 10º e 15º, variando entre 400 e 650 UFP por grama de fezes.

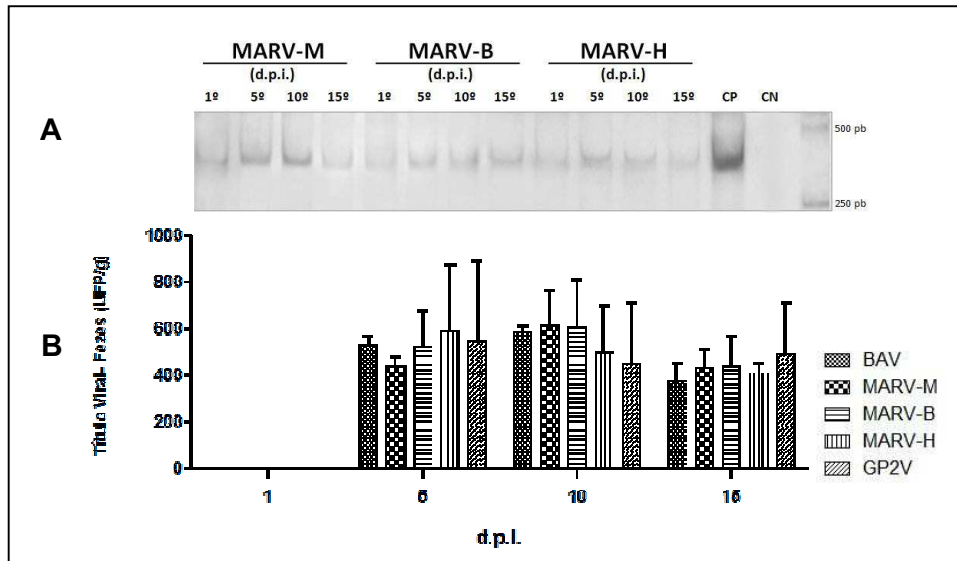


FIGURA 22: Detecção de VACV em fezes de camundongos infectados com MARV-M, MARV-H, MARV-B, GP2V ou BAV por PCR (A) ou titulação (B). Grupos de 4 camundongos Balb/c foram inoculados pela via intra-nasal com 10^6 PFU/10 μ L das amostras MARV-M, MARV-B, MARV-H, GP2V ou BAV. Amostras de fezes foram coletadas no 1º, 5º, 10º e 15º d.p.i., e então submetidas a PCR *semi-nested vgf* e titulação viral em células BSC-40. O grupo controle foi inoculado com PBS. Em (A) foi mostrado apenas os resultados das PCR feitas com fezes coletadas dos grupos infectados com os isolados MARV, uma vez que a detecção de DNA de GP2V e BAV em fezes de camundongos infectados já foi descrita (ABRAHÃO, 2008).

Em paralelo, grupos de 3 camundongos Balb/c machos, com 4 semanas, foram inoculados pela via intranasal com as mesmas amostras virais, conforme previamente descrito. No 5ºd.p.i., os animais foram sacrificados, e amostras de intestino foram coletadas. Estes órgãos foram titulados em BSC-40. Os resultados obtidos pelos ensaios de titulação sugerem que todas as amostras de VACV testadas multiplicam no intestino dos camundongos (FIGURA 23). A média dos títulos virais obtida a partir dos intestinos de camundongos infectados com BAV foi de 4×10^6 UFP/g. Os animais infectados com as amostras MARV-M, MARV-H, MARV-B e GP2V apresentaram títulos virais no intestino muito similares, variando

entre 4×10^5 e 8×10^5 UFP/g. Nenhuma partícula viral foi detectada nos intestinos dos animais inoculados com PBS.

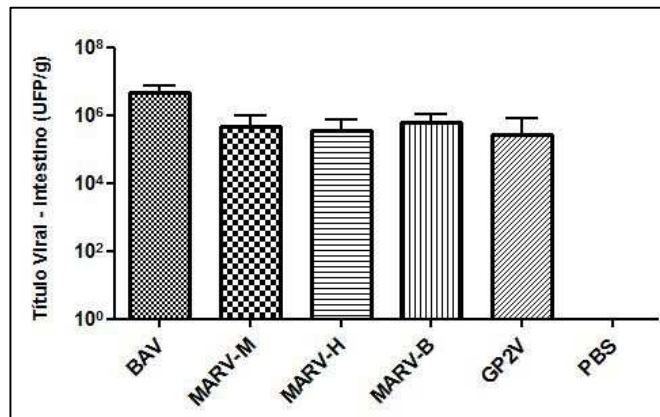


FIGURA 23: Títulos virais nos intestinos de camundongos infectados com MARV-M, MARV-H, MARV-B, BAV e GP2V. Grupos de 3 camundongos Balb/c foram inoculados pela via intra-nasal com 10^6 PFU/10 μ L das amostras MARV-M, MARV-B, MARV-H, GP2V ou BAV. Os intestinos desses animais foram coletados no 5^o d.p.i. para ensaios de titulação em células BSC-40. O grupo controle foi inoculado com PBS.

5.1.2. Análise de coleções de soro de espécies de vertebrados silvestres ou mantidos em cativeiro

5.1.2.1. Caracterização sorológica

Com o intuito de determinar se outras espécies de vertebrados poderiam representar hospedeiros ou reservatórios de VACV, coleções de soro de animais silvestres ou mantidos em cativeiro foram submetidas a testes sorológicos e moleculares, a fim de analisar a presença de anticorpos anti-OPV e DNA de viral. Como controles positivos foram utilizados soros de humanos acometidos por infecções de VACV; e como controles negativos foram utilizados soros de bovinos OPV-negativos (SILVA-FERNANDES *et al.*, 2009).

Amostras de soro de mamíferos silvestres, coletadas em uma região de floresta Amazônica em Ipueiras e Lajeado (TO), em 2001 e 2002, foram analisadas pela

técnica de soroneutralização. Ao todo foram avaliadas 344 amostras de soro, sendo 269 provenientes de macaco-prego (*C. apela*), 27 de macaco guariba (*A. caraya*), 12 de quati (*N. nasua*), 20 de cotia (*Dasyprocta sp.*), 2 de gambá (*D. albiventris*), 2 de tatu (*E. sexcinctus*), 5 de tamanduá (*T. tetradactyla*) e 4 de raposa-cinza (*C. thous*).

Os testes de soroneutralização revelaram uma alta prevalência de macacos OPV-soropositivos. Das 269 amostras de macaco-prego, 68 (25,3%) apresentaram anticorpos anti-OPV, enquanto 13 das 27 amostras de macaco guariba (48,1%) foram sorologicamente positivos. Soropositividade também foi verificada em 2 quatis (16,6%) e uma cotia (5%) (TABELA 8). Anticorpos anti-OPV não foram detectados nas outras espécies analisadas.

Em geral, os soros de animais amazônicos mostraram altos títulos de anticorpos neutralizantes (FIGURA 24). Ao todo, 55,95% das amostras positivas (47 soros) apresentaram título entre 1:80 e 1:320. Apenas 5,95% (5 soros) apresentaram títulos menores que 1:40 (FIGURA 24).

Testes de soroneutralização, feitos utilizando amostras provenientes de animais mantidos em cativeiro na Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte, revelaram que nenhum dos soros testados apresentava atividade neutralizante contra OPV. Essas amostras foram também submetidas à PCR *semi-nested vgf*, e nenhum dos 37 soros apresentou amplificação do gene *vgf* (~381pb).

5.1.2.2. Caracterização molecular das amostras do Tocantins

Baseado em estudos prévios que demonstraram a detecção de DNA de OPV em diferentes hospedeiros infectados (SAVONA *et al.*, 2006; VORA *et al.*, 2008), todas as 344 amostras de soro de animais silvestres do Tocantins foram submetidas à PCR *semi-nested vgf*, para a detecção de OPV. Amostras de soro humano VACV DNA-positivas e negativas, coletadas durante surtos de vaccínia bovina (SILVA-FERNANDES *et al.*, 2009), foram utilizados como controles das reações. Todas as amostras laboratoriais e de campo foram manipuladas separadamente para evitar contaminação.

Um total de 18 amostras de soro de animais silvestres apresentaram a amplificação de um fragmento de aproximadamente 381 pb: 11 de macaco-prego e 7 de macaco guariba, todas também positivas nos ensaios de soroneutralização. Destas 18 amostras de soro positivas na PCR *vgf*, seis foram sequenciadas e analisadas filogeneticamente, sendo quatro de macaco-prego e duas de macaco guariba. Adicionalmente, utilizando os iniciadores descritos por ROPP e colaboradores (1995), o gene *ha* também foi amplificado de duas amostras de soro, uma de cada espécie de macaco. Os produtos das PCRs de *vgf* e *ha* foram clonados no vetor pGEM-T-easy e então sequenciados.

As análises das sequências obtidas do gene *vgf* (ClustalW, MEGA 4.0) mostraram um perfeito alinhamento de nucleotídeos e aminoácidos entre todas as amostras obtidas a partir dos soros de macaco-prego ou macaco guariba, apresentando 100% de identidade entre elas. Quando comparadas com sequências nucleotídicas disponíveis no GenBank, as sequências obtidas de macacos silvestres apresentaram alta identidade com diversas amostras de VACV, variando entre 98,3 e 100% (FIGURA 17).

As sequências de *ha*, obtidas a partir dos soros de macaco-prego ou macaco guariba, apresentam uma deleção de 6 aminoácidos, também presente em várias amostras brasileiras de VACV (FIGURA 16). As sequências de *ha* obtidas a partir desses animais silvestres apresentaram, entre si, 99,6% e 99,7% de similaridade considerando o alinhamento de nucleotídeos e aminoácidos, respectivamente

(foram analisados 736 pb do gene *ha*). Como apresentaram diferenças genéticas (SETA, FIGURA 16), os amplificados de VACV obtidos a partir de macaco-prego e de macaco guariba foram denominados VACV-TO CA e VACV-TO AC, respectivamente.

Árvores filogenéticas foram construídas baseadas nos genes *vgf* ou *ha*, utilizando o método da máxima parcimônia, com valor de 1000 replicatas de bootstrap (MEGA 4.0.). As árvores feitas para os genes *vgf* ou *ha*, mostram que VACV-TO CA e VACV-TO AC se agrupam com várias amostras de VACV, isoladas durante surtos de VACV, como CTGV, PSTV, GP2, ARAV, Serro, entre outras (FIGURA 19). Os amplificados de VACV do Tocantins apresentaram também alta identidade com a amostra MARV (99,7% com VACV-TO CA e 99,9% com VACV-TO AC), considerando as sequências nucleotídicas do gene *ha* (FIGURA 18). As sequências de *vgf* e *ha* obtidas a partir do soro de macacos amazônicos foram depositadas no GenBank, e receberam os seguintes números de acesso: VACV-TO CA *vgf*: GQ465372; VACV-TO AC *vgf*: GQ465373; VACV-TO CA *ha*: GU322359; VACV-TO AC *ha*: GU322360.

VI. DISCUSSÃO

A circulação e manutenção de partículas infecciosas na natureza representam alguns dos desafios impostos às progênes virais. Estratégias de eliminação, resistência ambiental e disseminação foram selecionadas e modeladas ao longo da evolução e são fundamentais na logística infectiva (MAIBORODA, 1982). A complexidade do genoma dos VACV permite a codificação de inúmeros fatores de virulência e imunomodulação, além de proteínas essenciais para a multiplicação viral (HUGHES & FRIEDMAN, 2005), subsidiando a infecção de uma diversidade de sistemas celulares (McFADDEN, 2005). A variedade de tecidos e órgãos permissivos e susceptíveis à multiplicação viral (McFADDEN, 2005), permite a existência de diversas vias de infecção para os VACV (*revisado por* FENNER *et al.*, 1989), e ao mesmo tempo dificulta a proposição de um modelo de transmissão destes vírus na natureza.

Relatos existentes de transmissão de VACV na natureza se restringem à via da epiderme e mucosas, associados aos surtos de vaccinia bovina (VB) (TRINDADE *et al.*, 2006) e *Buffalopox virus* (SINGH *et al.*, 2007), além dos casos de *eczema vaccinatum* (CDC, 2007b). A utilização do VACV como amostra vacinal no Programa Internacional de Erradicação da Variola Humana da OMS (ESPOSITO & FENNER, 2001), historicamente direcionou os estudos envolvendo esse vírus para o manejo e estratégias de imunização (*revisado por* METZGER & MORDMUELLER, 2007), negligenciando a origem e os possíveis hospedeiros naturais dos VACV. No entanto, a VB se consolidou como zoonose emergente brasileira nos últimos anos (GUEDES, *et al.*, 2006) e a elucidação de aspectos biológicos dos VACV circulantes no país, como seus hospedeiros naturais e mecanismos de circulação, alicerça a busca por métodos de controle e prevenção da doença.

Desta forma, o presente estudo introduz um novo elemento na complexa e ainda pouco compreendida cadeia de transmissão do VACV no Brasil: o roedor peridomiciliar. A busca por roedores infectados por VACV em áreas afetadas pela VB foi baseada em uma estratégia racional, uma vez que (I) roedores têm sido descritos como reservatórios de CPXV na Europa, promovendo a transmissão viral para humanos, felinos e animais de zoológico (HAENSSLE *et al.*, 2006); (II) ratos e

camundongos são frequentemente avistados em propriedades afetadas pela VB, e estão em constante contato com a vida silvestre, humanos e animais de criação (SILVA-FERNANDES, 2008; MADUREIRA, 2009); e (III) estudos laboratoriais demonstraram que roedores peridomiciliares podem eliminar e transmitir OPV pelo contato direto com excretas contaminadas (MAIBORODA, 1982; FERREIRA *et al.*, 2008). Embora algumas amostras de VACV tenham sido consistentemente isoladas e re-isoladas em florestas brasileiras utilizando camundongos sentinelas (LOPES *et al.*, 1965; da FONSECA *et al.*, 1998; FONSECA *et al.*, 2002), o presente trabalho foi o primeiro a descrever o isolamento de uma amostra de VACV a partir de um camundongo da espécie *Mus musculus*, capturado no contexto de um surto de VB. Análises filogenéticas prévias, utilizando sequências de genes conservados e variáveis de OPV, demonstraram que algumas amostras de VACV isoladas a partir de roedores silvestres se agrupam com VACV isolados de bovinos durante surtos exantemáticos ocorridos em áreas rurais brasileiras (TRINDADE *et al.*, 2008; DRUMOND *et al.*, 2008). Todavia, o presente trabalho é o primeiro a estabelecer uma conexão entre amostras de VACV isoladas de um ser humano, de um bovino e de um roedor, temporalmente e espacialmente relacionados (TABELA 7).

A detecção de MARV em um camundongo peridomiciliar assintomático (TABELA 7; FIGURA 13) sugere que amostras de VACV podem circular na natureza sem necessariamente causar infecções agudas, de maneira similar a estudos laboratoriais feitos em modelo animal (FERREIRA *et al.*, 2008; ABRAHÃO, 2008). A infecção experimental de camundongos Balb/c (*Mus musculus*) com os isolados MARV não causou nenhum tipo de sinal clínico (FIGURA 20), e os animais infectados eliminaram partículas de VACV viáveis nas fezes por um longo período (FIGURA 22), provavelmente em decorrência da multiplicação viral no intestino dos animais (FIGURA 23). Um hospedeiro assintomático pode ser de grande importância epidemiológica, uma vez que circula ativamente entre sua população, eliminando partículas, e auxiliando na manutenção e circulação viral na natureza (MAIBORODA, 1982). Estudos de patogênese feitos utilizando CPXV demonstraram que vísceras são alvos de intensa multiplicação viral (GOFF *et al.*, 2008), o que poderia explicar a detecção de MARV no peritônio e gônadas de *MmA1* (TABELA 7).

Investigações epidemiológicas e filogenéticas envolvendo espécies do gênero OPV vêm utilizando como principal marcador molecular sequências nucleotídicas e de aminoácidos do gene da hemaglutinina viral (*ha*), visando a identificação de espécies virais e para estimar o parentesco evolutivo entre elas (TRINDADE *et al.*, 2008; DRUMOND *et al.*, 2008). Recentemente, notificações de transmissão de CPXV entre roedores e elefantes, e roedores e humanos foram descritas, baseadas na perfeita similaridade das sequências de aminoácidos de *ha* entre amostras de CPXV, isoladas a partir de diferentes hospedeiros (KURTH *et al.*, 2008; NIVOVE *et al.*, 2009). Assim, baseado neste modelo, o presente estudo analisou o gene *ha* e os genes conservados *vgf* e *tk* (FIGURAS 17-19), em paralelo com ensaios biológicos (FIGURAS 13-16), visando caracterizar e comparar os isolados VACV-MARV, obtidos de diferentes hospedeiros. As análises dos genes *tk*, *vgf* e *ha* mostraram que os isolados MARV apresentam perfeita similaridade não só em suas respectivas sequências de aminoácidos, mas também em suas sequências de nucleotídeos (FIGURAS 17-19). A similaridade genética observada entre esses isolados foi corroborada por resultados obtidos em ensaios de curva de ciclo único (FIGURA 14), fenótipo de placa de lise viral (FIGURA 14), imunofluorescência (FIGURA 13) e infecção de MCA (FIGURA 15), indicando que os três isolados são na verdade uma única amostra de VACV, que circulou entre diferentes hospedeiros durante o surto de VB na cidade de Mariana, em 2005.

Como mencionado anteriormente, alguns surtos de VB ocorrem temporalmente e espacialmente distantes de áreas previamente afetadas, e nesses casos em específico, a vida silvestre poderia representar a fonte original de manutenção e circulação viral. A circulação de amostras de VACV entre animais silvestres foi descrita durante as décadas de 60 e 70 do século passado (LOPES *et al.*, 1965; da FONSECA *et al.*, 1998; FONSECA *et al.*, 2002), e pelo inquérito sorológico apresentado no presente trabalho, na qual foi observada uma alta soropositividade anti-OPV em mamíferos amazônicos brasileiros. Neste contexto, amostras de VACV poderiam ser introduzidas nas áreas rurais brasileiras, quando seus hospedeiros silvestres deixam seus habitats naturais e se aventuram em busca de alimentos, sobretudo em lavouras, ou migram errantes em decorrência do processo de desflorestamento de seu habitat original (SOARES-FILHO *et al.*, 2006). Todavia, a presença de animais silvestres é usualmente restrita às bordas das propriedades

rurais, sendo estes raramente avistados em locais como currais, pastos e sedes das fazendas (MADUREIRA, 2009). Desta forma, como explicar a transmissão de VACV entre animais silvestres e populações humanas/bovinas? Uma possível explicação: se amostras de VACV estão circulando primariamente entre animais silvestres, o isolamento da amostra MARV a partir de um camundongo do gênero *Mus* indica que roedores peridomiciliares poderiam representar uma possível conexão entre a vida silvestre e as propriedades afetadas pela VB, uma vez que esses animais circulam ativamente pelas fazendas e suas adjacências, compartilhando ambientes com seres humanos, bovinos e animais silvestres. Embora não existam dados sobre a circulação de VACV em ambiente silvestre na região de Mariana/MG, é provável que ela ocorra, considerando o amplo espectro de hospedeiros do VACV (McFADDEN, 2005) e as evidências de circulação viral em outras regiões de floresta no Brasil (LOPES *et al.*, 1965; FONSECA *et al.*, 1998).

No Brasil, o avanço das fronteiras agrícolas está intimamente associado com a degradação de biomas naturais e florestas secundárias, causando perdas para biodiversidade e ocasionando o deslocamento de nichos ecológicos pré-estabelecidos (SOARES-FILHO *et al.*, 2006). O bioma amazônico é um dos que mais sofre com os processos de queimadas e desflorestamento, em decorrência de atividades agropecuárias e extrativistas (SOARES-FILHO *et al.*, 2006). Além disso, extensas áreas são eventualmente alagadas para a construção de usinas hidroelétricas, impactando a vida silvestre local. Neste contexto, foram capturados os mamíferos amazônicos analisados no presente estudo. Os resultados dos ensaios de neutralização demonstraram soropositividade anti-OPV de aproximadamente 27%, quando considerados os primatas pertencentes às espécies *C. apela* e *A. caraya* (TABELA 8; FIGURA 24). Este percentual relativamente alto pode ser explicado pelo fato de que os primatas dessas duas espécies apresentam o comportamento de bandos, caminhando pela floresta e compartilhando alimentos (e provavelmente infecções) entre grupos de até 20 indivíduos (HILÁRIO *et al.*, 2010). Desta forma, é provável que na ocasião do programa de resgate de fauna, durante a construção da hidroelétrica, tenham sido capturados primatas pertencentes a alguns poucos bandos. Portanto, a captura dos animais não foi feita por amostragem espacial, e por isso não reflete

necessariamente a condição anti-OPV de todos os indivíduos e bandos dessas espécies de primatas na região amazônica. Um estudo muito semelhante foi realizado no Parque Nacional de Kibale, oeste de Uganda. GOLDBERG e colaboradores (2008) descreveram que uma população de colobos vermelhos de Pennant (*Procolobus pennantii*), primatas habitantes desse parque, apresentava evidências sorológicas de infecção por um OPV não-caracterizado, com percentuais de positividade de aproximadamente 25%. A amostragem utilizada por GOLDBERG foi de apenas 28 animais, caracterizando apenas 2 ou 3 grupos, o que indica que apenas um dos grupos apresentavam evidências de infecção por OPV. Infecções de primatas não-humanos por outros OPV não são incomuns, e normalmente estão associados a uma alta taxa de transmissibilidade dentro de uma determinada população (MÄTZ-RENSING *et al.*, 2006).

Em corroboração com os dados do presente estudo, que sugerem a circulação silvestre do VACV na região amazônica, MOTA e colaboradores (2010) descreveram uma soropositividade anti-OPV de aproximadamente 25% entre uma população humana de uma região rural em Acrelândia, Estado do Acre. Até a ocasião desse estudo, nenhum caso de vaccínia bovina havia sido registrado no Estado do Acre. Os autores sugeriram que os indivíduos soropositivos teriam sido expostos ou infectados por algum OPV, provavelmente VACV, em decorrência de atividades em florestas adjacentes ao povoado, como extrativismo e caça de animais silvestres (MOTA *et al.*, 2010).

A avaliação de DNAemia nos soros das espécies de macacos amazônicos (TABELA 8) foi baseada em estudos prévios que demonstraram a presença de DNA viral em amostras de sangue de humanos vacinados contra varíola, e em sangue de camundongos infectados com amostras brasileiras de VACV (SILVA-FERNANDES *et al.*, 2009; COHEN *et al.*, 2007; SAVONA *et al.*, 2006). A análise das sequências obtidas referentes ao gene *ha* mostraram a existência de uma deleção de 18 nucleotídeos na porção final do gene, presente também em diversas amostras de VACV isoladas durante surtos de VB no Brasil (FIGURAS 17-19). A relação entre primatas amazônicos infectados com VACV e emergência de surtos de VB no Brasil é incerta. Entretanto, a circulação de VACV no norte e nordeste do Brasil vem sendo notificada, e surtos foram recentemente registrados nos Estados

do Mato Grosso, Pernambuco, Maranhão, Rondônia e Tocantins (KROON, dados não publicados; MEDAGLIA *et al.*, 2009). Algumas das amostras isoladas durante esses surtos podem ter relação com os VACV circulantes na Amazônia, uma vez que apresentam a mesma assinatura molecular no gene *ha* (FIGURA 16).

Baseado nos dados apresentados no presente trabalho, e em estudos epidemiológicos relacionados a outros OPV, um modelo hipotético de transmissão de VACV será proposto pelo presente estudo (FIGURA 38) (SOUZA-TRINDADE *et al.*, 2003; LEITE *et al.*, 2005; LOBATO *et al.*, 2005); FERREIRA *et al.*, 2008). Neste modelo, os roedores peridomiciliares poderiam se infectar com VACV a partir de animais silvestres nas adjacências das fazendas, em decorrência de lutas territoriais (WSDE, 2008), ingestão de fezes ou carcaças contaminadas (FENNER, 1989) ou compartilhamento de alimentos (FENNER, 1989). A eliminação e transmissão de VACV e CPXV têm sido consistentemente demonstradas em modelos murinos (MAIBORODA, 1982; FERREIRA *et al.*, 2008), o que parcialmente explicaria a disseminação de VACV entre populações de roedores peridomiciliares. Alguns desses roedores eventualmente retornariam às fazendas, introduzindo VACV entre populações bovinas e humanas. Por outro lado, roedores peridomiciliares poderiam ser infectados com VACV após manterem contato com fragmentos de lesões bovinas e humanas, leite contaminado (ABRAHÃO *et al.*, 2009) ou fômites (tanque de expansão, latão, tecidos contaminados com sangue, ou material relacionado com a ordenha). Subsequentemente, tais roedores peridomiciliares infectados poderiam disseminar VACV para animais silvestres pelas fezes (FERREIRA *et al.*, 2008), carcaças (FENNER, 1989), durante lutas territoriais (WSDE, 2008) ou quando são predados (FENNER, 1989). Embora menos provável, a possibilidade de transmissão de VACV entre animais silvestres e humanos/bovinos não pode ser descartada, se considerarmos os dados apresentados por MOTA e colaboradores (2010). Novos estudos são necessários para elucidar a complexa dinâmica de transmissão do VACV, especialmente se seu amplo espectro de hospedeiros for considerado (McFADDEN, 2005). A presença de mamíferos amazônicos infectados com VACV pode representar, portanto, tanto a causa quanto a consequência dos surtos de VB. O monitoramento de roedores peridomiciliares poderia ser utilizado para prever surtos de VB ou para indicar o risco de introdução de VACV em ambientes silvestres.

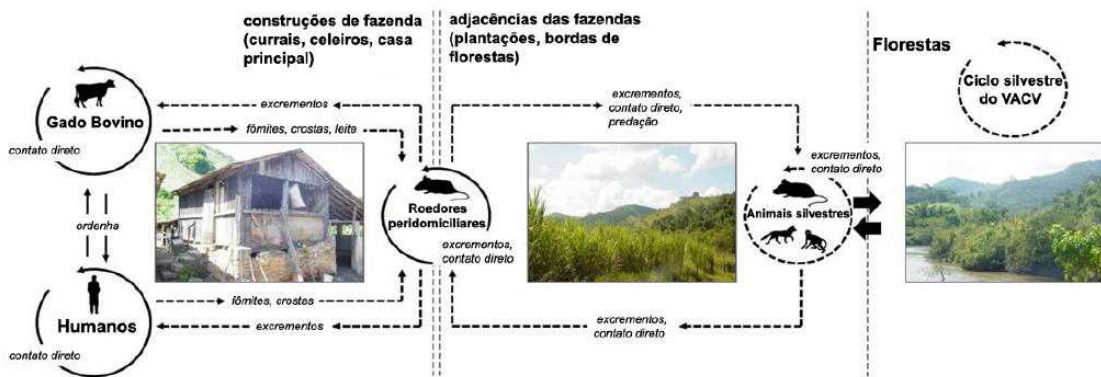


FIGURA 38: Modelo hipotético do ciclo de transmissão dos VACV. As linhas representam dados experimentalmente comprovados, enquanto as linhas pontilhadas representam proposições que ainda estão sendo investigadas.

Uma vez que os dados apresentados sugerem uma ativa circulação do VACV em ambientes silvestres, e que roedores peridomiciliares poderiam disseminar o vírus entre o meio silvestre e o meio rural (FIGURAS 13-19), se torna difícil o controle desta zoonose, por mais bem estruturada que seja uma determinada propriedade rural. Assim, a busca por imunógenos seguros contra a VB vem se tornando uma necessidade crescente para a prevenção desta doença. À primeira vista, as vacinas utilizadas durante a campanha da OMS para a erradicação da varíola humana poderiam representar boas opções. Entretanto, as consequências relacionadas ao escape e recombinação entre amostras vacinais e as que circulam de forma autóctone no território nacional são imprevisíveis. Além disso, muitos efeitos colaterais foram associados à maioria das amostras vacinais de VACV utilizadas pela OMS (PASTORET e VANDERPLASSCHEN, 2003).

Desta forma, no presente trabalho foi proposta a elaboração de imunógenos “não-vivos” contra a VB, e a execução de um estudo piloto em camundongos Balb/c. Foram analisadas duas vacinas de DNA, expressando B5R (glicoproteína da partícula EEV) ou H3L (glicoproteína da partícula IMV); e uma vacina inativada, utilizando a amostra brasileira VACV-BAV. O imunógeno BAV foi inicialmente proposto por FERREIRA (2008) e mostrou resultados promissores em testes em que camundongos foram desafiados com a amostra VACV-WR. Além disso, BAV inativado apresenta como vantagem o fato de ser produzido em MCA de ovos

embrionados, reduzindo os custos e eliminando a possibilidade de ocorrência de príons bovinos em sua composição. As vacinas de DNA expressando as glicoproteínas B5R e H3L foram desenvolvidas baseadas em estudos prévios que demonstraram que estas proteínas virais são as que melhor induzem a produção de anticorpos totais ou neutralizantes anti-VACV, respectivamente. Desta forma B5R-DNA e H3L-DNA foram testadas em associação com BAV, visando a redução da morbidade frente ao desafio com VACV-WR; e também foram testadas isoladamente com intuito de fornecer informações a respeito da importância da indução de resposta protetora anti-IMV ou anti-EEV.

Um dos maiores desafios do presente estudo foi a escolha da via de inoculação dos compostos vacinais. Os mecanismos de ação e indução de resposta imune pelas vacinas de DNA ainda são alvo de estudo e debate (FYNAN *et al.*, 1993; ULMER *et al.*, 1997; UCHIJIMA *et al.*, 1998; REN *et al.*, 2002; YOSHIDA *et al.*, 2000; CONG *et al.*, 2005, LI, *et al.*, 2006). A hipótese mais aceita seria que, após a imunização, o antígeno sintetizado é apresentado aos linfócitos T pelas células apresentadoras de antígenos (APCs) ou células somáticas eventualmente transfectadas com o DNA plasmidial expressando antígenos. Estas células, particularmente as células somáticas, podem liberar antígeno para outra APC, pela secreção ou por apoptose das células transfectadas. Estas APCs podem então, apresentar antígeno para células T CD4+ e CD8+, direcionando e amplificando a resposta. Entretanto, muitas vias de inoculação foram descritas para as vacinas de DNA, incluindo intratraqueal, intravenosa, intrabursal, intraorbital, intradérmica, intramuscular, oral, subcutânea e via mucosa, com sucesso na indução da resposta imune em todas as vias testadas (FYNAN *et al.*, 1993; ULMER *et al.*, 1997; UCHIJIMA *et al.*, 1998; REN *et al.*, 2002; YOSHIDA *et al.*, 2000; CONG *et al.*, 2005, LI, *et al.*, 2006). Embora PULFORD (2004) tenha descrito a utilização da via intramuscular com sucesso na imunização de camundongos contra VACV, outros estudos mostram que a via subcutânea seria mais auspiciosa, uma vez que seria mais provável o encontro entre células dendríticas e as vacinas de DNA, assim como os antígenos por ela sintetizados (LIU, 2003). A localização celular do antígeno, influenciada pela via de administração da vacina de DNA, parece ser crítica para a resposta imune gerada, e existe discordância na literatura sobre este assunto (LEWIS *et al.*, 1999, LIU *et al.*, 2003; MOREL *et al.*, 2004).

De uma forma geral, estudos mostram que a imunização pela via intramuscular com as vacinas de DNA induz preferencialmente a resposta do tipo Th1, enquanto as vias intradérmica ou subcutânea estimulariam a resposta Th2 ou uma resposta balanceada Th1/Th2 (NAFTZGER *et al.*, 1996; WEBER *et al.*, 1998; KANO *et al.*, 2007). Entretanto, MOREL e colaboradores demonstraram que a imunização de camundongos por sistema *gene gun* (intradérmica) com plasmídios que codificam proteínas citoplasmáticas e transmembrana induziu forte resposta imune Th1 e CD8+ (MOREL *et al.*, 2004). Desta forma, não havendo um consenso na literatura, foi escolhida a via subcutânea, uma vez que FERREIRA (2008) obteve resultados promissores utilizando esta via para o imunógeno BAV. Além disso, é importante mencionar que não foi objetivo do presente estudo a análise do perfil de citocinas ou marcadores indicadores de resposta celular ou humoral. Neste primeiro momento, objetivamos a análise da geração de proteção e redução de morbidade frente ao desafio intranasal com VACV-WR, e uma possível associação entre estes dados com a presença de anticorpos neutralizantes e totais anti-EEV ou anti-IMV.

Quando analisados individualmente, BAV se mostrou mais eficiente que B5R e H3L na geração de resposta protetora contra o desafio com VACV-WR (FIGURAS 28 e 29). Apesar de protegidos, todos os animais imunizados com BAV ainda apresentaram morbidade, mesmo sob o regime de *prime-boost* (FIGURAS 28 e 29). Todavia, a associação de BAV com B5R-DNA, sob o regime de 2 doses, reduziu de forma discreta o *score* da doença nos animais desafiados (FIGURA 29), constituindo um dos únicos grupos em que foi observada a recuperação completa dos animais antes do 14º d.p.i. (FIGURA 29). Uma possível explicação para este resultado seria o fato de que B5R-DNA induz mais robustamente a proteção contra as partículas do tipo EEV, como pode ser visto nos testes de inibição da formação de cometas (TABELA 9). Desta forma, anticorpos anti-B5R, e provavelmente uma resposta celular específica contra esta proteína, inibiriam a disseminação viral dentro de um organismo infectado, uma vez que este é o principal papel atribuído às partículas virais do tipo EEV.

É importante mencionar que durante o processo de multiplicação de BAV em ovos embrionados de galinha foram coletados somente os *pocks* esbranquiçados virais

e, portanto, foram encaminhados para a purificação viral somente tecidos e células da MCA, sem frações de sobrenadante. Desta forma, na produção de BAV, são purificadas principalmente partículas do tipo IMV. Este detalhe técnico poderia explicar a resposta quase exclusivamente anti-IMV induzida pelo imunógeno BAV, quando considerados os testes *in vitro* (FIGURAS 30 e 36; TABELA 9). Embora IMV e EEV compartilhem proteínas do cerne viral, anticorpos eventualmente produzidos contra estas proteínas não apresentaram atividade neutralizante em testes *in vitro* e, portanto, não previnem a formação de cometas (TABELA 9). Desta forma, roedores imunizados com BAV apresentaram anticorpos neutralizantes somente contra a forma IMV, como sugerem os ensaios de soroneutralização (FIGURA 30).

Apesar de induzir a produção de altos títulos de anticorpos neutralizantes anti-IMV (FIGURA 30), os grupos de camundongos imunizados somente com a vacina H3L-DNA apresentaram altos percentuais de morbidade e mortalidade (FIGURAS 28 e 29). Esses dados sugerem, mais uma vez, que a resposta humoral anti-EEV e a resposta celular (não avaliada no presente estudo) poderiam desempenhar um importante papel na proteção contra infecções por VACV. Outra possibilidade seria que outras proteínas de superfície do IMV também seriam importantes para a geração de resposta protetora *in vivo*, conforme observado para BAV.

Os resultados obtidos nos testes de ELISA (FIGURA 37), soroneutralização (FIGURA 30) e inibição de cometas (TABELA 9) sugerem que a elaboração de um imunógeno anti-VACV, que reduza de forma considerável os percentuais de mortalidade e morbidade frente a um desafio, deva contemplar mecanismos indutores de resposta anti-IMV e anti-EEV. Curiosamente, os grupos de animais inoculados com B5R-DNA + H3L-DNA apresentaram alta mortalidade e morbidade (FIGURAS 28 e 29). Todavia, é importante mencionar que foram utilizadas doses 20% menores que as descritas por PULFORD (2004) e foram administradas apenas duas doses do imunógeno, ao invés de quatro. Além disso, como mencionado, outras proteínas do IMV parecem ser importantes no processo de indução de resposta protetora *in vivo*. Estudos prévios demonstraram que a glicoproteína H3L é melhor indutora de resposta protetora frente a desafios quando administrada sob a forma de proteína purificada (e não na forma de vacina de

DNA), na dose de 50-200 μ g, em 3 ou 4 doses (PULFORD *et al.*, 2004; DAVIES *et al.*, 2005). Portanto, imunógenos que utilizam antígenos exclusivamente de IMV ou EEV requerem altas doses vacinais, e vários reforços. Até o momento, nenhum estudo descreve a utilização somente de partículas EEV em testes de desafio, provavelmente pela dificuldade em purificar esta partícula e pela sua pouca estabilidade e relevância epidemiológica (McFADDEN, 2005). Todavia, embora IMV corresponda a 90% da progênie viral, EEV parece ser importante no que diz respeito à gravidade e duração de uma infecção por VACV em modelo murino, e por isso a resposta contra esta partícula deve ser mais bem explorada por futuros estudos. A existência de dois tipos de partículas virais, contendo diferentes glicoproteínas de membrana, poderia operar como mais um mecanismo de escape associado ao VACV.

Os resultados de imunização e desafio obtidos com BAV inativado termicamente sugerem que esta forma de inativação viral pode substituir a β -propiolactona, reduzindo tempo e custo (FIGURA 25). Outras associações ao imunógeno BAV serão testadas no futuro, como a administração de B5R e H3L sob a forma de proteínas purificadas. Além disso, a adição de partículas EEV ao imunógeno BAV inativado poderia também ser explorada, com o aperfeiçoamento dos métodos de purificação e concentração dessas partículas virais. Os dados obtidos e discutidos no presente trabalho reforçam os estudos referentes à vacinologia anti-OPV, e abrem as portas para futuros estudos imunológicos que permitam avaliar as respostas celular, humoral e inata anti-VACV de uma forma integrada. O preenchimento das lacunas deixadas pelo presente trabalho auxiliarão na construção de um modelo sólido de circulação dos VACV assim como na elaboração de métodos seguros e eficazes para o combate de novas infecções, abrindo perspectivas para o controle e prevenção da vaccínia bovina no Brasil.